

Advies Nieuwe DEC

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: *AVD 50100 2022 16087*
2. Titel van het project: *Het bepalen en valideren van de effectiviteit van nieuwe geneesmiddelen en het onderzoeken van de mechanismen die betrokken zijn in het ontstekings- en fibroseproces met behulp van in vivo fibrosemodellen*
3. Titel van de NTS: *Onderzoek naar nieuwe medicijnen tegen littekenvorming en ontsteking met behulp van muismodellen*
4. Type aanvraag:
 - ☒ X nieuwe aanvraag projectvergunning
 - ☐ wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: [REDACTED]
 - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
 - e-mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: *27/05/22*
 - aanvraag compleet: ...
 - in vergadering besproken: *9/6/22*
 - anderszins behandeld: ...
 - termijnonderbreking(en) *van 12/6/22 tot 15/7/22*
 - besluit CCD tot verlenging adviestermijn met max. 15 werkdagen: *n.v.t.*
 - aanpassing aanvraag: *15/7/22*
 - advies aan CCD: *29/7/22*
7. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD. *De aanvraag is afgestemd met, en heeft instemming van de IvD.*
8. Eventueel horen van aanvrager: *N.v.t.*
 - Datum:
 - Plaats:
 - Aantal aanwezige DEC-leden:
 - Aanwezige (namens) aanvrager:
 - Gestelde vraag/vragen:
 - Verstrekt(e) antwoord(en):
 - Het horen van de aanvrager heeft *wel/niet* geleid tot aanpassing van de aanvraag
9. Correspondentie met de aanvrager:
 - Datum: *12/6/22*
 - Gestelde vraag/vragen: *zie hieronder*
 - Datum antwoord: *15/7/22*
 - Verstrekt(e) antwoord(en): *zie hieronder*
 - De antwoorden hebben *wel* geleid tot aanpassing van de aanvraag

De door de DEC gestelde vragen en de gegeven antwoorden:

Algemeen antwoord van de aanvrager

De meest in het oog springende wijzigingen van de aanvraag zijn:

- We hebben de MDR2ko muis meer nadrukkelijk benoemd en apart als diermodel benoemd.
- Wanneer dieren meer dan 20% afvallen, wordt het ongerief als ernstig beschouwd. Ook hebben we duidelijker aangegeven wat de grenzen zijn (max. 3 dagen meer dan 20% gewichtsverlies, nooit meer dan 25% gewichtsafname).
- Verder diverse tekstuele aanpassingen en aanvullingen.

Projectvoorstel

1. Fibrose heeft een sterk immunologische component. Wat is de reden dat u daar niet naar kijkt?

De immunologische component is in het algemeen niet de primaire uitleesparameter. Voor de meeste studies is fibrosevorming de belangrijkste uitleesparameter. Maar afhankelijk van de vraagstelling, kan wel degelijk ook naar de immunologische component worden gekeken. In een aantal van de voorgaande studies is er zelfs gekeken naar de effecten van immuunmodulatoren op het ontstaan van fibrose. Een duidelijk voorbeeld hiervan was een studie waarbij we het gebruik van dexamethason op de remming van fibrose hebben beoordeeld.

Wanneer er vraag is naar de bijdrage van de immunologische componenten hebben we hiervoor verschillende immunohistochemische assays beschikbaar waarmee de rol van verschillende immuuncellen (T-cellen, B-cellen, macrofagen) zichtbaar gemaakt kan worden. Ook histologische beoordeling van de weefsels door de proefdierpatholoog beoordeeld behoort tot de mogelijkheden. Tenslotte kunnen we met behulp van transcriptoom analyse onderzoeken welke immunologische pathways geactiveerd zijn.

2. Bij 3.1, Achtergrond: Dit project is een vervolg op een eerder project. Graag zou de DEC een bespreking zien van wat dat project heeft opgeleverd qua nut voor de patiënt en kennis en ervaring aan uw kant. Wat is ervan geleerd en wat is de weerslag daarvan op dit project? Wat is vergelijkbaar en wat is additioneel? 10% van de geteste therapeutica stroomt door naar de klinische fase, waar opnieuw een percentage zal afvallen. Vind u dit, terugkijkend, een passende verhouding ten opzichte van de dierproeven? Kunt u ook aangeven voor hoeveel dieren u de vorige vergunning had aangevraagd, hoeveel dieren u werkelijk heeft gebruikt en in welk procent u effectiviteit hebt kunnen aantonen van de te onderzoeken stoffen?

Op het gebied van kennis en ervaring is enorm veel geleerd tijdens het eerdere project: we hebben onder andere geleerd hoe fibrose ontwikkeling zich in de verschillende modellen in de tijd ontwikkeld, onderzocht wat voor verschillen er in fibroseontwikkeling zijn tussen de geslachten (bijvoorbeeld dat een gelijke dosis bleomycine in de longen in mannen tot een veel robuustere fibrose leidt dan in vrouwen), er zijn een aantal nieuwe uitleesparameters uitgetest (o.a. geautomatiseerde beeldanalyse van histologische coupes om fibroseontwikkeling te kunnen meten en zwaar water technologie om nieuw gevormd collageen te kunnen labelen en daarmee te kunnen kwantificeren). Bovendien is er veel informatie verzameld over de temporale activiteit van pathways. Hierbij zijn uitgebreide

transcriptoom datasets¹ gemaakt, waarmee beter gekeken kan worden of, en welk model, het meest geschikt is om activiteit te meten. Er is in het afgelopen project een nieuw combinatiemodel voor huid- en longfibrose opgezet, waarbij er een meer geleidelijke fibroseontwikkeling plaatsvindt, waardoor muizen ondanks dat er twee organen tegelijkertijd in dezelfde muis bestudeerd worden toch minder ongerief hebben. Met dit model hebben we dus zowel een verfijning alsook een reductie van het aantal dieren kunnen bewerkstelligen.

De onderzoeksvraag van voorliggende aanvraag is op grote lijnen vergelijkbaar met de voorgaande aanvraag maar er zijn natuurlijk verschillen in tussen de huidige aanvraag en de vorige. Het meest in het oog vallende verschil is dat we aanzienlijk minder dieren aanvragen. Dit komt enerzijds omdat de vorige aanvraag bestond uit 4 bijlagen met elk een maximaal aantal dieren vermeld. Ook is gebleken dat er vrijwel geen vraag was naar rat studies waardoor er nu alleen muis studies zijn beschreven. In de vorige aanvraag (AVD5010020172207) waren er 21.000 muizen en 3.800 ratten vergund. Er waren hiervan slechts 1.112 dieren gebruikt. Hiervan waren 119 dieren voor optimalisatie van de modellen. Dit grote verschil tussen het aantal vergunde en gebruikte dieren komt enerzijds door een de hierboven vermelde reden (het grotere aantal bijlagen), anderzijds door een te positieve inschatting van het aantal door TNO binnengehaalde projecten en een extra dip door de Corona-perikelen (2018 en 2019 circa 6 projecten per jaar, in 2020 en 2021 in totaal slechts 3 studies).

Verder is nu het MDR2 model toegevoegd (zie ook verderop). Dit knockout model is een goede aanvulling op de andere modellen waarmee weer andere karakteristieken van de fibrosevorming kunnen worden bestudeerd. Zo kent dit model een veel chronischere ontwikkeling van fibrose als in sommige van de andere modellen en de wijze waarop fibrose ontstaat zeer relevant als model patiënten die aan primaire sclerotiserende cholangitis lijden. Ook willen we door het moduleren van de modellen met siRNA of virale vectoren de mogelijkheden gebruiken om specifieke targets te bestuderen in de muismodellen. De vraag naar dit soort mogelijkheden krijgen we steeds vaker van onze klanten.

Er wordt geschat dat maximaal 10% van de geteste therapeutica doorstromen naar de klinische fase. Ook uit onze experimenten is gebleken, dat ondanks de zorgvuldige voorselectie waarin de stoffen wel in vitro effectiviteit vertoonden, slechts een beperkt aantal stoffen een klinisch relevant effect hadden. Daarnaast is het voorgekomen dat een stof ondanks excellente resultaten in het CCl4 model om andere redenen niet verder ontwikkeld werd (zie ook vraag 9). Ondanks deze beperkingen zijn er toch een tweetal stoffen die in de voorafgaande projecten zijn getest momenteel in een fase 2 studie. Het betreft hier een integrine remmer en een modulator van neuropiline.

We willen nogmaals benadrukken dat de beperkte doorstroming van therapeutica naar de klinische fase niet wil zeggen dat deze experimenten nutteloos waren. We weten dat bij het doen van dit soort experimenten de kans extreem gering is dat een te testen product uiteindelijk in de patiënt komt. Aan de andere kant is dit de route die gevolgd moet worden en zijn de ziektebeelden waarvoor de nieuwe medicijnen worden ontwikkeld extreem belastend voor de patiënten. Bijvoorbeeld bij longfibrose is de mediane overleving gelijk aan zeer ernstige kankervormen zoals pancreaskanker en overlijden de patiënten uiteindelijk aan een gebrek aan zuurstof. Door het uitvoeren van onze experimenten is

¹ Deel van deze datasets zijn gepubliceerd, oa [REDACTED]; verdere publicaties zijn in voorbereiding.

voorkomen dat er onnodige klinische trials uitgevoerd gaan worden of is de studieopzet dusdanig aangepast dat er wel een klinische trial mogelijk was.

3. Bij 3.1, Achtergrond: U noemt twee nieuwe medicijnen [REDACTED] [REDACTED] als recente nieuwe medicijnen tegen longfibrose. Weet u of hiervan de effectiviteit in muizenmodellen is beschreven in de literatuur? Wat is het werkingsmechanisme of via welke pathways werken deze middelen? Heeft u overwogen deze middelen als positieve controle te gaan gebruiken voor het verbeteren/verfijnen van u modellen?

Voor beide medicijnen is een werkingsmechanisme beschreven. [REDACTED] grijpt aan op tyrosine kinase receptor signaling en remt daarmee de PDGF, FGF en VEGF pathways². Voor [REDACTED] is het minder duidelijk hoe het mechanisme precies werkt: studies wijzen op remming van TGFβ of p38 signaling³, maar mogelijk spelen ook off-target effecten een rol⁴. Voor beide stoffen zijn publicaties beschikbaar dat het in de muis zou werken, echter zowel bij ons als bij een groot aantal andere instellingen en bedrijven (persoonlijke communicatie) is het zeer moeilijk gebleken om deze effectiviteit te reproduceren in muizen. Voor [REDACTED] zouden problemen met oplosbaarheid in de toe dienen experimentele preparaten hieraan bij kunnen dragen (persoonlijke communicatie met oorspronkelijke ontwikkelaars [REDACTED]); voor [REDACTED] is het in onze muizen zeer moeilijk gebleken om de gepubliceerde PK niveaus te bereiken zonder dat er toxische bijeffecten ontstaan. In ratten lijkt dit minder een probleem te zijn. We hebben beide stoffen in meerdere studies getest, maar de resultaten waren dusdanig teleurstellend dat wij op dit moment [REDACTED] en [REDACTED] beiden niet als referentiestof meenemen.

4. Bij 3.2, Doel: Kunt u verhelderen wat u ziet als het directe doel, respectievelijk het uiteindelijke doel? Wat is de plaats van het doel “verbeteren van modellen”? Dit doel staat niet aan het begin genoemd, maar komt er later in de tekst bij. In de strategie is ook niet vermeld welke overwegingen leiden tot het besluit tot verfijning van een model. Dit zou u ook kunnen verhelderen? Het is zo voor de DEC niet duidelijk wat u precies wilt verbeteren/verfijnen of vernieuwen. Wat schort er aan de huidige modellen? Zie ook vraag 9.

In het projectvoorstel hebben we wijzigingen (rood gemarkeerd) aangebracht waardoor het uiteindelijke en directe doel beter is omschreven.

Ten aanzien van uw vraag m.b.t. wat er schort aan de huidige modellen: De modellen die hier beschreven staan zijn allen (behalve MDR2/- model) gericht op het induceren van schade en het

[REDACTED]

analyseren van de daarop volgende fibrose. Dit levert een klinisch beeld op wat vergelijkbaar is met fibrose in de mens⁵. Ondanks dat de modellen zichzelf al lang bewezen hebben, zijn er nog continue optimalisaties en verbeteringen mogelijk. Een voorbeeld hiervan is het variëren met de bleomycine dosis, maar ook andere toedieningen, zoals intradermale toediening zijn eerder beschreven⁶⁻⁷. Maar ook zijn er continue ontwikkelingen m.b.t pijnbestrijding en het voorkomen van ongerief. Wanneer zulke ontwikkelingen zullen leiden tot een verfijning van het model, of vermindering van het aantal proefdieren, willen we graag de mogelijkheid hebben om dit te testen in de huidige modellen.

Mogelijke verbeteringen zouden bijvoorbeeld kunnen zijn: uittesten van single cell sequencing als additionele read-out, onderzoeken of het CCl4 model een gelijkmatigere inductie kan krijgen door de downregulatie van Cytochroom P450 (noodzakelijk voor CCl4 activatie) te remmen, onderzoeken of de verminderde voedselinname bij de longfibrose modellen te verbeteren is door pijnstilling in het drinkwater toe te voegen om potentiële pijn bij slikken te verminderen.

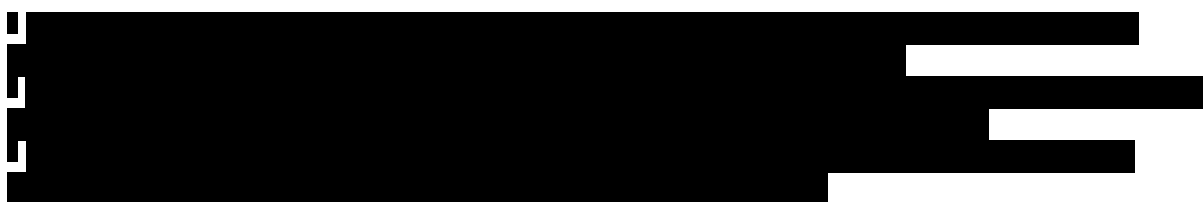
Omdat de meeste modellen gebruik maken van de inductie van schade, zijn we ook altijd op zoek naar modellen die een andere manier voor de inductie van fibroseontwikkeling hebben. Daarom is de ontwikkeling van de MDR2-/- muis een mooi voorbeeld van de richting waarop we hier verder zouden kunnen gaan: in deze muis is de afvoer van galzouten bemoeilijkt; hierdoor zouden zowel stoffen getest kunnen worden die direct het ontstaan van fibrose door galzoutophoping remmen als ook stoffen die via het verbeteren van de galzoutafvoer de fibrose verhinderen.

5. Bij 3.3, Belangen: Heeft uw organisatie ook een commercieel belang? Dit is niet genoemd.

Commercieel belang voor TNO is onder 3.3.2 toegevoegd

6. Bij 3.4.1, Strategie: Kunt u de strategie van deze koepelaanvraag verhelderen? Is er een intakegesprek met de klant? Is er een beslisboom of beslisstrategie? Welke keuzes worden op welke punten hoe gemaakt? Welke in-vitro-data worden ingebracht, op grond waarvan wordt een model gekozen? Et cetera. Het gehele voortraject is voor de DEC te onduidelijk, waardoor mede door de huidige beschrijving (open en flexibel), het moeilijk is voor de DEC in de afweging mee te kunnen nemen welke stappen er al zijn gedaan en wat de noodzaak is de uiteindelijke dierproef te moeten uitvoeren.

Er vindt altijd een intakegesprek plaats met experts van de opdrachtgever. Doel van dit gesprek is om gezamenlijk tot de meest optimale studie te komen om de vragen van de klant te beantwoorden. Een groot deel van de beslisstrategie ligt bij de opdrachtgever. Zij hebben tenslotte al het voorwerk gedaan, kennen de targets het beste en hebben op grond van hun resultaten besloten dat een dierstudie de volgende noodzakelijke stap is. Wij vragen altijd wat er is gedaan, maar vellen geen oordeel over het voorwerk en hebben ook geen dossier over het voorwerk; wij zijn geen in vitro experts.



Wij discussiëren met de opdrachtgever vooral wat een optimale studie opzet is: welk model past het beste bij de gestelde vraag, zijn de te onderzoeken targets gereguleerd in onze modellen, welke studieopzet past het beste en aan welke randvoorwaarden moet worden voldaan. Basis hierbij is dat wij alleen wetenschappelijke overtuigende experimenten uitvoeren. Als wij niet overtuigd zijn dat het een goede proef is, doen wij de proef niet. Als een opdrachtgever bijvoorbeeld te kleine groepen eist (oa uit kostenoverwegingen), zullen wij niet met deze opdrachtgever in zee gaan.

7. Bij 3.4.1, Strategie: Kunt u uitleggen hoe u de Transcriptoom-database gebruikt met de gegevens van de opdrachtgever en of de uitkomst het wel of niet aannemen van de opdracht mede bepaald op grond van haalbaarheid?

Aan de hand van de transcriptoom database kan gekeken worden of de beoogde pathways actief zijn in het model en of daarmee te verwachten kan zijn of modulatie van de pathway een effect zou kunnen hebben. Daarnaast worden deze databases ook gebruikt om te kijken welk fibrose model het meest geschikt is voor het beantwoorden van specifieke vragen en kan het helpen om bijvoorbeeld een therapeutisch toedieningsschema te ontwikkelen.

Als uit database blijkt dat de pathway niet geactiveerd is in een bepaald model, heeft dit in het verleden er inderdaad toe geleid dat er besloten is om de proefdierstudies niet uit te voeren.

8. Bij 3.4.1, Strategie: Er is sprake van een knock-out-muismodel. Dit model zien wij echter in de bijlage nauwelijks terugkomen. Kunt u hier op de passende plaatsen meer over vertellen?

We hebben dit model nu wat prominenter in het projectvoorstel vermeld en het MDR2-/- model is in de bijlage op meerdere plaatsen toegevoegd/verduidelijkt.

9. Bij 3.4.1, Strategie: Een vijfde van de dieren (20%) wordt gebruikt voor verfijning van het model. Waar baseert u dit hoge percentage op en hoe bepaalt u strategische keuzes om hier dieren voor in te zetten? Wat is van de huidige modellen de focus qua gewenste verfijning en hoe gaat u daaraan werken? Voert u bijvoorbeeld eerst een pilot uit en wat zijn dan de criteria voor verder onderzoek? Of waar stelt u vast dat het model op dat moment niet verbeterd/verfijnd kan worden? Zie ook vraag 4.

Op dit moment is de schatting van 20% voor modelverbetering en vernieuwing nog lastig in te schatten. De 20% is echt het maximale aantal: de tekst is hierop in het project proposal aangepast naar 'het overgrote deel (>80%) ...zullen effectiviteit studies zijn...'. In het voorgaande project was er ca. 10% van het aantal dieren gebruikt voor modelverbetering (zie ook vraag 1). Let op dat dit percentage niet alleen voor verfijning is, maar dat hierin alle ontwikkeling op het gebied van het verkrijgen van meer kennis over de modellen, inclusief het identificeren van nieuwe pathways, ontwikkelen van nieuwe read-outs, testen van nieuwe referentiestoffen en het opzetten van verbeterde modellen (zie ook vraag 4).

Huidige focus van verbetering is bijvoorbeeld het verder valideren van het MDR2-/- model. In een eerste pilot is gebleken dat er inderdaad fibrose te meten is. Verdere stappen zullen zich richten op ontwikkeling van pathologie in de tijd, testen van reproduceerbaarheid van het model en het testen van referentiestoffen. Harde criteria kunnen we nu nog niet definiëren. Maar go/no-go momenten in de verdere ontwikkeling van het knockout model, maar ook voor de andere modelverbeteringen worden o.a. bepaald door de mate van fibrose vorming, reproduceerbaarheid en ongerief van de dieren.

Wij gaan ervan uit dat er voor alle modellen altijd mogelijkheden voor verbetering/verfijning zijn. Op basis van vragen uit de markt en beschikbare capaciteit en financiën zal er gekeken worden waar prioriteit aan gegeven zal worden.

10. Bij 3.4.1, Strategie: Kunt u enkele voorbeeldcases beschrijven van bepaalde stoffen, en hoe u de strategische stappen hebt doorlopen of zou doorlopen?

Voorbeeld van een langlopend traject: een aantal jaar geleden hebben we een serie van projecten voor een grote farmaklant uitgevoerd: zij kwamen bij ons met een serie potentiële kandidaat medicijnen waarin zij in vitro effect hadden laten zijn. Wij hebben de volgende reeks studies (allen in lever CCl4 model) uitgevoerd:

- 1) Screening van 5 kandidaat medicijnen
- 2) Dose-range van de 2 beste kandidaat medicijnen
- 3) PK studie beste kandidaat
- 4) Vergelijking effectiviteit preventief vs therapeutisch toediening
- 5) Testen verschillende toedieningsschema's (2x per week, 1x per week, 1x per 2 weken)
- 6) Testen van meest optimale dosis/toediening in TNO NASH model

Uit de laatste proef kwamen resultaten naar voren waarbij bleek dat er onder heel specifieke metabole omstandigheden er in een bepaalde groep patiënten mogelijke toxische effecten konden ontstaan. Hierop is besloten om deze compound niet verder te ontwikkelen. De opdrachtgever was aan de ene kant teleurgesteld dat de compound niet verder richting klinische fase kon, aan de andere kant zeer blij dat dit potentiële bijeffect kan worden ontdekt, omdat hiermee potentieel risico voor patiënten voorkomen kon worden en er niet onnodig een (extreem dure) klinische fase nodig was) en dit geld voor betere kandidaten kon worden besteed.

In de meeste studies voeren wij een deelaspect van dit scenario uit.

11. Bij 3.4.1, Strategie: Wat is de gedachte achter “modellen aanpassen met bijvoorbeeld siRNA of virussen”? Kunt u de strategie toelichten, liefst met een beslisboom en te nemen stappen? Is dit relevant voor bijlage 1? Daarin is dit niet aangetroffen.

Een belangrijk doel van dit project is te onderzoeken of modulatie van bepaalde pathways kunnen leiden tot een remming van het fibrose proces. Dit zal meestal gebeuren d.m.v. het toedienen van therapeutica zoals small molecules of antilichamen. Op het moment dat deze niet beschikbaar zijn, is het ook mogelijk om pathways te remmen mbv siRNA of door modulatie (zowel remmings- als opregulatie) via bijvoorbeeld AAV virussen. Aan de hand van dit soort resultaten kan worden aangetoond dat modulatie van een pathway inderdaad tot fibrose remming voert kan het voor de opdrachtgever aantrekkelijker worden om te investeren in de ontwikkeling van nieuwe compounds die de betreffende pathway remmen. (zie ook 2A, bijlage). Een alternatief voor deze aanpak kan ook zijn door fibrose te induceren in transgene dieren waarin de betreffende genen ‘uit- of ingeknoekt’ zijn.

12. Bij 3.4.1, Strategie: Wat bedoelt u met pathways ontwikkelen? Bedoelt u identificeren?

Inderdaad is identificeren bedoeld, tekst is aangepast.

13. Bij 3.4.2, Onderbouwing van de gekozen strategie: Zijn er 5 of 6 modellen (zie onze vraag over de transgene muis)? Worden die parallel ingezet of serieel? Of wordt er één model gekozen? Of twee? Dit is voor ons niet duidelijk.

Het MDR2-/- model is toegevoegd aan de bijlage, dus gaat het hier over 6 modellen, waarvan dus 2 lever fibrose modellen zijn.

In de praktijk wordt er in overleg met de farma partner gekozen voor het uitvoeren van een studie in een enkel model (afhankelijk van welke processen er beïnvloed moeten worden en afhankelijk van het toepassingsgebied waarin de nieuwe medicijnen uiteindelijk moeten worden ingezet). In uitzonderlijke gevallen zal er gekozen worden om de compound in meerdere modellen tegelijkertijd te testen (bijvoorbeeld als de klant nog aan het overwegen is in welk behandelgebied de te testen stof de beste kans heeft om tot een klinische toepassing te komen).

De tekst in 3.4.2 is aangepast.

14. Kunt u op verscheidene plaatsen in het projectvoorstel uw stellingnames onderbouwen met referenties? (Bijvoorbeeld de stelling dat vandaag de dag de focus ligt op combinatietherapieën.)

Er zijn op een aantal plaatsen referenties toegevoegd. Echter de meeste stellingnames zijn gebaseerd op de kennis die beschikbaar is binnen ons grote netwerk van academische en vooral industriële partners. Bijvoorbeeld, de stelling dat vandaag de dag de focus ligt op combinatietherapieën, komt in deze gesprekken duidelijk naar voren: er hebben de laatste jaren een behoorlijk aantal fase 3 trials gefaald op effectiviteit, hierbij wordt duidelijk dat het remmen van een enkele pathway niet voldoende is, maar meerdere pathways tegelijkertijd geremd moeten worden. Daarnaast zijn bijvoorbeeld bij longfibrose eindelijk twee therapieën beschikbaar; hoewel deze zeker niet ideaal zijn, zijn ze dusdanig levensverlengend dat in de meeste nieuwe trials gekeken zal worden naar de effecten van nieuwe compounds “on top off” de bestaande medicatie⁸⁻¹⁰

Bijlage 1:

15. Bij 2.A: Experimentele aanpak en uitkomstparameters: Kunt u ook hier duidelijk maken hoe het zit met de 20% dieren die gebruikt worden voor verfijning van de modellen? Welke studies zijn dit en wat is reden om een dergelijke studie te doen? Hoe denkt u de modellen te gaan verbeteren?

De 20% voor verfijning van de modellen is gebaseerd op de maximale aantallen die haalbaar zijn om qua studies uit te kunnen voeren. In de praktijk zal dit waarschijnlijk percentage lager komen te liggen. Bij vraag 3 en 8 zijn al een aantal voorbeelden gegeven van potentiële verbeteringen en de rationale hiervoor.



16. Bij 2.A: Kunt u verhelderen hoe en wanneer de transgene dieren worden ingezet? Krijgen zij spontaan fibrose? Hoe uit zich dat? Worden deze dieren behandeld?

In MDR2-/- dieren ontstaat na de leeftijd van 4 weken oud spontaan leverfibrose. Dit komt omdat deze muis geen functionele expressie van de lipase ABCB4/MDR2 heeft waardoor hepatocyten een bepaald fosfolipide (fosfathidylcholine) niet richting de galgang kan transporteren.

Dit heeft tot gevolg dat de galzouten niet verpakt worden in neutraliserende fosfolipide-micellen en daardoor de celmembraan van galwegepitheelcellen in de lever beschadigen. Dit veroorzaakt cycli van ontsteking, sclerotisering van de galgangen in de lever, en uiteindelijk leidt dit tot een milde, niet-progressieve vorm van leverfibrose. De mate van leverfibrose kan gemoduleerd worden door de samenstelling van macronutriënten in het dieet te veranderen. Het exacte mechanisme hierachter is nog onduidelijk. Een ernstige complicatie in het MDR2-/- muismodel is het optreden van leverkanker in dieren van ongeveer 1 jaar oud.

Zowel een experimentele interventie of een extra inducer van fibrose kan in deze dieren worden ingezet.

We hebben deze informatie nu vermeld in de tekst van de bijlage.

17. Bij 2.A: In de tabel met de verschillende modellen staat een tegenstrijdigheid: "Langdurige blootstelling aan een lage dosering van bleomycine veroorzaakt in de dermis lokaal ontsteking en collageen ophoping en in de longen matige longfibrose. Een extra blootstelling van bleomycine in de longen zorgt dat de longfibrose van matig naar mild gaat." Waarom zou een tweede dosis de klinische verschijnselen verminderen?

Dit is een schrijffout: de correcte versie moet zijn: een extra blootstelling van bleomycine in de longen zorgt dat de longfibrose van mild naar matig gaat. De tekst is aangepast.

18. Bij 2.A: Wat bepaalt of een model langer behandeld wordt dan de minimale behandelduur?

Dit hangt vooral af van de exacte vraagstelling en het werkingsmechanisme van de te testen stof: als een stof bijvoorbeeld in het initiële ontstekingsproces ingrijpt, zal er een kortere behandelduur nodig zijn dan als een stof laat in het fibroseproces ingrijpt. Ook zal soms bij een therapeutisch behandelprotocol een langere behandelduur nodig zijn dan bij een preventieve setup.

19. Bij 2.A: Is het mogelijk het inspuiten van IP-olie te vermijden? Of kunt u specificeren om wat voor type olie het gaat en of er historische gegevens zijn waaruit blijkt dat deze olie geen reacties hebben opgewekt met matig ongerief tot gevolg?

Het inspuiten van IP-olie in het CCl₄ model is niet te vermijden; de CCl₄ is opgelost in de olie. Hiervoor wordt minerale olie gebruikt. De muizen laten na het toedienen van alleen minerale olie geen afname in lichaamsgewicht zien. Ook zijn geen veranderingen in gedrag waar te nemen. Bij obductie na offeren zijn geen verklevingen van de darm of andere organen zichtbaar (zie ook antwoord bij 23b).

20. Bij 2.A: Hebt u overwogen de statistische toets eenzijdig op te zetten als u gaat onderzoeken of een hogere dosis te onderzoeken farmacon effectiever zou zijn? Zou dit het aantal dieren kunnen verminderen? (Dan ook vermelden bij Vermindering.)

We hebben dit inderdaad overwogen, maar hier niet voor gekozen omdat vaak niet helemaal zeker is welke effecten kunnen optreden. We hebben in het verleden meermaals gezien dat nieuwe stoffen in plaats van een vermindering juist een onverwachte toename van fibrose lieten zien. Ook deze effecten willen we statistisch kunnen beschrijven en kiezen er daarom voor om twee-zijdig te toetsen.

21. Bij 2.A: Bij de aanpassing voor het te verwachten verlies is een rekenfout gemaakt bij de uitval en de groepsgrootte. Als van het totale aantal aangegeven dieren per groep het percentage dieren dat uitvalt wordt berekend zijn de groepsgroottes kleiner dan u aangeeft.

Dit is scherp opgemerkt door de commissie. We hebben in de tabel de aantallen voor de groepsgrootte gecorrigeerd. Omdat dit slechts voorbeelden betreft hebben we de totaal aantallen dieren voor dit project ongewijzigd gehouden t.o.v. de eerder door u beoordeelde versie.

22. Bij 2.B, De dieren: U hebt “gezien dat de markt de afgelopen jaren is teruggelopen”. Kunt u dit toelichten? Hoe komt dit? Zijn er diervervangende methoden? (Dan ook uitleggen bij Vervanging.)

Een belangrijke reden hiervoor is dat op het moment dat Pirfenidone en Nintedanib op de markt kwamen er enorm veel optimisme was dat dit ook met andere medicijnen zou gaan lukken. Dit optimisme is intussen ingehaald door realisme: er zijn de laatste jaren veel klinische trials geweest met negatieve uitkomsten. Er wordt nog steeds veel ontwikkeld, maar bedrijven zijn voorzichtiger geworden om groots te investeren in fibrose.

In het veld wordt meer gebruik gemaakt van precision cut tissue slices met humaan materiaal; het is echter nog onduidelijk hoe relevant deze assay is voor het vertalen naar de humane klinische situatie.

23. Bij 2.B, De dieren, geslacht: U wordt geacht ernaar te streven zowel mannelijke als vrouwelijke dieren te gebruiken, om fokoverschot te voorkomen. U gebruikt beide, maar zeer goed mogelijk op verschillende momenten. Betekent dat dat er een fokoverschot van een vergelijkbaar aantal dieren zal zijn, wellicht bij de fokker?

Er kan inderdaad mogelijk een fokoverschot bij de fokker ontstaan, al heeft deze natuurlijk een veel grotere mogelijkheid om deze dieren weer aan andere klanten te kunnen leveren.

Het is in onze ogen niet wenselijk om in 1 studie zowel mannen als vrouwen te gebruiken: inductie van bijvoorbeeld longfibrose verschilt aanmerkelijk tussen geslachten en om dit op te vangen binnen een enkele studie zijn onaanvaard hogere aantallen muizen nodig.

24. Bij 2.D, welzijnsaantasting:

- a. Kunt u het gewichtsverlies beter expliciteren: verlies per tijdseenheid (dagen, week of weken) een ook aangeven en wat het per categorie voor ongerief met zich mee brengt?

In de UUO, CCl₄ en bleomycine-geïnduceerde huid modellen is meestal slechts een geringe gewichtsafname (<10%) gedurende 2-3 dagen na inductie te zien. In de bleomycine geïnduceerde long fibrose modellen vindt er een geleidelijke gewichtsafname gedurende de eerste 8 tot 10 dagen plaats, waarna het gewicht zich meestal weer herstelt tot startgewicht. In een beperkt aantal long fibrose dieren zien we soms een gewichtsafname van ca. 20%, In enkele gevallen zal deze gewichtsafname zelfs meer dan 20% bedragen. In dit geval zal het ongerief ingeschat worden als ernstig. De

gewichtsafname mag nooit meer dan 25% bedragen, en de dieren mogen maximaal 3 dagen meer dan 20% gewichtsafname hebben.

- b. Kunt u uitleggen wat de klinische effecten zijn van de ip-injectie met minerale olie?

Bij de minerale olie die we gebruiken zien we geen klinische effecten: lichaamsgewicht blijft constant of stijgt licht. Geen gedragsveranderingen. Bij obductie zijn er geen verklevingen van darm of organen waargenomen. Bij deze obducties is regelmatig een zeer kundig, gecertificeerde dierpatholoog aanwezig.

- c. Er kan sprake zijn van langdurige ip-toediening van farmacologisch actieve stoffen. De DEC meent dat dan het ongerief naar matig zou kunnen gaan. Kunt u dit met de IvD bespreken?

We zijn het met de DEC eens dat langdurige, frequente toediening naar matig ongerief zou kunnen gaan (zie ook antwoord bij vraag 24). In de ongerief tabel staat dat behandeling met therapeutica bij 2x daags behandeling kan oplopen tot matig. Uiteraard wordt dit met de IvD besproken en alles in het werk gesteld om het ongerief zo laag mogelijk te houden.

- d. Indien farmacologisch actieve stoffen worden toegediend kan er sprake zijn van (tot ernstige) bijeffecten. Hoe weet u of die kunnen optreden en hoe neemt u dat op in de welzijnsevaluatie?

Het optreden van bijeffecten is lastig te voorspellen. Er wordt altijd van te voren gevraagd of er al data beschikbaar is waaruit eventuele toxische effecten zijn te voorspellen. Een onverwachte interactie tussen actieve stof en model kan altijd optreden. Daarvoor worden de dieren in de studie zeer regelmatig gemonitord en zijn bij elke proef humane eindpunten gedefinieerd; als deze optreden worden dieren uit experiment genomen en wordt dit vermeld in de welzijnsevaluatie en de registratie. In de welzijnsevaluatie worden ook andere opvallende dingen beschreven. Milde effecten (b.v. verminderde toename in lichaamsgewicht t.o.v. controlegroep) die toegeschreven kunnen worden aan de farmacologische interventie komen dus ook in de welzijnsevaluatie terecht.

- e. Wat is het fenotype van de knock-out-muizen en het bijbehorende ongerief?

In de bijlage hebben we nu uitgelegd dat door het missen van de lipase MDR2 worden galzouten niet geneutraliseerd en hierdoor ontstaat ontsteking van de lever galwegen en uiteindelijk milde leverfibrose. De leverfibrose kan verergerd worden door het dieet aan te passen met hoeveelheid koolhydraten of vetzuren. Leverkanker is een complicatie die pas na een jaar in deze dieren zal optreden. Om dit te voorkomen zullen we de dieren voor een leeftijd van één jaar doden. Hierdoor zal het ongerief niet meer dan matig bedragen.

We hebben een rij met deze MDR2-/- dieren aan de tabel van F toegevoegd.

- f. U noemt een gewichtsverlies van 20% en zelfs meer dan 25%. Geeft u de dieren aangepast voer (bv. proteïne-verrijkt) om dit zo goed mogelijk tegen te gaan? Kun u per tijdeenheid het ongerief aangeven? De DEC is van mening dat er hier sprake kan zijn van ernstig ongerief.

Bij deze experimenten krijgen de dieren als standaard eiwit rijk fokvoer (vanaf één week voor de ziekteinductie) om gewichtsafname zoveel mogelijk in te perken, daarnaast hebben we getest of in glucose geweekte brokken in de kooi tot verbetering zouden leiden. Dit werkte echter niet. Het probleem is waarschijnlijk dat deze dieren kortdurend helemaal niet willen eten.

Dieren met een gewichtsverlies van meer dan 25% worden altijd uit experiment genomen. Zoals verderop bij vraag 24 genoemd wordt, worden muizen met gewichtsverlies van meer dan 20% ook uit experiment genomen als ze meer dan 3 dagen onder de 20% blijven. Dit zal als ernstig ongerief worden aangemerkt. Dit is aangepast in de bijlage.

25. Bij 2.F, Classificatie van ongerief: Wilt u de ongeriefinschattingen aanscherpen? Bijvoorbeeld wanneer er zeer frequent wordt gedoseerd en als er sprake is van >20% gewichtsverlies? Ook bij het cumulatieve ongerief is niet goed uitgelegd waarom veel handelingen met matig ongerief opgeteld toch matig blijven. Daarnaast verwacht de DEC dat bv. negatieve controledieren (zonder fibrose) geen klinische verschijnselen zullen hebben. Bij de beschreven handelingen ontbreekt imaging en de eventuele sedatie met het ongerief. Weet u zeker dat benauwdheid in uw scorelijst slechts een score 1 moet krijgen?

We hebben het scoringsysteem (bij 2.E) aangepast. Voor de benauwdheid hebben we nu een gradatie in de scoring aanpast: Kortademig/hijgen is nu een score 1, en benauwdheid een score 2. Dit betekend dat dieren die zichtbaar benauwd zijn uit het experiment worden genomen.

We hebben de ongeriefinschatting voor de gevallen dat er sprake is van meer dan 20% gewichtsafname aangepast. In deze gevallen zal het ongerief als ernstig worden ingeschat. Wanneer de dieren langer dan 3 dagen meer dan 20% lichaamsafname blijven vertonen worden ze uit het experiment genomen. Voor het zeer frequent doseren hebben we geen aanpassing gedaan. We schatten in dat het ongerief ten gevolge van 2x daags toediening gedurende maximaal 28 dagen niet meer dan matig ongerief zal bedragen. Deze inschatting is gemaakt op: a) goed getrainde en ervaren biotechnici die deze handelingen uitvoeren. b) afwisseling van injectieplaats (bij s.c. en i.p injecties). c) zorgvuldige monitoring van de dieren. Deze manier van werken staat ook beschreven in de werkprocedures (SOPs) die binnen TNO gebruikt worden.

Bij 2F (eerste zin) is nu aangegeven dat controle dieren geen klinische verschijnselen zullen hebben.

Bij de handelingen (sectie 2A) is nu imaging (whole body MRI) toegevoegd. Ter informatie dit is een weinig belastende methode waarbij de dieren ongefixeerd, zonder verdoving worden gemeten.

Uw vraag m.b.t. het cumulatief ongerief. Dit blijft een inschatting. Op basis van voorgaande experimenten verwachten we dat het cumulatief ongerief matig is voor het grootste aantal dieren. Slechts in zeldzame situaties zal er, maximaal 3 dagen, ernstig ongerief zijn. Ook wat betreft de herhaalde toediening verwachten we niet meer dan maximaal ongerief te bereiken: Zoals ook in de richtlijn Inschatten van Cumulatief Ongerief (NCAD, april 2022) staat beschreven is het slecht in te schatten of herhaling zal leiden tot stress, angst en aversie, of dat deze herhaling juist meer als training zal worden ervaren waardoor voor het dier de ingreep juist minder belastend of stressvol wordt. Mechanische schade/ontsteking door de repetitieve toediening zal zoveel mogelijk voorkomen worden door zorgvuldige toedieningsmethoden zoals beschreven in de interne TNO procedures.

26. Bij 2.G, Vervanging: Kunt u iets meer vertellen over de grote stappen die zijn gemaakt wat betreft Vervanging in het voortraject, en wat dit betekent voor uw onderzoek?

Er wordt de laatste jaren meer gebruik gemaakt van complexe in vitro modellen, zoals de organ-on-chip modellen. Binnen het fibrose veld is er de laatste jaren vooral een grote toename aan studies die met precision cut tissue slices wordt uitgevoerd: klinisch (humaan) materiaal, bij voorkeur patiënten materiaal, wordt in plakjes verwerkt en hierop worden compound gebracht¹¹⁻¹³. Uitlees is vaak mbv histologie, chemische analyse en in toenemende mate single cell sequencing.

Door deze stappen is er al veel voorwerk mogelijk waardoor alleen de meest relevante geneesmiddelen ingebracht zullen worden voor de dierstudies.

NTS

27. De titel moet kort en in lekentaal zijn.

Aangepast naar: Onderzoek naar nieuwe medicijnen tegen littekenvorming en ontsteking met behulp van muismodellen.

28. Dit geldt ook voor de trefwoorden.

Fibrose gewijzigd in littekenvorming en inflammation naar ontsteking.

29. In rij 22 en 24 wordt gevraagd naar de handelingen en wat die betekenen voor de dieren. Er wordt (nog) niet gevraagd naar de ongeriefklasse. Kunt u de handelingen en het effect op de dieren wat uitgebreider beschrijven?

Eruit gehaald en aangepast.

30. Er komen voor leken lastige woorden voor in de NTS, zoals "generiek" en "moleculair-biologisch niveau". Kunt u de hele NTS hierop nalopen en de vaktermen vervangen door lekentaal?

Vaktermen aangepast.

10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC): N.v.t.

- Aard expertise
- Deskundigheid expert
- Datum verzoek
- Strekking van het verzoek
- Datum expert advies
- Advies expert

[REDACTED]

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Is het project vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)? Indien van toepassing, licht toe waarom het project niet vergunningplichtig is en of daar discussie over geweest is. *Het project is vergunningplichtig. Het gaat om dierproeven in de zin der wet.*
2. De aanvraag betreft een *nieuwe aanvraag*.
3. Is de DEC competent om hierover te adviseren? *De DEC is competent om hierover te adviseren.*
4. Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom. *Er zijn geen DEC-leden uitgesloten van behandeling van de aanvraag. Wel is een selectie gemaakt uit het totale aantal leden op grond van de wettelijk en ethisch benodigde expertises voor een goede afweging. Deze werkwijze (een extra brede DEC met een selectie van leden per dossier) is afgestemd met de CCD.*

C. Beoordeling (inhoud)

1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.
De aanvraag beschrijft het onderzoek dat nodig is om nieuwe behandelmethoden te vinden voor de behandeling van fibrose. Deze nieuwe behandelmethoden komen niet uit het onderzoeksportfolio van de aanvrager zelf, maar van externe opdrachtgevers als farmaceutische bedrijven die het onderzoek aanvragen als 'proof of concept' waarin effectiviteit onafhankelijk en deskundig aangetoond kan worden ter selectie van een of meerdere kandidaatstoffen voor een volgende fase. De DEC beschouwt deze aanvraag dan ook geschreven vanuit een Contract Research Organisation, hoewel de organisatie zichzelf als een Technology Research Organisation ziet. Maar de DEC neemt daarbij wel goed in ogenschouw dat de aanvrager zeer veel ervaring heeft met de beschreven modellen en de proefopzet die volgens hen noodzakelijk is om potentiële therapeutica te kunnen evalueren op effectiviteit. Deze aanvraag is een vervolg op een eerder (vergunde) aanvraag van gelijke strekking. De DEC heeft veel aanvullende vragen gesteld om de aanvraagspostie te kunnen begrijpen en te kunnen bepalen wat de huidige stand van behandelmethoden voor fibrose is. De beantwoording op deze vragen zijn erg verhelderend geweest. Een aantal verschillende geïnduceerde modellen gericht op een of meerdere aangetaste organen (huid, long, lever, nier) en een spontaan model in een genetisch gemodificeerde muis kunnen effectiviteit laten zien, terwijl er in de latere fasen nog veel stoffen kunnen afvallen voor patiënten. De aanvrager zal niet lukraak een verzoek om een stof te testen gaan uitvoeren. Er vinden overleggen plaats over het voortraject en de aanvrager heeft een eigen database ('transcriptoom') waarin de tot nu toe bekende pathways die betrokken zijn bij fibrose zijn opgenomen. Aan de hand van deze database kan gekeken worden of de beoogde pathways actief zijn in het model en of daarmee te verwachten is dat modulatie van de pathway een effect zou kunnen hebben. Deze databases worden ook gebruikt voor de selectie van het meest geschikte fibrosemodel voor het beantwoorden van specifieke vragen en kunnen helpen om bijvoorbeeld een therapeutisch toedieningsschema te ontwikkelen. Als uit databases blijkt dat de pathway niet geactiveerd is in een bepaald model, heeft dit in het verleden er inderdaad toe geleid dat er besloten is om de proefdierstudies niet uit te voeren. De aanvraag heeft 1 bijlage waarin de verschillende modellen helder zijn beschreven, en op verzoek van de DEC is een voorbeeldcasus gegeven (zie vraag 9 en antwoord). Omdat er in principe 1 model wordt gebruikt passend bij het aangrijpingspunt van de kandidaatstof en de handelingen gestandaardiseerd zijn, is

de strategie voor de DEC voldoende navolgbaar. De IvD heeft aangegeven erop toe te zien dat er zo min mogelijk handelingen zullen worden uitgevoerd, dat humane eindpunten specifiek beschreven zullen worden, en dat het cumulatieve ongerief van de dieren zo laag mogelijk zal worden gehouden, binnen de in de aanvraag geschetste kaders.

2. Signaleer of er mogelijk tegenstrijdige wetgeving is die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan. Het gaat hier om wetgeving die gericht is op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort (bijvoorbeeld Wet dieren en Wet Natuurbescherming).
Er geen sprake van tegenstrijdige wetgeving.

3. Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Nevendoelstellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel.
De aangekruiste doelcategorieën zijn fundamenteel en translationeel of toegepast onderzoek. Dit is juist.

Belangen en waarden

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen. Beoordeel of het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld.
Het directe doel is het aan derden kunnen aanbieden van modellen die geschikt zijn voor onderzoek naar kandidaatstoffen die de ziekte fibrose in een of meerdere organen kan remmen. Het indirecte doel is dat bedrijven gebruik kunnen maken van de expertise van de aanvrager waardoor een onpartijdige evaluatie van hun kandidaatstof(fen) kan plaatsvinden voor verdere selectie in het ontwikkelingsproces van een medicijn. Op basis van bepaalde onafhankelijk aangetoonde effectiviteit kan de klant bepalen of een stof verder ontwikkeld zal worden voor registratie, met het uiteindelijke doel om patiënten met fibrose een therapie te kunnen bieden.
5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden.

Wij geven hierbij een overzicht van de belangen in willekeurige volgorde, nog zonder prioritering of weging.

Morele waarden	Welzijn	Autonomie	Rechtvaardigheid
Belanghebbenden			
<i>Proefdieren (muizen)</i>	<i>Geen pijn Geen stress Gezondheid Geluk</i>	<i>Natuurlijk gedrag Bewegingsvrijheid</i>	<i>Intrinsieke waarde Integriteit Geen instrument zijn</i>
<i>Patiënten en naasten</i>	<i>Geen pijn Gezondheid Geluk</i>	<i>Bewegingsvrijheid</i>	<i>Behandelopties</i>
<i>Vergunninghouder</i>	<i>Economisch belang</i>	<i>Onderzoek kunnen doen</i>	<i>Concurrentiepositie</i>
<i>Klantbedrijven ('sponsor')</i>	<i>Economisch belang Efficiëntie (selectie)</i>	<i>Onderzoek kunnen laten doen: objectieve evaluatie van kandidaatstoffen</i>	<i>Concurrentiepositie</i>
<i>Onderzoekers</i>	<i>Interessant werk</i>	<i>Onderzoek kunnen doen</i>	<i>Kans op succes</i>
<i>Biotechnici</i>	<i>Interessant werk Welzijn, geen stress</i>	<i>Onderzoek (helpen) doen</i>	

Samenleving	Goede economie Geen zieken		
-------------	-------------------------------	--	--

6. Is er aanleiding voor de DEC om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken?

Er zijn geen effecten op het milieu beschreven en de DEC heeft geen reden dit in twijfel te trekken.

Proefopzet en haalbaarheid

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw beoordeling toe.
De kennis en kunde is voldoende gewaarborgd. Het instituut heeft een bewezen 'track record' op dit gebied, en is in staat wetenschappelijk mee te denken met een sponsor. Er is veel aandacht voor vervanging en verfijning van de modellen.

8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw beoordeling toe.
Het project is voldoende helder opgezet om te weten of een kandidaatstof kan aangrijpen op de ziekte via de transcriptoom-database. De aanvrager heeft een voorbeeld gegeven van de aanpak van een onderzoek. De modelkeuze is gebaseerd op het aangrijpingspunt van de stof en het doelorgaan waarin de fibrose zich ontwikkelt bij de patiënt.

Welzijn dieren

9. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. Beoordeel of de keuze hiervoor voldoende wetenschappelijk is onderbouwd en of de aanvrager voldoet aan de in de Wet op de Dierproeven (Wod). voor de desbetreffende categorie genoemde beperkende voorwaarden. Licht uw beoordeling toe.

Er is geen sprake van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren.

- ☐ Bedreigde diersoort(en) (10e, lid 4)
- ☐ Niet-menselijke primaten (10e)
- ☐ Dieren in/uit het wild (10f)
- ☐ Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn)
- ☐ Zwerfdieren (10h)
- ☐ Hergebruik (1e, lid 2)
- ☐ Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
- ☐ Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
- ☐ Dodingsmethode niet volgens bijlage IV-richtlijn (13c, lid 3)

10. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan, omdat het, om redenen van dierenwelzijn of diergezondheid of om wetenschappelijke redenen, noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe.
De dieren worden gehuisvest en verzorgd volgens de opgenomen eisen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU.

11. Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier

realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe.

Het cumulatieve ongerief is realistisch ingeschat. Het is opgebouwd uit het ongerief veroorzaakt door klinische verschijnselen van de ziekte (geïnduceerd of spontaan) en de uit te voeren handelingen met inachtnaam van frequentie en duur. Ook zou een te onderzoeken stof bijwerkingen kunnen veroorzaken, hoewel de kans erg klein wordt ingeschat. De IvD heeft toelicht dat de ongeriefinschatting is afgestemd met haar en gebaseerd is op de observaties uit eerdere experimenten. De ongeriefinschatting is bijgesteld na vragen van de DEC hierover (bijv. vraag 24).

12. Het uitvoeren van dierproeven zal naast het ongerief vaak gepaard gaan met aantasting van de integriteit van het dier. Beschrijf op welke wijze er sprake is van aantasting van integriteit.

De integriteit van de proefdieren in aangetast in die zin dat zij als proefdieren worden gehouden en gebruikt. Daarnaast wordt een ziekte opgewekt die pijn en stress zal veroorzaken en worden dieren blootgesteld aan voor hen niet noodzakelijke invasieve handelingen als het toedienen van stoffen en het afnemen van bloed. Uiteindelijk worden de dieren gedood om hun weefsels te kunnen uitnemen voor verder onderzoek.

13. Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. Licht uw beoordeling toe.

De humane eindpunten zijn goed gedefinieerd en er is een scoresysteem voor wanneer meerdere criteria kunnen bijdragen aan het bereiken van het humane eindpunt. De IvD heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat bij het de bleomycine longfibrosemodellen er gedurende maximaal 3 dagen meer dan 20% gewichtsafname kan optreden, maar die afname nooit meer mag zijn dan 25%. Dit wordt geclassificeerd als ernstig ongerief.

3V's

14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Licht uw beoordeling toe.

De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er in deze fase van het onderzoek geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Bij de sponsor heeft al wel onderzoek plaatsgevonden met alternatieve methoden, maar het nabootsen van littekenvorming in gekweekte cellen geeft geen compleet beeld waarop de doeltreffendheid van nieuw geteste medicijnen kunnen worden beoordeeld. Het afweersysteem is een ingewikkeld netwerk waarin diverse cellen en omgevingsfactoren uit heel het lichaam betrokken zijn. Om dit alles in gekweekte cellen na te bootsen, is nog niet mogelijk. De aanvrager heeft toegelicht hoe dit voortraject de laatste jaren verbeterd is door Vervanging bij vraag 25 van de DEC.

15. Beoordeel of het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en of er een heldere strategie is om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Licht uw beoordeling toe.

Het aantal te gebruiken dieren is voor zover mogelijk realistisch ingeschat, mede op basis van ervaring met de voorloper van dit project, maar wordt pas volledig berekend met gegevens van de sponsor. Zo zal voor elke studie de meest recente gegevens worden gebruikt om de optimale groepsgrootte te bepalen. De IvD zal erop toezien dat met een optimale hoeveelheid dieren de voorgelegde onderzoeksvraag wordt beantwoord.

16. Beoordeel of het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project zodanig is opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Licht uw beoordeling toe.

De dierproeven zijn verfijnd door gebruik te maken van het meest optimale diermodel. Littekenvorming is een algemeen proces dat in vrijwel alle diersoorten op dezelfde manier plaatsvindt, en er kunnen knaagdieren worden gebruikt omdat hiervan heel veel bekend is van processen op het kleinste mogelijke functionele niveau en het hierin mogelijk is in een betrekkelijk korte tijd (enkele weken) het littekenvormingsproces kunnen bestuderen. Binnen de gebruikte diermodellen wordt continue geëvalueerd of verfijning mogelijk is, zodat het ongerief van de dieren zoveel mogelijk beperkt wordt.

17. Beoordeel, indien het wettelijk vereist onderzoek betreft, of voldoende aannemelijk is gemaakt dat er geen duplicatie plaats zal vinden en of de aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om tijdens de uitvoering van het project te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt. Licht uw beoordeling toe.
Er is geen sprake van wettelijk verplicht onderzoek

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd.
Er zullen zo veel mogelijk dieren van beide geslachten worden gebruikt voor het hele project, maar per model zal gebruik gemaakt worden van één geslacht, omdat dit geslacht gevoeliger is voor het ontwikkelen van die specifieke fibrose. Dit is voldoende toegelicht, ook wat het alternatief zou zijn: bij gebruik van beide geslachten in een model zal dat eerst volledig moeten worden gevalideerd. De aanvrager realiseert zich dat de keuze van 1 geslacht per model als consequentie een fokoverschot kan hebben, maar meldt ook dat juist een externe leverancier mogelijkheden zal hebben om dieren van het overgebleven geslacht voor een andere klant te benutten. De DEC vindt de uitleg acceptabel.

19. Geef aan of dieren gedood worden in het kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef). Indien dieren gedood worden, geef aan of en waarom dit noodzakelijk is voor het behalen van de doelstellingen van het project. Indien dieren gedood worden, geef aan of er een voor de diersoort passende dodingsmethode gebruikt wordt die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Zo niet, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. Indien van toepassing, geeft ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd.
De dieren worden na afloop gedood met een voor de diersoort passende dodingsmethode om organen uit te kunnen nemen voor verdere analyse.

20. Indien dieren worden gedood om niet-wetenschappelijke redenen, is herplaatsing of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is.
N.v.t.

NTS

21. Is de niet-technische samenvatting een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd? *De NTS is een evenwichtige weergave van het project en is begrijpelijk geformuleerd. De DEC heeft de aanvrager geattendeerd op het gebruik van jargon, waarna de NTS is aangepast.*

D. Ethische afweging

1. Benoem de centrale morele vraag.
De centrale morele vraag is: weegt het belang van het kunnen evalueren van

kandidaatstoffen op effectiviteit voor behandeling van fibrose in humane patiënten in opdracht van klantbedrijven op tegen het belang van 5.975 muizen met matig en 25 muizen met ernstig ongerief?

2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoetgekomen wordt of die juist in het geding zijn, ten opzichte van elkaar af. Om dit proces te vergemakkelijken, kunt u de belangrijkste belanghebbenden en de belangrijkste waarden die in het geding zijn waarderen. U kunt dit verwoorden in termen van gering, matig of veel/ernstig voordeel of nadeel. Geef aan waarom de DEC bevordering van waarden (baten) voor de ene belanghebbende prevaleert boven de aantasting van waarden (kosten) voor de andere belanghebbende.

De DEC vindt de belangen van de proefdieren zwaarwegend, omdat zij groot in aantal zijn en bijna allemaal matig ongerief ondergaan en gedood worden. Daartegenover staat het eveneens zwaarwegende belang van fibrosepatiënten en hun naasten. De diverse vormen van fibrose kunnen een ernstig ziektebeeld laten zien, waarvoor op dit moment nog geen goed werkende therapie voorhanden is. Dit gaat samen met het belang van de hele samenleving om een gezonde bevolking te hebben.

De overige belangen, zoals commerciële belangen van het bedrijf en de klantbedrijven en het belang van medewerkers om onderzoek te kunnen doen, valt hierbij in het niet. Ook heeft de DEC het passend gevonden het belang van biotechnici te benoemen, die, zeker bij matig en ernstig ongerief, last kunnen krijgen van werkstress. Daar staat tegenover dat zij hun funtie willen uitoefenen. Echter, zoals gezegd, al deze belangen vallen in het niet bij de zwaarwegende belangen van de proefdieren en de patiënten.

3. Beantwoord de centrale morele vraag. Maak voor het beantwoorden van deze vraag gebruik van bovenstaande afweging van morele waarden. Maak daarnaast gebruik van de volgende moreel relevante feiten: belang onderzoek (C4), kennis en kunde van betrokkenen (C7), haalbaarheid doelstellingen (C8), categorieën en herkomst dieren (C9), 3V's (C14-C18), ongerief (C10-13 en C19) en relevante wet en regelgeving (C2). Onderbouw hoe al deze elementen zijn meegewogen bij de beantwoording van de centrale morele vraag, zodanig dat het navolgbaar is zonder gedetailleerde kennis te hebben van het projectvoorstel. *De DEC vindt het belangrijk onderzoek, omdat de aanvrager de expertise heeft en daarmee de industrie een onafhankelijke evaluatie kan bieden van kandidaatstoffen voor verdere selectie om uiteindelijk fibrosepatiënten te kunnen helpen. Met de beschreven strategie is het onderzoek per aanvraag haalbaar en valt het onder translationeel onderzoek. De te gebruiken dieren komen van erkende fokkers, men heeft de keuze van het geslacht voldoende onderbouwd en zijn voor zover mogelijk de 3V's voldoende toegepast. De centrale morele vraag gaat dus uiteindelijk om de afweging tussen het belang van de proefdieren en dat van de patiënten (en de samenleving). Omdat het om een groep ernstige ziekten gaat waarvoor nog nauwelijks behandelopties bestaan, vindt de DEC het gebruik van de dieren met matig en soms ernstig ongerief gerechtvaardigd.*

E. Advies

1. Advies aan de CCD

- ☐ De DEC adviseert de vergunning te verlenen.
- ☒ De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
 - ☒ Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.
 - ☐ Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist
 - ☐ Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te

weten...

- ☐ De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
 - ☐ De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen:...
 - ☐ De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...
 - ☐ De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...
- 2. Het uitgebrachte advies kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt in de DEC. Indien gebaseerd op een meerderheidsstandpunt, specificeer het minderheidsstandpunt op het niveau van verschillende belanghebbenden en de waarden die in het geding zijn. *Het advies is unaniem tot stand gekomen.*
- 3. Omschrijf de knelpunten/dilemma's die naar voren zijn gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies zowel binnen als buiten de context van het project.
De DEC heeft gesproken (en vragen gesteld) over het gegeven dat minder dan 10% van de kandidaatstoffen de klinische fase haalt. Dit is een dilemma, omdat dit de kans verlaagt dat er daadwerkelijk een therapiestof wordt gevonden die de patiënt gaat helpen. De aanvrager heeft echter duidelijk kunnen maken dat niettemin de opgedane kennis van groot nut kan zijn voor het vinden van een therapie voor de patiënt (zie vraag 2 van de DEC en het antwoord daarop).