

Inventaris Wob-verzoek W23-03										
nr.	document NTS 202215947	wordt verstrekt				weigeringsgronden				
		reeds openbaar	niet	geheel	deels	5.1, lid 1c	5.1, lid 2e	5.1, lid 2f	5.1, lid 2h	5.2, lid 1
1	Aanvraag projectvergunning, d.d. 17-03-2022				x		x		x	
2	Projectvoorstel				x				x	
3	Bijlage dierproeven_1 bij aanvraag				x				x	
4	Bijlage dierproeven_2 bij aanvraag				x				x	
5	NTS bij aanvraag			x						
6	E-mail aan DEC om advies projectvergunning, d.d. 25-03-2022				x				x	
7	DEC-advies, d.d. 04-08-2022				x		x		x	
8	Aanvraag na DEC advies				x		x		x	
9	Projectvoorstel na DEC advies				x				x	
10	Bijlage dierproeven_1 na DEC advies				x				x	
11	Bijlage dierproeven_2 na DEC advies				x				x	
12	NTS na DEC advies			x						
13	Adviesnota aan CCD met opmerkingen, d.d. 05-08-2022				x		x		x	x
14	Adviesnota aan CCD, d.d. 05-08-2022				x		x		x	x
15	E-mail vragen CCD aan vergunninghouder over aanvraag, d.d. 05-08-2022				x		x		x	
16	NTS Aangepast na vragen CCD 1									
17	E-mail vragen CCD aan vergunninghouder over aanvraag, d.d. 15-08-2022				x		x		x	
18	Reactie na vragen CCD				x		x		x	
19	Projectvoorstel na vragen CCD				x				x	
20	Bijlage dierproeven 1 na vragen CCD				x		x		x	
21	Bijlage dierproeven 2 na vragen CCD				x		x		x	
22	E-mail n.a.v. e-mail DEC over vragen aan vergunninghouder, d.d. 29-08-2022.				x		x		x	
23	E-mail, intern beraad, d.d. 30-08-2022				x		x		x	
24	E-mail, intern beraad, d.d. 30-08-2022				x		x		x	
25	E-mail, intern beraad, d.d. 01-09-2022				x		x		x	
26	E-mail, intern beraad, d.d. 02-09-2022				x		x		x	
27	E-mail, intern beraad, d.d. 02-09-2022				x		x		x	
28	E-mail, intern beraad, d.d. 08-09-2022				x		x		x	
29	AdviesNotaCCD, d.d. 09-09-2022				x		x		x	x
30	NTS definitief			x			x		x	

31	Beschikking, d.d. 09-09-2022				x		x		x	
----	------------------------------	--	--	--	---	--	---	--	---	--



Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

- U bent van plan om één of meerdere dierproeven uit te voeren.
- Met dit formulier vraagt u een vergunning aan voor het project dat u wilt uitvoeren. Of u geeft aan wat u in het vergunde project wilt wijzigen.
- Meer informatie over de voorwaarden vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl, of in de toelichting op de website.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1

Gegevens aanvrager

1.1 Heeft u een deelnemernummer van de NVWA?
Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.

Ja > Vul uw deelnemernummer in 5.1 lid2h

Nee > U kunt geen aanvraag doen

1.2 Wat voor aanvraag doet u?

Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 1.3

Wijziging > Vul hiernaast het AVD nummer van uw vergunde project in en ga verder met vraag 2.1

Melding > Vul hiernaast het AVD nummer van uw vergunde project in en ga verder met vraag 2.2

1.3 Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.

Naam instelling of organisatie	5.1 lid2h		
Titel, voorletters en achternaam van de portefeuillehouder	Titel	Voorletters	Achternaam
	5.1 lid2e		
E-mailadres contactpersoon	5.1 lid2h		
Titel, voorletters en achternaam van de diens gemachtigde (indien van toepassing)	Titel	Voorletters	Achternaam
	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw		
E-mailadres gemachtigde			

Vul de gegevens van het postadres in.

Straat en huisnummer	5.1 lid2h		
Postcode en plaats	5.1 lid2h		
Postbus, postcode en plaats	5.1 lid2h		

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters	5.1 lid2e	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.
Functie	5.1 lid2e	
Afdeling	5.1 lid2h	

	Telefoonnummer	5.1 lid2e	
	E-mailadres	5.1 lid2e	
1.5	(Indien van toepassing) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	5.1 lid2e <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
	Functie	5.1 lid2e	
	Afdeling	5.1 lid2h	
	Telefoonnummer	5.1 lid2e	
	E-mailadres	5.1 lid2e	
1.6	(Indien van toepassing) Vul hier de gegevens in van de persoon aan wie de portefeuillehouder de verantwoordelijkheid inzake de algemene uitvoering van het project en de overeenstemming daarvan met de projectvergunning heeft gedelegeerd.	(Titel) Naam en voorletters	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
	Functie		
	Afdeling		
	Telefoonnummer		
	E-mailadres		
1.7	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de Instantie voor Dierenwelzijn	Telefoonnummer	5.1 lid2h
	E-mailadres	5.1 lid2h	
1.8	Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?	<input type="checkbox"/> Ja > Stuur dan het ingevulde formulier Melding Machtiging mee met deze aanvraag	
		<input checked="" type="checkbox"/> Nee	

2 Over uw aanvraag

2.1	Gaat uw aanvraag over een wijziging op een vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn?	<input checked="" type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3
		<input type="checkbox"/> Ja > Geef hier onder kort de wijziging en de onderbouwing daarvan weer. Geef in de originele formulieren (niet-technische samenvatting, projectvoorstel en bijlage dierproeven) duidelijk aan (bij voorbeeld in een andere kleur) waar de projectaanvraag wijzigt. Ga daarna verder met vraag 6.
2.2	Gaat uw aanvraag over een melding op een vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn?	<input checked="" type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3
		<input type="checkbox"/> Ja > Geef hier onder weer wat deze melding inhoudt en ga verder met vraag 6

3 Over uw project

3.1	Wat is de geplande start- en einddatum van het project?	Startdatum	01 - 06 - 2022
		Einddatum (t/m)	31 - 05 - 2027
3.2	Wat is de titel van het project?	Nieuwe (combinatie)therapieën tegen infecties door multiresistente en moeilijk behandelbare bacteriën 2	
3.3	Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Nieuwe (combinatie)therapieën tegen infecties door multiresistente en moeilijk behandelbare bacteriën 2	
3.4		Naam DEC	5.1 lid2h
		Postadres	

Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) van voorkeur?

E-mailadres

5.1 lid2h

4 Factuurgegevens

4.1 (indien factuuradres afwijkt van de gegevens uit vraag 1.3) Vul de gegevens van het factuuradres in.

Naam:	Afdeling:	
Straat:		Huisnummer:
Postcode:	Plaats:	
Postbus:	Postcode:	Plaats:
E-mail:		

4.2 (optioneel) Vul hier het ordernummer van de instelling in.

Ordernummer:

5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

- Projectvoorstel Aantal bijlage(n) dierproeven 2
- Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen, indien van toepassing

- Melding Machtiging
-

6 Ondertekening

6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD en per post naar de Centrale Commissie Dierproeven (voor adresgegevens zie website)

Ondertekening door de portefeuillehouder namens de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.8). De ondergetekende verklaart:

- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
- dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
- dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel C van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
- dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
- dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam	5.1 lid2e	
Functie	Gemandateerd vergunninghouder	
Plaats	5.1 lid2h	5.1 lid2e
Datum	17 - 03	
Handtekening		



Formulier

Projectvoorstel dierproeven

- Dit formulier gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
- Bij dit formulier hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
- Meer informatie vindt u in de 'Toelichting op de te gebruiken formulieren voor de aanvraag van een projectvergunning' op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in. 5.1 lid2h
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in. 5.1 lid2h
- 1.3 Vul de titel van het project in. Nieuwe (combinatie)therapieën tegen infecties door multiresistente en moeilijk behandelbare bacteriën 2

2 Categorie van het project

- 2.1 In welke categorie valt het project?
- U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.*
- Fundamenteel onderzoek
- Translationeel of toegepast onderzoek
- Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
- Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid of het welzijn van mens of dier
- Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
- Hoger onderwijs of opleiding
- Forensisch onderzoek
- Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

Licht het project toe. Beschrijf de aanleiding, de achtergrond en de context. Besteed aandacht aan de bij vraag 2.1 aangekruiste categorieën.

Het probleem

Antibiotica zijn essentieel bij de behandeling van bacteriële infecties. Echter, dergelijke behandelingen zijn niet in alle gevallen effectief waardoor infecties toch nog gecompliceerd of zelfs fataal kunnen verlopen. Bijkomend probleem is de toegenomen **resistentie** tegen verschillende antibiotica.

In 2017 heeft de Wereldgezondheidsorganisatie een lijst met zogenaamde '**priority pathogens for R&D of new antibiotics**' gepubliceerd. Deze lijst geeft aan voor welke bacteriële infecties nieuwe behandelingen en/of nieuwe antibiotica het meest urgent zijn.

Priority 1 – critical:

- *Acinetobacter baumannii*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Enterobacterales*, waaronder *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*

Priority 2 – high:

- *Enterococcus faecium*
- *Staphylococcus aureus*
- *Helicobacter pylori*
- *Campylobacter* spp
- *Salmonellae*
- *Neisseria gonorrhoeae*

Priority 3 – medium:

- *Streptococcus pneumoniae*
- *Haemophilus influenzae*
- *Shigella* spp

Klinisch gezien worden *K. pneumoniae* en *E. coli* als meest voorkomende veroorzakers van infecties gezien en zijn dus klinisch ook zeer relevant. Dit soort organismen kunnen verschillende soorten infecties geven. Maar meest voorkomend zijn urineweginfecties al dan niet gepaard gaand met bacteremiën. De *Acinetobacters* en *Pseudomonas* zijn vaak betrokken bij ziekenhuisinfecties. Patiënten worden eerst gekoloniseerd door deze organismen en kunnen vervolgens overgaan tot daadwerkelijke infecties. Het is dan ook nodig nieuwe strategieën te ontwikkelen tegen deze en andere organismen op deze lijst van priority pathogens door de toename in resistentie tegen bestaande middelen.

Veel van de antibiotica die we vandaag de dag gebruiken zijn zo'n 60 jaar geleden geïntroduceerd, in een tijd waarin we nog geen gebruik maakten van de **PK/PD** principes om de effectieve dosering vast te stellen. (Meer uitleg over deze PK/PD principes volgt hieronder.) Vandaar dat deze bestaande ("oude"), maar ook nieuwe middelen bestudeerd moeten worden om op grond van de **in vivo effectiviteit** en hun PK/PD relatie nauwkeurig de dosering vast te stellen.

Behalve deze aspecten zijn ook andere aspecten relevant voor de effectiviteit, zoals de bereikbaarheid van deze middelen op verschillende plekken in het lichaam. Bacteriën kunnen zich immers bevinden op een plek in het lichaam waar ze met systemisch toegediende medicatie niet bereikbaar zijn, iets dat ook bij overigens gezonde mensen kan leiden tot een ernstige afloop. Verder hebben tegenwoordig veel patiënten een verminderde afweer omdat ze behandeld worden met medicatie die immunosuppressief werkt (bij indicaties zoals auto-immuunziekten, orgaantransplantatie, kanker) waardoor het immuunsysteem niet voldoende bijdraagt aan de eliminatie van bacteriën. Ook zijn veel bacteriën intrinsiek resistent of resistent geworden tegen antibiotica (selectiedruk) waardoor er een dringende behoefte is aan nieuwe behandelingen. Deze problematiek is niet zozeer het gevolg van medisch handelen in Nederland (terughouden antibioticabeleid en microbiologische monitoring in ziekenhuizen), maar neemt wel toe door royaler medisch gebruik van antibiotica in het buitenland (vaak zonder dat moeite wordt gedaan om verdere verspreiding van resistentie te voorkomen) en is af en toe ook afkomstig uit de dierhouderij. In een in 2016 verschenen rapport in opdracht van de Engelse regering was de eindconclusie dat infecties door bacteriën die resistent zijn tegen bestaande antibiotica binnen enkele decennia de **grootste bedreiging voor de gezondheid** vormen.

Alternatieven voor de huidige gebruikte antibiotica zijn dringend nodig om bacteriële infecties ook in de toekomst te kunnen blijven behandelen. Een alternatief kan zijn het optimaliseren van de doseringsschema's van bestaande middelen ter verbetering van de effectiviteit en ter voorkoming van resistentieselectie tijdens therapie, en het ontwikkelen van doseringsschema's voor nieuwe (combinaties van) middelen (antibiotica en non-antibiotica).

Farmacokinetiek (PK) en farmacodynamiek (PD)

De **optimale dosering** van antibiotica is van belang voor de patiënt, enerzijds voor een effectieve behandeling, en anderzijds ter voorkoming van resistentie van het pathogeen en de normaal aanwezige microflora in en op het lichaam. De optimale dosering van een antibioticum om het gewenste effect te bereiken is afhankelijk van een aantal factoren, waarvan de belangrijkste zijn:

1. De activiteit van het antibioticum. Voor een bacterie wordt deze uitgedrukt in de **MRC (minimaal remmende concentratie)**, in het Engels MIC, minimum inhibitory concentration). Deze wordt eerst *in vitro* bepaald.
2. De wijze waarop het antibioticum de bacterie doodt. Dit kan heel langzaam zijn maar ook heel snel en verschilt per bacteriesoort en, in mindere mate, per bacteriestam (**farmacodynamiek, PD**).
3. De concentraties die bereikt worden in de patiënt (de 'exposure') over de tijd – de concentraties vertonen fluctuaties door de dosering en de eliminatie van het middel (**farmacokinetiek, PK**).
4. De concentratie-effect (exposure-respons) relatie over de tijd, waarbij als effectmaat de mate van doding ('killing') van bacteriën wordt gebruikt ten opzichte van de concentratie van het middel in de patiënt, is afhankelijk van ieder van de drie eerste factoren (**PK/PD**). De PK/PD index is een maat die deze relatie het best omschrijft. Deze geeft inzicht in hoe het optimale doseringsschema eruit ziet: is de totale dagdosis het belangrijkste, of de hoogste concentratie die bereikt kan worden, of moet juist heel vaak gedoseerd worden? Tevens kan de waarde van de PK/PD index bepaald worden die minimaal bereikt dient te worden voor een optimaal effect.

Deze vier factoren samen bepalen uiteindelijk welk doseringsschema voor een antibioticum de hoogste kans op slagen biedt. Door de **PK/PD index** en de waarde ervan te vertalen naar de patiënt kan het optimale doseringsschema in de patiënt worden bepaald. De interactie tussen de genoemde factoren is echter groot en met name het hierboven genoemde punt 4 – de exposure-respons relatie over de tijd, PK/PD – is niet goed voorspelbaar. Hiertoe zijn dierproeven noodzakelijk en de uitkomsten hiervan worden gebruikt om te komen tot aanbevolen doseringsschema's (hoogte, frequentie, duur). Uit de uitkomst van deze proeven kan vastgesteld worden wat de optimale dosering van een middel is en welke bacteriesoorten klinisch gevoelig zijn voor het middel. Dit laatste is uiteraard afhankelijk van de gebruikte dosering: met hogere doseringen kunnen relatief wat minder gevoelige bacteriën vaak nog goed bestreden worden, mits maar duidelijk is hoe precies de exposure-respons relatie in de tijd ligt. Dit wordt samenvattend de 'pharmacodynamic target' genoemd. Dit is de doel-exposure van het antibioticum ten opzichte van de MRC van de bacterie.

Voor deze proefdierstudies past onze afdeling twee beproefde en uitgebreid in de literatuur beschreven infectiemodellen van weefsel- en longinfectie toe om de effectiviteit van (combinaties van) antibiotica en/of non-antibiotica tegen multiresistente en moeilijk behandelbare bacteriën te onderzoeken:

- **Dijspiermodel**
- **Longmodel**

Deze modellen worden aanbevolen in de richtlijnen van het European Medicines Agency (EMA). Het dijspiermodel is een veelgebruikt en zeer gestandaardiseerd model dat gebruikt wordt om infecties in de weke delen te simuleren. Het longmodel wordt ook veel toegepast, omdat de penetratie van middelen in de longen kan afwijken van die in het bloed, waardoor middelen bij longinfecties verminderd effectief kunnen zijn.

Wat is er al gedaan?

Dit project is een vervolg op projectvergunning AVD **5.1 lid2h** "Nieuwe (combinatie)therapieën tegen infecties door multiresistente en moeilijk behandelbare bacteriën". In deze projectvergunning is de farmacokinetiek en -dynamiek van 10 bestaande ("oude") middelen als mono-behandeling, van 4 combinaties van deze middelen, en van 1 nieuw middel en verschillende analogen daarvan in het dijspier- en/of het longmodel onderzocht. Analyse van de data van de bestaande middelen loopt momenteel. De data-analyse van het nieuwe middel is afgerond, de PK/PD index en target zijn bepaald, en deze waarden worden gebruikt als input voor klinische studies die gepland staan. De analogen van dit nieuwe middel bleken soms meer, soms minder succesvol. Door dit te relateren aan onder andere de chemische structuur, verschillende *in vitro* karakteristieken (zoals MRC, maar ook hemolytische activiteit) en *in vivo* tolerantie (onderzoek uitgevoerd door een projectpartner) zijn een beperkt aantal analogen uitgezocht met de meest gunstige eigenschappen geselecteerd voor verder onderzoek.

Het voorgestelde onderzoek

In dit project zal de effectiviteit van bestaande middelen, van nieuwe middelen (zowel antibiotica als non-antibiotica) en combinaties daarvan, worden onderzocht. Het is niet precies voorspelbaar welke middelen in de komende 5 jaar onderzocht zullen gaan worden. Voor nieuwe middelen is dit mede afhankelijk van de ontwikkelingsprogramma's van derden. Voor oude middelen en/of non-antibiotica zal eerst moeten blijken of er genoeg potentie is van combinaties *in vitro* om aannemelijk te maken dat zij *in vivo* werkzaam zullen zijn.

Deze (combinaties van) middelen zullen volgens de gestandaardiseerde aanpak van het PK/PD onderzoek worden bestudeerd. Dit zullen **bestaande middelen** zijn waarvan geen of zeer beperkte PK/PD data zijn, maar ook **nieuwe middelen** en **non-antibiotica**. Non-antibiotica omvatten bijvoorbeeld middelen die resistentiemechanismen neutraliseren (maar op zichzelf niet antimicrobieel werken) en middelen die niet geregistreerd zijn als antimicrobieel maar mogelijk wel een antibiotisch effect bezitten.

Context

De data die genereerd wordt in deze studies vormt een waardevol deel van de productinformatie van nieuwe (combinaties van) antibiotica en/of non-antibiotica te gebruiken bij bacteriële infecties en geeft een essentieel inzicht bij welke concentraties *in vivo* een middel effectief is. Op basis van deze resultaten kan besloten worden of doorgegaan wordt met klinische studies en/of de optimale dosering in patiënten met infecties worden vastgesteld.

De gegenereerde data zijn ook essentieel om het zogenaamde **klinische breekpunt** te kunnen vaststellen. Het klinisch breekpunt is de grenswaarde van de MRC die medisch microbiologische laboratoria gebruiken om aan te geven of een bacterie gevoelig of resistent is voor een middel. De behandelende arts gebruikt dit om te beoordelen of een middel juist wel of juist niet aan een patiënt kan of moet worden voorgeschreven.

3.2 Doel

3.2.1 Beschrijf het directe en het uiteindelijke doel van het project. Beschrijf de bijdrage van het behalen van het directe doel aan het uiteindelijke doel.

- Indien het directe doel bestaat uit verschillende subdoelstellingen, benoem deze dan hier.

De doelen van dit project zijn:

- A. Het aanpassen van het bestaande dijspier- en longmodel voor nog niet eerder door onze onderzoeksgroep gebruikte klinisch relevante bacteriestammen. Voor een aantal species waarmee onze onderzoeksgroep veel ervaring heeft, zoals *Escherichia coli* en *Klebsiella pneumoniae*, is bekend dat een standaard inoculum leidt tot een reproduceerbare infectie. Voor een aantal andere species, zoals *Pseudomonas aeruginosa* en *Acinetobacter baumannii*, is bekend dat het geschikte inoculum voor een reproduceerbare infectie wel sterk afhankelijk is van de stam waarmee men infecteert. Voor dit soort stammen is een voorafgaande inoculum-finding studie belangrijk.
- B. Het bestuderen van de exposure-response relatie (PK/PD) van (combinaties van) middelen (bestaande en/of nieuwe en/of non-antibiotica) bij multiresistente en moeilijk behandelbare bacteriële infecties.

Het **uiteindelijke doel** is:

Inzicht in de exposure-response relaties van deze (combinaties van) middelen zal uiteindelijk leiden tot verbetering en optimalisering van de behandeling van multiresistente en moeilijk behandelbare bacteriële infecties.

Welke middelen we precies zullen gaan onderzoeken in het dijspier- en in het longmodel is nog niet bekend, omdat de *in vitro* studies met verschillende (combinaties van) middelen momenteel volop gaande zijn. Hierbij wordt vaak **5.1 lid1c** gebruikt. Het is zeer waarschijnlijk dat we dit middel dan ook in onze proefdiermodellen gaan onderzoeken. Andere middelen of combinaties zijn op dit moment nog niet bekend. Voor het onderzoek worden middelen geselecteerd waarvan nog niet (volledig) bekend is, op basis van farmacokinetiek en -dynamiek, welke blootstelling er in patiënten minimaal nodig is voor een optimale antibiotische behandeling, waarbij ook het ontstaan van bacteriële resistentie wordt meegenomen.

In de komende 5 jaar verwachten we in beide modellen 10 middelen als mono-behandeling en 5 combinaties van middelen (2 antibiotica gecombineerd of een antibioticum gecombineerd met remmers van beta-lactamase enzymen) te onderzoeken, voor klinisch relevante bacteriële infecties. We verwachten dat van deze middelen er 3 succesvol zullen zijn in onze dierproeven. Deze potentieel succesvolle (combinaties van) middelen kunnen vervolgens onderzocht worden in klinische studies.

3.2.2 Hoe wordt de haalbaarheid van het directe doel gewaarborgd?

Onze afdeling en onderzoeksgroep hebben jarenlange ervaring met dit soort onderzoek aan multiresistente en moeilijk behandelbare bacteriën en onderzoek met muizen, zodat haalbaarheid zeer waarschijnlijk is. Er is reeds uitgebreide ervaring binnen de onderzoeksgroep met de voorgestelde proeven en de benodigde faciliteiten en kennis om de doelstellingen te bereiken zijn aanwezig, zoals kennis van basale en moleculaire microbiologie, immunologie, en pathologie. Technieken zoals kweek van bacteriën, bepaling van antibioticumspiegels, etc. zijn allen operationeel en ook gestandaardiseerd. Daarnaast is in de faciliteit waar de proeven zullen worden uitgevoerd alle benodigde kennis over proefdieren aanwezig en ook de voorzieningen voor biologische veiligheid. Onze afdeling opereert binnen zeer sterke nationale en internationale samenwerkingsverbanden. Het voorgestelde onderzoek is wetenschappelijk getoetst binnen het kader van de projecten.

3.2.3 Is voor de uitvoering van dit project andere wet- en regelgeving van toepassing die een invloed zou kunnen hebben op het welzijn van de dieren en/of de haalbaarheid van het directe doel?

Nee

Ja > Geef aan welke wet-en regelgeving van toepassing is en beschrijf de effecten daarvan op het welzijn van de dieren en de haalbaarheid van het project.

3.3 Belang

3.3.1 Beschrijf het wetenschappelijk en/of maatschappelijk belang van de hierboven beschreven doelen.

Sociale relevantie

Door de wereldwijd toenemende mate van resistentie van bacteriën is behandeling van patiënten met infecties veroorzaakt door deze multiresistente bacteriën niet altijd meer goed mogelijk, met soms zelfs overlijden tot gevolg. Vanwege deze problematiek wordt er gezocht naar wegen om enerzijds behandeling van dergelijke multiresistente en moeilijk behandelbare infecties toch mogelijk te maken en om anderzijds resistentievorming te voorkomen of te omzeilen. Door het bestuderen van de exposure-respons relatie van (combinaties van) middelen in het *in vivo* dijspier- en/of longinfectiemodel kan het beste doseringsschema van (combinaties van) middelen voor latere klinische studies in patiënten met multiresistente en moeilijk behandelbare infecties bepaald worden. Zo hopen wij de behandeling van infecties door multiresistente en moeilijk behandelbare bacteriën te kunnen verbeteren en te optimaliseren.

Wetenschappelijke relevantie

Er zijn wel methoden ontwikkeld om de PK/PD relaties van antimicrobiële middelen te bestuderen, maar methoden om het *in vivo* effect van non-antibiotica en combinaties te bepalen zijn niet beschikbaar. In dit project worden deze methoden ontwikkeld en verder geoptimaliseerd. Door studies uit te voeren in zowel het dijspier- als het longmodel kunnen we bovendien de doseringsschema's bij verschillende soorten infecties onderzoeken. Door het ontwikkelen van computermodellen op basis van de resultaten van de experimenten wordt getracht het effect van de (combinaties van) middelen steeds beter te kunnen voorspellen.

3.3.2 Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden wat hun belang is.

De belanghebbenden bij de uitvoering van dit project:

- De proefdieren die gebruikt moeten worden om de projectdoelen te behalen. Zij hebben er belang bij de infecties en behandelingen niet te ondergaan, zodat hun welzijn niet wordt aangetast.
- Onze afdeling en onze onderzoeksgroep. Zij zijn geïnteresseerd in onderzoek naar de effectiviteit van bestaande en nieuwe middelen voor de behandeling van multiresistente en moeilijk behandelbare bacteriële infecties, en voeren de studies uit.
- Patiënten met multiresistente en moeilijk behandelbare infecties. Wanneer doseringsschema's van bestaande en nieuwe middelen zijn geoptimaliseerd, kunnen zij beter (effectiever) behandeld worden.

- Samenwerkende partners (industrie, academische partners). Het kan zijn dat partners middelen leveren om onderzocht te worden, en zij leveren data over bijvoorbeeld toxiciteit, tolerantie, en/of *in vitro*. Zij zijn geïnteresseerd in de effectiviteit van deze middelen tegen multiresistente en moeilijk behandelbare infecties.

3.4 Strategie

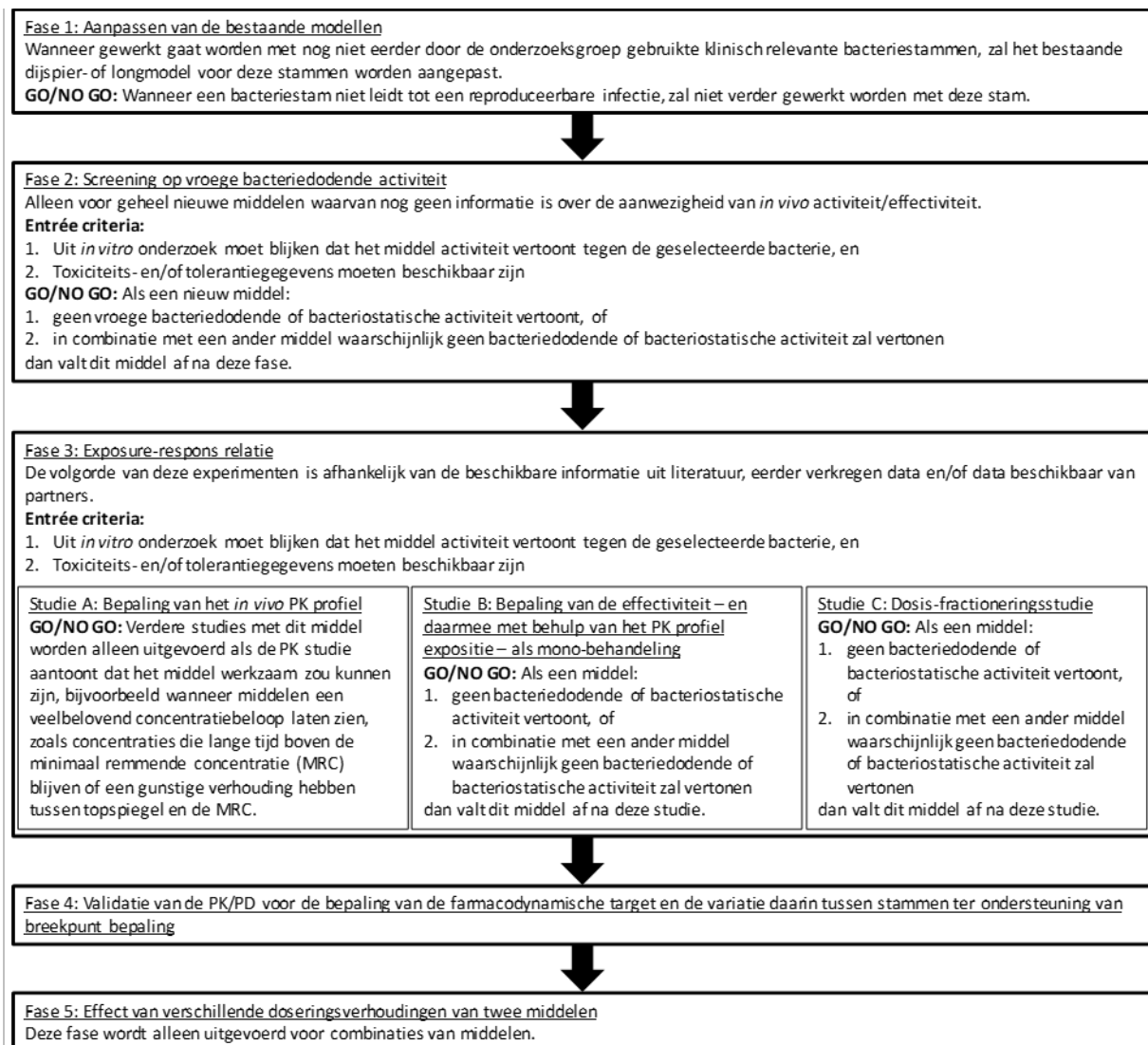
3.4.1 Geef een overzicht van de algemene opzet van het project. Besteed aandacht aan de eventuele fasering in de uitvoering en de samenhang. Vermeld eventuele mijlpalen, keuzemomenten en besliscriteria.

In deze studies wordt een duidelijk gefaseerde en gestandaardiseerde aanpak toegepast om de projectdoelen te behalen.

Als eerste zal ***in vitro* onderzoek** plaatsvinden, waaronder bijvoorbeeld MRC-bepalingen en time-kill curves. Kandidaat (combinaties van) middelen hiervoor worden geselecteerd door de onderzoeksgroep, door consortia binnen welke deze studies plaatsvinden en op basis van vraag door externe partners. Bacteriesoorten worden gekozen op basis van klinische relevantie, bestaande literatuur en verwachte werkingsmechanismen van de middelen. Op basis van de resultaten van deze *in vitro* studies wordt een keuze gemaakt voor (combinaties van) middelen die potentieel effectief kunnen zijn om vervolgens in proefdieren te onderzoeken. In het proefdieronderzoek worden die bacteriesoorten gebruikt waarbij *in vitro* activiteit gevonden wordt.

De *in vitro* karakterisering van een nieuw middel of combinatie zullen we voornamelijk zelf uitvoeren. Daarnaast kunnen data worden aangeleverd door derden, maar deze zullen door onszelf gevalideerd worden. Deze karakterisering kan bijvoorbeeld bepaling van de minimaal remmende concentraties van de middelen zijn, een checkerboard assay met een zeer uitgebreid panel aan bacteriestammen (verschillende bacteriespecies en verschillende stammen binnen het species en verschillende resistentiemechanismen), of time-kill experimenten waarin is aangetoond dat een (combinatie van) middelen *in vitro* groeiremmende activiteit vertoont. In de *in vitro* experimenten zullen alleen concentraties worden gebruikt die uiteindelijk haalbaar zijn in de patiënt en niet toxisch (in dier en mens). Als hieruit blijkt dat middelen additief of synergistisch werken, dan kunnen hierna *in vivo* experimenten starten.

Een vereiste voordat gestart wordt met het proefdieronderzoek is dat toxiciteits- en/of tolerantiegegevens van de middelen beschikbaar zijn (gegenereerd door anderen).



Figuur. Verschillende fases en studies in het project.

Bij het **proefdieronderzoek** (zie figuur hierboven) wordt – indien gewerkt gaat worden met nog niet eerder door onze onderzoeksgroep gebruikte klinisch relevante bacteriestammen – het bestaande dijspier- en longmodel aangepast. Voor een aantal species waarmee onze onderzoeksgroep veel ervaring heeft, zoals *Escherichia coli* en *Klebsiella pneumoniae*, is bekend dat een standaard inoculum leidt tot een reproduceerbare infectie. Voor een aantal andere species, zoals *Pseudomonas aeruginosa* en *Acinetobacter baumannii*, is bekend dat het geschikte inoculum voor een reproduceerbare infectie stam-afhankelijk is. Voor dit soort species is een **inoculum-finding studie** (welk inoculum leidt tot een reproduceerbare infectie in het toegepast model?) belangrijk.

Zodra de proefdiermodellen zijn geoptimaliseerd, kan het protocol gevolgd worden dat nodig is in voorbereiding op klinische studies, zoals omschreven in de richtlijnen van de EMA. In de komende 5 jaar verwachten we per proefdiermodel 10 middelen als mono-behandeling en 5 combinaties van middelen te onderzoeken.

Voor geheel nieuwe middelen wordt gestart met een **screening op vroege bacteriedodende activiteit**. Zonder bacteriedodende of –remmende activiteit (of wanneer niet verwacht wordt dat het middel in combinatie met een ander middel bacteriedodende of –remmende activiteit zal vertonen) zal een dergelijk middel niet verder *in vivo* worden onderzocht.

Voor alle (combinaties van) middelen wordt de **farmacokinetiek (PK)** en de **farmacodynamiek (PD)**, en de relatie hiertussen (**PK/PD**) bepaald.

Het *in vivo* **PK profiel** (de blootstelling, exposure) wordt voor verschillende doses bepaald na een eenmalige gift van de middelen (of indien strikt noodzakelijk na meerdere toedieningen) in het dijspier- en/of het longinfectiemodel. Het PK profiel wordt in geïnfecteerde dieren bepaald, omdat infectie het concentratiebeloop van middelen kan beïnvloeden. Wanneer het PK profiel in een niet-geïnfecteerd dier zou worden bepaald, kan geen goede exposure-respons relatie worden vastgesteld.

Ook wordt de exposure-response relatie over de tijd bepaald. Op basis van de resultaten van de *in vitro* assays en van het (te verwachten of aangetoonde) PK profiel in de muis worden doseringsschema's gekozen. Hierbij wordt de **effectiviteit van middelen als mono-behandeling** bepaald, en zal een **dosis-fractioneringsstudie** worden uitgevoerd, waarbij verschillende doseringsfrequenties van een middel of combinatie worden vergeleken.

De **farmacodynamische target** en de variatie daarin tussen bacteriestammen wordt vervolgens bepaald ter ondersteuning van de breekpunt bepaling.

In geval van combinaties wordt tot slot een *in vivo* **checkerboard assay** gedaan met verschillende doseringsschema's voor beide middelen, voor verschillende bacteriestammen.

Door de gefaseerde aanpak vallen (combinaties van) middelen zonder potentie om in de patiënt werkzaam te kunnen zijn, af in een vroege fase van het onderzoek, waardoor het aantal benodigde proefdieren beperkt kan worden, en komt waardevolle data over succesvolle (combinaties van) middelen beschikbaar. Niet alle (combinaties van) middelen zullen succesvol zijn.

We verwachten dat van de 10 middelen als mono-behandeling en 5 combinaties van middelen er 3 succesvol zullen zijn in onze dierproeven. Deze potentieel succesvolle (combinaties van) middelen kunnen vervolgens onderzocht worden in klinische studies.

Op basis van deze informatie kan besloten worden of de (combinatie van) middelen waardevol genoeg is om een zeer dure **klinische studie** te starten. Het is zeer belangrijk dat het infectiemodel in het dier (aspecten van) de humane infectie zo veel mogelijk reproduceert, voor de veiligheid van de proefpersonen/patiënten, om proefpersonen/patiënten niet onnodig te belasten met middelen die uiteindelijk niet voldoende nuttig blijken, en vanwege de zeer hoge kosten van klinische studies.

Fase 1: Aanpassen van de bestaande modellen

Indien nodig worden de bestaande modellen van dijspier- en longinfectie aangepast voor klinisch relevante bacteriestammen. Er zal bepaald worden welk inoculum leidt tot een reproduceerbare infectie.

GO/NO GO: Wanneer een bacteriestam niet leidt tot een reproduceerbare infectie, zal niet verder gewerkt worden met deze stam.

In alle gevallen gelden onderstaande **entree criteria** voor fase 2 (nieuwe middelen) respectievelijk fase 3 (bestaande middelen):

1. Uit *in vitro* onderzoek moet blijken dat het middel activiteit vertoont tegen de geselecteerde bacterie, en
2. Toxiciteits- en/of tolerantiegegevens moeten beschikbaar zijn.

Fase 2: Screening op vroege bacteriedodende activiteit

Alleen voor geheel nieuwe middelen waarvan bij ons of bij partners nog geen informatie is over de aanwezigheid van *in vivo* activiteit/effectiviteit worden screeningsexperimenten uitgevoerd.

Van sommige middelen wordt niet verwacht dat ze zelf actief zijn tegen een bacteriële infectie, of slechts beperkt, zoals remmers van beta-lactamase enzymen. Het is wel belangrijk te weten of deze middelen vroege bacteriedodende activiteit hebben, om in vervolgstudies te kunnen kijken naar de synergie van zo'n middel met een bestaand middel.

GO/NO GO: Als een nieuw middel:

1. geen vroege bacteriedodende of bacteriostatische activiteit vertoont, of
2. in combinatie met een ander middel waarschijnlijk geen bacteriedodende of bacteriostatische activiteit zal vertonen (bijvoorbeeld in geval van een antibioticum gecombineerd met remmers van beta-lactamase enzymen, waarvan de laatste meestal zelf geen activiteit hebben)

dan valt dit middel af na deze fase.

Door uitvoering van deze proef met een klein aantal dieren wordt een eerste indruk gekregen of het nieuwe middel *in vivo* werkzaam kan zijn. Als dit niet het geval is, hoeven geen uitgebreide PK en PD studies gedaan te worden. Dit voorkomt onnodig gebruik van proefdieren.

Fase 3: Exposure-respons relatie

In deze fase worden het *in vivo* PK profiel en de effectiviteit van middelen (met een vaste doseringsfrequentie of met verschillende doseringsfrequenties) bepaald en aan elkaar gerelateerd. De volgorde van deze experimenten is afhankelijk van de beschikbare informatie uit literatuur, eerder verkregen data en/of data beschikbaar van partners. Wanneer er bijvoorbeeld al concrete aanwijzingen zijn over het PK profiel van een middel, dan zal eerst naar de effectiviteit van het middel gekeken worden, en later alsnog naar het PK profiel (in hetzelfde proefdiermodel). Wanneer er al duidelijkheid is over de meest geschikte doseringsfrequentie van het middel, dan zal een dosis-fractioneringsstudie (met verschillende doseringsfrequenties van het middel) minder prioriteit hebben, en pas na bepaling van het PK profiel en de effectiviteit (met een vaste doseringsfrequentie van het middel) worden geconfirmeerd. Na elke studie volgt wel een GO/NO GO moment waarop bepaald wordt of het zinvol is om door te gaan met de andere studies in deze fase.

Studie A: Bepaling van het *in vivo* PK profiel

GO/NO GO: Verdere studies met dit middel worden alleen uitgevoerd als de PK studie aantoont dat het middel werkzaam zou kunnen zijn, bijvoorbeeld wanneer middelen een veelbelovend concentratiebeloop laten zien, zoals concentraties die lange tijd boven de minimaal remmende concentratie (MRC) blijven of een gunstige verhouding hebben tussen topspiegel en de MRC.

Op basis van de resultaten van de *in vitro* assays en van het (te verwachten of aangetoonde) PK profiel in het dier worden doseringsschema's gekozen voor studies naar de effectiviteit van middelen.

Studie B: Bepaling van de effectiviteit van middelen – en daarmee met behulp van het PK profiel expositie – als mono-behandeling

GO/NO GO: Als een middel:

1. geen bacteriedodende of bacteriostatische activiteit vertoont, of
2. in combinatie met een ander middel waarschijnlijk geen bacteriedodende of bacteriostatische activiteit zal vertonen (bijvoorbeeld in geval van een antibioticum gecombineerd met remmers van beta-lactamase enzymen, waarvan de laatste meestal zelf geen activiteit hebben)

dan valt dit middel af na deze studie.

Studie C: Dosis-fractioneringsstudie

GO/NO GO: Als een middel:

1. geen bacteriedodende of bacteriostatische activiteit vertoont, of
2. in combinatie met een ander middel waarschijnlijk geen bacteriedodende of bacteriostatische activiteit zal vertonen (bijvoorbeeld in geval van een antibioticum gecombineerd met remmers van beta-lactamase enzymen, waarvan de laatste meestal zelf geen activiteit hebben)

dan valt dit middel af na deze studie.

Fase 4: Validatie van de PK/PD voor de bepaling van de farmacodynamische target en de variatie daarin tussen stammen ter ondersteuning van breekpunt bepaling

In deze fase worden de gegevens verkregen in eerdere fases gevalideerd met behulp van een meer uitgebreid panel aan bacteriestammen. Ook wordt gekeken naar de variatie tussen stammen.

Fase 5: Effect van verschillende doseringsverhoudingen van twee middelen

Deze fase wordt alleen uitgevoerd voor combinaties van middelen.

3.4.2 Onderbouw de gekozen strategie.

Voordat gestart wordt met het bestuderen van de exposure-respons relatie van (combinaties van) middelen zal – indien gewerkt gaat worden met bacteriestammen waarmee onze onderzoeksgroep nog geen ervaring heeft – het dijspier- en/of het longmodel worden aangepast voor deze stammen. Er wordt een inoculum "getitreerd" dat leidt tot een reproduceerbare infectie. (Fase 1; Doel A.)

Vervolgens zullen deze (combinaties van) middelen volgens de gestandaardiseerde aanpak van het PK/PD onderzoek worden bestudeerd (Fase 2-5, Doel B).

Voor geheel nieuwe middelen waarover nog geen informatie bekend is *in vivo* en die in *in vitro* assays een antimicrobiële werking laten zien, wordt allereerst een screeningsexperiment uitgevoerd (fase 2). Van nieuwe antibiotica is meestal nog helemaal geen of uiterst beperkte *in vivo* data bekend met betrekking tot de werkzaamheid, maar vaak wel het toxiciteits- en/of tolerantieprofiel. Daarom wordt voor geheel nieuwe middelen (mits een toxiciteits- of tolerantieprofiel beschikbaar) eerst bestudeerd of het nieuwe middel voldoende *in vivo* activiteit heeft in deze fase en het dus verantwoord is om de verdere proeven met grotere aantallen doseringen en dieren uit te gaan voeren.

Voor middelen waarover al wel informatie bekend is, zal deze fase worden overgeslagen.

Alle middelen doorlopen de vervolgfases (3 en 4 voor mono-behandeling, 3-5 voor combinaties van middelen), zo lang als ze voldoen aan de GO/NO GO criteria. Wanneer deze fasen doorlopen zijn, kunnen de PK/PD index en target bepaald worden, die dienen als input voor klinische studies.

3.4.3 Benoem de type dierproeven. Vul per type dierproef een bijlage Beschrijving dierproef in.

Volgnummer	Titel bijlage Beschrijving dierproef
1	Dijspiermodel
2	Longmodel
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Bijlage

Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u in de 'Toelichting op de te gebruiken formulieren voor de aanvraag van een projectvergunning' op de website www.centralecommissiedierproeven.nl
- Of neem telefonisch contact op (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in. 5.1 lid2h
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in. 5.1 lid2h
- 1.3 Vul het volgnummer en de titel van de dierproef in.
- | Volgnummer | Titel dierproef |
|------------|-----------------|
| 1 | Dijspiermodel |

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.3 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

Middelen en combinaties van middelen zullen volgens de gestandaardiseerde aanpak van het PK/PD onderzoek worden bestudeerd, in het dijspier- en/of het longmodel. In deze modellen wordt gebruik gemaakt van neutropene muizen. Deze bijlage beschrijft het dijspiermodel.

Wanneer gewerkt gaat worden met nog niet eerder door de onderzoeksgroep gebruikte klinisch relevante bacteriestammen, zal het bestaande en in de literatuur uitgebreid beschreven dijspiermodel voor deze stammen worden aangepast. De onderzoeksgroep heeft veel ervaring met een ruim aantal species, waaronder *Escherichia coli* en *Klebsiella pneumoniae*. Voor deze species is bekend dat een standaard inoculum leidt tot een reproduceerbare infectie. Voor een aantal andere species, zoals *Pseudomonas aeruginosa* en *Acinetobacter baumannii*, is bekend dat het geschikte inoculum voor een reproduceerbare infectie stam-afhankelijk is.

Fase 1. Aanpassen van de bestaande modellen

Indien nodig wordt het bestaande dijspiermodel aangepast voor klinisch relevante bacteriestammen. Er zal bepaald worden welk inoculum leidt tot een reproduceerbare infectie.

Primaire uitkomstparameter: het ontstaan van een reproduceerbare infectie, waarbij de inter-individuele variatie beperkt is, waarbij de bacteriële load voldoende hoog is, maar die niet leidt tot ernstige sepsis.

GO/NO GO: Wanneer een bacteriestam niet leidt tot een reproduceerbare infectie, zal niet verder gewerkt worden met deze stam.

Na deze aanpassing zal gestart worden met het daadwerkelijke PK/PD onderzoek.

Voor geheel nieuwe middelen zal gestart worden met fase 2. Voor alle andere middelen zal gestart worden met fase 3.

In alle gevallen gelden onderstaande entrée criteria voor fase 2 (nieuwe middelen) respectievelijk fase 3 (bestaande middelen):

1. Uit *in vitro* onderzoek moet blijken dat het middel activiteit vertoont tegen de geselecteerde bacterie, en
2. Toxiciteits- en/of tolerantiegegevens moeten beschikbaar zijn.

Fase 2. Screening op vroege bacteriedodende activiteit

Alleen voor geheel nieuwe middelen waarvan nog geen informatie is over de aanwezigheid van *in vivo* activiteit/effectiviteit worden screeningsexperimenten uitgevoerd naar de vroege bacteriedodende activiteit. Neutropene, geïnfecteerde muizen worden behandeld met het middel, per os of parenteraal, de route die het meest passend is op basis van verwachtingen aan de hand van bijvoorbeeld de structuur of antibioticum-klasse (meestal SC, IM, IV, IP of soms per maagsonde). Daarbij wordt het maximaal toe te dienen volume voor die route in acht genomen (Principles of Laboratory Animal Science revised edition, Van Zutphen 2001, tabel 16-1).

Primaire uitkomstparameter: bacteriële load in de dijspier in behandelde vs onbehandelde muizen.

GO/NO GO: Als een nieuw middel:

1. geen vroege bacteriedodende of bacteriostatische activiteit vertoont, of
2. in combinatie met een ander middel waarschijnlijk geen bacteriedodende of bacteriostatische activiteit zal vertonen (bijvoorbeeld in geval van een antibioticum gecombineerd met remmers van beta-lactamase enzymen, waarvan de laatste meestal zelf geen activiteit hebben)

dan valt dit middel af na deze fase.

Door uitvoering van deze proef met een klein aantal dieren wordt een eerste indruk gekregen of het nieuwe middel *in vivo* werkzaam kan zijn. Als dit niet het geval is, hoeven geen uitgebreide PK en PD studies gedaan te worden. Dit voorkomt onnodig gebruik van proefdieren.

Fase 3: Exposure-respons relatie

In deze fase worden het *in vivo* PK profiel en de effectiviteit van middelen (met een vaste doseringsfrequentie of met verschillende doseringsfrequenties) bepaald en aan elkaar gerelateerd. De volgorde van deze experimenten is afhankelijk van de beschikbare informatie uit literatuur, eerder verkregen data en/of data beschikbaar van partners. Wanneer er bijvoorbeeld al concrete aanwijzingen zijn over het PK profiel van een middel, dan zal eerst naar de effectiviteit van het middel gekeken worden, en later alsnog naar het PK profiel (in hetzelfde proefdiermodel). Wanneer er al duidelijkheid is over de meest geschikte doseringsfrequentie van het middel, dan zal een dosis-fractioneringsstudie (met verschillende doseringsfrequenties van het middel) minder prioriteit hebben, en pas na bepaling van het PK profiel en de effectiviteit (met een vaste doseringsfrequentie van het middel) worden geconfirmeerd.

Na elke studie binnen deze fase volgt een GO/NO GO moment waarop bepaald wordt of het zinvol is om door te gaan met de andere studies in deze fase, of naar de volgende fase. De GO/NO GO-criteria zijn onderstaand per studie vermeld.

Studie A: Bepaling van het *in vivo* PK profiel

Voor alle (combinaties van) middelen wordt het PK profiel (concentraties van het middel in de tijd bij verschillende doses) bepaald. Neutropene, geïnfecteerde muizen worden éénmalig (of, in specifieke situaties, meerdere malen, maximaal 3 keer) behandeld, waarna op verschillende tijdstippen de muizen worden gedood om het concentratieverloop van het middel te bepalen.

Primaire uitkomstparameter: concentratie van het middel in de loop van de tijd.

GO/NO GO: Verdere studies met dit middel worden alleen uitgevoerd als de PK studie aantoont dat het middel werkzaam zou kunnen zijn, bijvoorbeeld wanneer middelen een veelbelovend concentratiebeloop laten zien, zoals concentraties die lange tijd boven de minimaal remmende concentratie (MRC) blijven of een gunstige verhouding hebben tussen topspiegel en de MRC.

Op basis van de resultaten van de *in vitro* assays en van het (te verwachten of aangetoonde) PK profiel in het dier worden doseringsschema's gekozen voor studies naar de effectiviteit van middelen.

Studie B: Bepaling van de effectiviteit van middelen – en daarmee met behulp van het PK profiel expositie – als mono-behandeling

De exposure-respons relatie van de (combinatie van) middelen wordt bepaald. Hiervoor wordt de effectiviteit van de middelen als mono-behandeling bepaald. Neutropene, geïnfecteerde muizen worden behandeld met verschillende doseringsschema's met een vaste doseringsfrequentie.

Primaire uitkomstparameter: bacteriële load in de dijspier in behandelde vs onbehandelde muizen, en daarmee de bacteriostatische dosis (dosis waarbij geen uitgroei van de bacterie plaatsvindt) van het middel als mono-behandeling.

GO/NO GO: Als een middel:

1. geen bacteriedodende of bacteriostatische activiteit vertoont, of
2. in combinatie met een ander middel waarschijnlijk geen bacteriedodende of bacteriostatische activiteit zal vertonen (bijvoorbeeld in geval van een antibioticum gecombineerd met remmers van beta-lactamase enzymen, waarvan de laatste meestal zelf geen activiteit hebben)

dan valt dit middel af na deze studie.

Studie C: Dosis-fractioneringsstudie

De exposure-respons relatie van de (combinatie van) middelen wordt verder onderzocht. Hiervoor wordt een dosis-fractioneringsstudie uitgevoerd. Neutropene, geïnfecteerde muizen worden behandeld met verschillende doseringsschema's met verschillende doseringsfrequenties van een middel of combinatie van middelen.

Primaire uitkomstparameter: bacteriële load in de dijspier in behandelde vs onbehandelde muizen, en daarmee bepaling van de PK/PD index die de exposure-respons relatie het beste beschrijft.

GO/NO GO: Als een middel:

1. geen bacteriedodende of bacteriostatische activiteit vertoont, of
2. in combinatie met een ander middel waarschijnlijk geen bacteriedodende of bacteriostatische activiteit zal vertonen (bijvoorbeeld in geval van een antibioticum gecombineerd met remmers van beta-lactamase enzymen, waarvan de laatste meestal zelf geen activiteit hebben)

dan valt dit middel af na deze studie.

Fase 4: Validatie van de PK/PD voor de bepaling van de farmacodynamische target en de variatie daarin tussen stammen ter ondersteuning van breekpunt bepaling

Na deze fase 3-studies wordt de waarde van de PK/PD index gevalideerd voor een aantal andere bacteriestammen. Ook wordt in deze fase gekeken naar de variatie tussen stammen.

Primaire uitkomstparameter: bacteriële load in de dijspier in behandelde vs onbehandelde muizen, en daarmee validatie van de PK/PD index en bepaling van de PD target.

Fase 5: Effect van verschillende doseringsverhoudingen van twee middelen

Deze fase wordt alleen uitgevoerd voor combinaties van middelen. Er wordt een *in vivo* checkerboard experiment uitgevoerd. Neutropene, geïnfecteerde muizen worden behandeld met verschillende doseringsverhoudingen van twee middelen.

Primaire uitkomstparameter: bacteriële load in de dijspier in behandelde vs onbehandelde muizen, en daarmee het effect van verschillende doseringsverhoudingen van twee middelen.

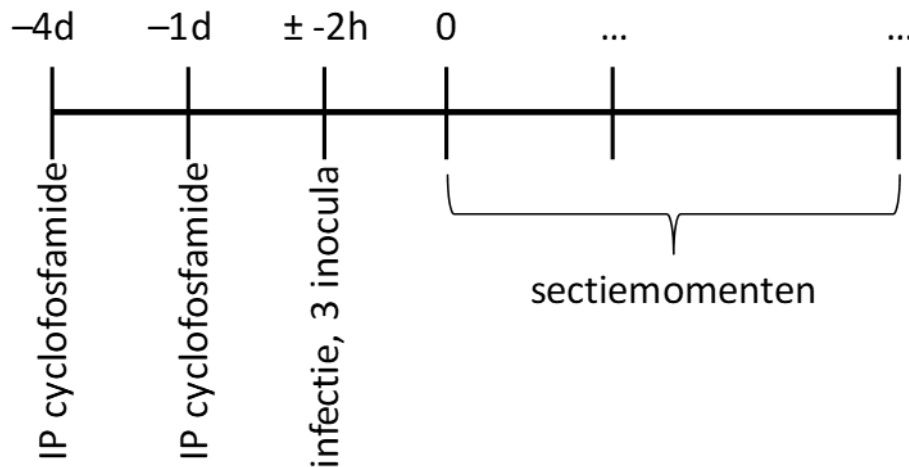
Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

Ongerief wordt zo veel mogelijk geminimaliseerd door gebruik van adequate analgetica. Alle dieren in alle experimenten zullen deze analgesie ontvangen. Euthanasie zal plaatsvinden onder adequate anesthesie. Ongerief wordt gedurende het experiment geregistreerd op een score sheet, waarbij de humane eindpunt criteria worden meegenomen. Hiervoor worden de muizen gewogen (dag -4, dag -1, na infectie wanneer daar aanleiding toe is) en temperatuur (infrarood thermometer) wordt gemeten (na infectie wanneer daar aanleiding toe is).

Fase 1: Aanpassen van de bestaande modellen

Muizen worden neutropeen gemaakt door voorbehandeling met cyclofosfamide (IP op dag -4 en dag -1 voor infectie). Op dag 0 worden de muizen geïnfecteerd in beide dijspieren met een van de drie bacteriële inocula. Op het moment dat normaliter behandeling wordt gestart (2 uur na infectie), op het moment dat normaliter behandeling wordt beëindigd (meestal 24 uur na start behandeling), en op een tussenliggend tijdstip (afhankelijk van de bacteriestam) worden groepen dieren gedood voor bepaling van de bacteriële load in de dijspier. Het inoculum dat leidt tot een reproduceerbare infectie wordt gekozen voor vervolgonderzoek.

Deze experimenten duren in het algemeen maximaal 26 uur (Figuur 1). In een beperkt aantal experimenten zal zo nodig ook na 48 en/of 72 uur een verificatie plaatsvinden. Dit kan bijvoorbeeld het geval zijn wanneer de bacteriestam minder snel dan verwacht blijkt te groeien.



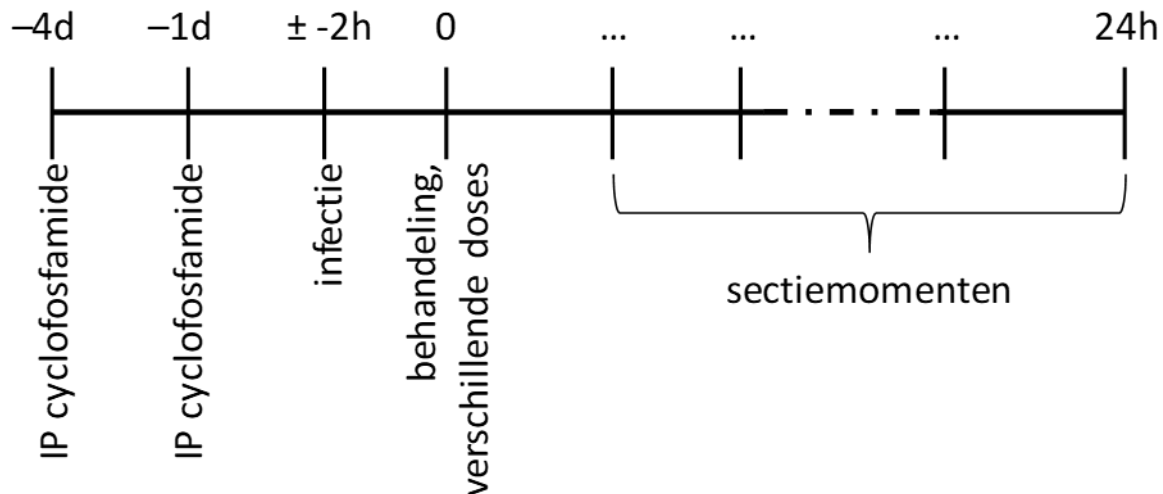
Figuur 1. Algemene opzet van 'Fase 1: Aanpassen van de bestaande modellen'.

Fase 2: Screening op vroege bacteriedodende activiteit

Neutropene, geïnfecteerde dieren worden éénmalig behandeld, dosisgroepen van enkele dieren met verschillende doses van het middel (maximaal 8). Behandeling met het middel is per os of parenteraal, de route die het meest passend is (meestal SC, IM, IV, IP of soms per maagsonde). Daarbij wordt het maximaal toe te dienen volume voor die route in acht genomen (Principles of Laboratory Animal Science revised edition, Van Zutphen 2001, tabel 16-1).

Enkele uren na deze toediening wordt op verschillende tijdstippen (maximaal 8) sectie verricht op de dieren om de vroege bacteriedodende activiteit te bepalen (Figuur 2).

Deze studies duren maximaal 26 uur (na start behandeling).



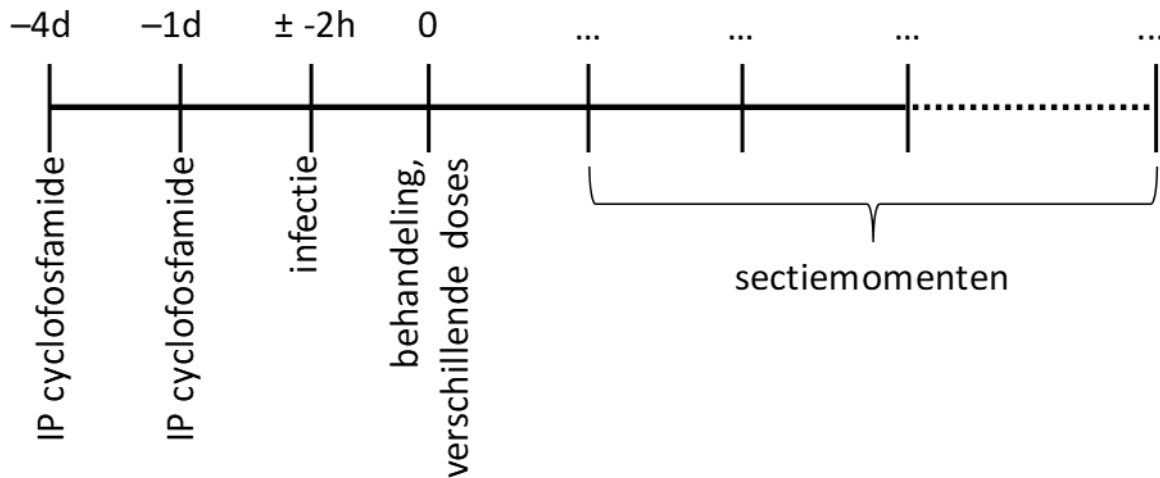
Figuur 2. Algemene opzet van 'Fase 2: Screening op vroege bacteriedodende activiteit'.

Fase 3: Exposure-respons relatie

Studie A: Bepaling van het *in vivo* PK profiel

Neutropene, geïnfecteerde dieren worden éénmalig (of, in specifieke situaties zoals zeer korte halfwaardetijd, meerdere malen, maximaal 3 keer) behandeld, verschillende dosisgroepen met verschillende doses van het middel (hoogste dosis niet hoger dan de drempelwaarde voor toxiciteit, maximaal 8 dosisgroepen). Op verschillende tijdstippen (maximaal 12) na de behandeling worden dieren gedood voor sectie om het concentratieverloop van het middel (PK profiel) in bloed en epithelial lining fluid (ELF) te bepalen (Figuur 3). Wanneer voor concentratie-bepaling van een middel kan worden volstaan met een kleine hoeveelheid plasma, dan wordt ook tijdens het experiment bloed afgenomen bij de muizen, waarbij het aantal sectie-momenten gereduceerd kan worden.

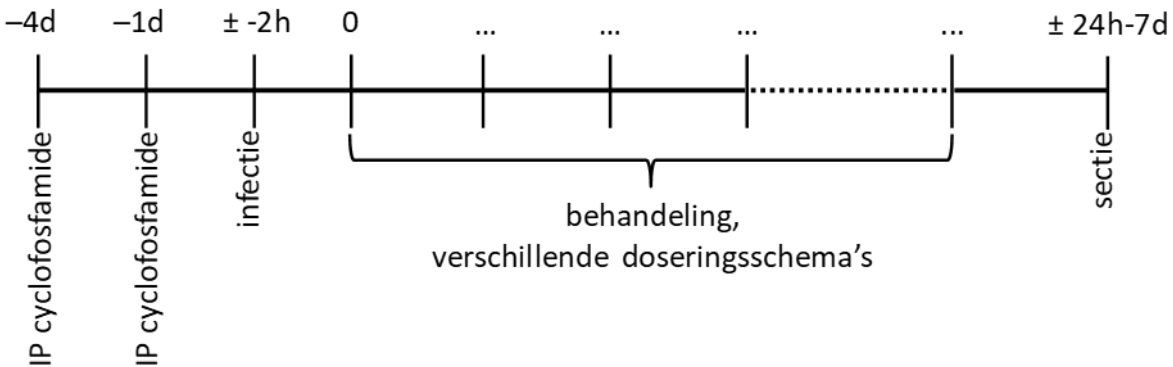
Deze studies duren over het algemeen niet langer dan 48 uur, maar in uitzonderlijke gevallen, bijvoorbeeld als de halfwaardetijd van het middel uitzonderlijk lang is, maximaal 7 dagen (na start behandeling).



Figuur 3. Algemene opzet van 'Fase 3: Exposure-respons relatie. Studie A: Bepaling van het *in vivo* PK profiel'.

Studie B: Bepaling van de effectiviteit van middelen – en daarmee met behulp van het PK profiel expositie – als mono-behandeling

Neutropene, geïnfecteerde dieren (infectie door maximaal 8 bacteriestammen met verschillende gevoeligheden ofwel MRC's) worden behandeld met het middel als mono-behandeling gedurende 24 uur of maximaal 7 dagen. Er worden verschillende doses (maximaal 6) van het middel onderzocht (Figuur 4). Deze studies duren meestal 24 uur en maximaal 7 dagen (na start behandeling). Het doseringsschema voor herhaalde toedieningen is mede afhankelijk van de verwachte halfwaardetijd van het middel en bedraagt maximaal 18 toedieningen per maximaal 7 dagen.

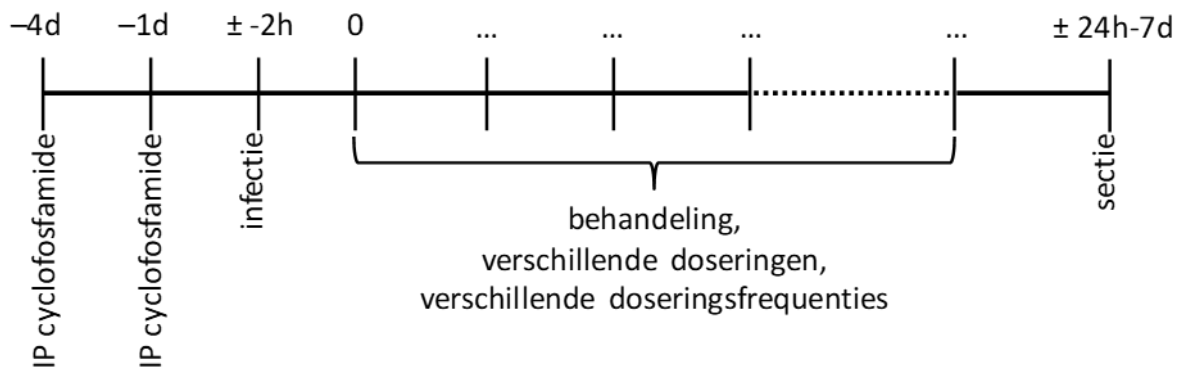


Figuur 4. Algemene opzet van 'Fase 3: Exposure-respons relatie. Studie B: Bepaling van de effectiviteit van middelen – en daarmee met behulp van het PK profiel expositie – als mono-behandeling'.

Studie C: Dosis-fractioneringsstudie

Neutropene, geïnfecteerde dieren (infectie door maximaal 4 verschillende bacteriestammen met verschillende gevoeligheden) worden behandeld met een (combinatie van) middelen waarbij de doseringsfrequentie varieert, maximaal 18 of 20 verschillende doseringsschema's, voor mono-respectievelijk combinatie-behandeling (Figuur 5).

Deze studies duren meestal 24 uur en maximaal 7 dagen (na start behandeling). Het doseringsschema voor herhaalde toedieningen is mede afhankelijk van de verwachte halfwaardetijd van het middel en bedraagt maximaal 18 toedieningen per maximaal 7 dagen.



Figuur 5. Algemene opzet van 'Fase 3: Exposure-respons relatie. Studie C: Dosis-fractioneringsstudie' en van 'Fase 4: Validatie van de PK/PD voor de bepaling van de farmacodynamische target en de variatie daarin tussen stammen ter ondersteuning van breekpunt bepaling'.

Fase 4: Validatie van de PK/PD voor de bepaling van de farmacodynamische target en de variatie daarin tussen stammen ter ondersteuning van breekpunt bepaling

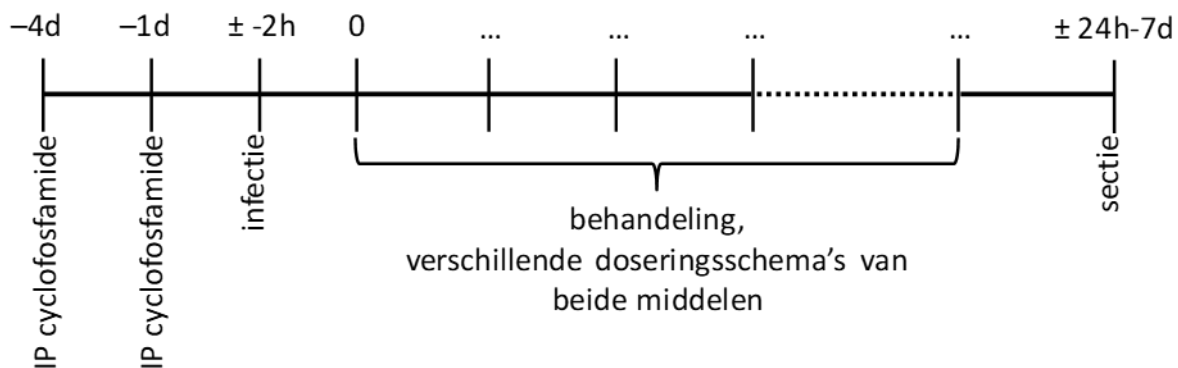
Deze proef is in opzet hetzelfde als studie C (fase 3), maar wordt gedaan met andere bacteriestammen (maximaal 6), om zo te verifiëren of de waarde van de PK/PD index gevonden in fase 2 ook geldig is bij andere bacteriestammen met andere gevoeligheden en andere resistentiemechanismen (Figuur 5). Er worden maximaal 12 verschillende doseringsschema's bestudeerd.

Deze studies duren meestal 24 uur en maximaal 7 dagen (na start behandeling). Het doseringsschema voor herhaalde toedieningen is mede afhankelijk van de verwachte halfwaardetijd van het middel en bedraagt maximaal 18 toedieningen per maximaal 7 dagen.

Fase 5: Effect van verschillende doseringsverhoudingen van twee middelen

In deze proef wordt een *in vivo* checkerboard assay gedaan, met verschillende doseringsschema's (maximaal 6) voor beide middelen (in totaal dus maximaal 6x6 doseringsschema's), voor verschillende bacteriestammen (maximaal 2). Verschil met de eerdere dosisfractioneringsstudies is dat in deze fase de doseringsschema's van beide middelen variëren, met juist hoge of lage concentraties van een van de middelen. Resultaten worden vergeleken met die van de *in vitro* checkerboard assays (Figuur 6).

Deze studies duren meestal 24 uur en maximaal 7 dagen (na start behandeling). Het doseringsschema voor herhaalde toedieningen is mede afhankelijk van de verwachte halfwaardetijd van de middelen en bedraagt maximaal 18 toedieningen per maximaal 7 dagen.



Figuur 6. Algemene opzet van 'Fase 5: Effect van verschillende doseringsverhoudingen van twee middelen'.

Geef aan welke overwegingen en statistische methoden worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken.

Voor het modelleren van het PK profiel zijn plasma- en ELF-concentraties nodig in de tijd. Uit jarenlange eigen ervaring en gepubliceerde literatuur is gebleken dat het PK profiel gemodelleerd kan worden op basis van minimaal 2-3 dieren per tijdstip. (Het precieze aantal dieren hangt af van de te verwachten inter-individuele variatie in de concentraties van de middelen.) Het aantal tijdstipen per dosis en de exacte

tijdstippen wordt gebaseerd op het aantal vrijheidsgraden van de modelcurve en de te verwachten kinetiek van het middel en mogelijke te verwachten interacties. Dit zal per middel verschillen.

Voor het modelleren van de exposure-respons relatie wordt een E_{max} -model gebruikt met variabele helling (slope). Het benodigde aantal datapunten wordt gebaseerd op het aantal vrijheidsgraden (4 bij het E_{max} -model) en de te verwachten respons curve. Voor een goede curve fit zijn op basis hiervan minimaal 5 datapunten (dus 5 doseringsschema's) nodig (aantal vrijheidsgraden + 1): 1 datapunt op het maximale effect, 1 punt op het minimale effect en 3 punten voor het beschrijven van de helling. Echter, van tevoren is niet precies bekend bij welk doseringsschema het maximum of minimum effect optreedt. Er wordt daarom standaard bij 6 schema's gemeten. Dit is een balans tussen enerzijds te vaak een proef te moeten herhalen omdat er geen goede curvedescriptie kan worden bepaald (de punten op de effectcurve liggen te veel naar links of naar rechts ten opzichte van de EC50 en/of het bacteriostatische effect) en anderzijds standaard heel veel punten meten waarbij onnodig veel dieren worden gebruikt. Vanwege de biologische variatie in expositie en respons bij de individuele dieren moet elk datapunt in duplo of in triplo (afhankelijk van de te verwachten inter-individuele variatie) worden uitgevoerd. Daarnaast zijn per middel (of combinatie) infectiecontroles, groeiconroles en comparator-antibioticum controles (behandeld met een middel waarvan het effect bekend is) nodig en single drug controles bij proeven met combinaties van middelen.

Voor de aanvang van de proef wordt de proefopzet in detail voorgelegd aan de IvD.

B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, levensstadia, geschatte aantallen per levensstadium, geslacht, genetische wijzigingen en, indien van belang voor het behalen van de doelstelling, de te gebruiken stam.

Volgnr.	Diersoort	Herkomst	Levensstadium	Aantal	Geslacht	Genetisch gewijzigd	Stam
1	Mus Musculus	Dieren gefokt voor onderzoek	Jong volwassen	9010	vrouwelijk	NVT	Bij voorkeur worden CD-1 muizen gebruikt.

Onderbouw de bovengenoemde keuzes.

Diersoort	Standaardisatie van het model is belangrijk om resultaten onderling te kunnen vergelijken. In het dijspiermodel dat in de literatuur beschreven is, wordt gebruik gemaakt van muizen. Er is een directe correlatie tussen de PK/PD indexen in muizen en mensen voor verschillende antibiotica.
Herkomst	Standaardisatie, ook van de microbiologische status van het gebruikte proefdier, is belangrijk om resultaten onderling te kunnen vergelijken. De normale flora van de muis kan invloed hebben op het beloop van de infectie. Door muizen te betrekken van een geregistreerde proefdierleverancier wordt deze flora zo veel mogelijk gestandaardiseerd.
Levensstadia	In het dijspiermodel dat in de literatuur beschreven is, wordt gebruik gemaakt van jong volwassen (5-10 weken) muizen. Deze standaardisatie is belangrijk om resultaten onderling te kunnen vergelijken.
Aantal	<p>Fase 1-proeven moeten eenmalig worden uitgevoerd; als de modellen zijn aangepast dan kunnen (combinaties van) middelen getest worden in de fases 2-5.</p> <p>Het aantal te testen (combinaties van) middelen zal enerzijds afhangen van (combinaties van) middelen met potentie uit eigen <i>in vitro</i> onderzoek in het kader van wetenschappelijke onderzoeksprojecten en anderzijds van de interesse vanuit de farmaceutische industrie. Dit aantal is daarom niet geheel nauwkeurig in te schatten. Op basis van ervaring in de afgelopen jaren schatten we in dat we per 5 jaar maximaal 10 middelen als mono-behandeling en 5 combinaties van middelen gaan testen, waarvan een deel al in een vroeg stadium van het onderzoek zal afvallen ten gevolge van de GO/NO GO-criteria.</p> <p>Het totaal aantal dieren dat nodig zal zijn in 5 jaar hangt af van het succes van de (combinaties van) middelen. Wanneer een middel of combinatie in eerste proeven blijkt geen potentie te hebben om <i>in vivo</i> werkzaam te zijn, dan wordt dit middel niet verder <i>in</i></p>

vivo onderzocht en wordt slechts een beperkt aantal dieren gebruikt. Wanneer een middel (of combinatie) wel succesvol is, dan worden alle proeven beschreven in fases 2-4 (voor mono-behandeling) of 2-5 (voor combinatie-behandeling) uitgevoerd. Dan zijn logischerwijs ook meer dieren nodig.

In onderstaande berekeningen wordt uitgegaan van maximale aantallen. Wanneer de variatie binnen de groep naar verwachting kleiner is, dan kan worden volstaan met 2 dieren per groep, een kleiner aantal bacteriestammen en/of tijdspunten. Wanneer al enige informatie beschikbaar is over het doseringsschema (dosis en/of frequentie), dan kan in die gevallen eventueel worden volstaan met een beperkter aantal doseringsschema's. Voor de combinatie-behandelingen is uitgegaan van twee middelen die beide nog niet getest zijn als mono-behandeling. Uiteraard zullen er ook combinaties onderzocht worden van middelen waarvan we zelf (in eerder onderzoek of in het huidige project) het effect van mono-behandeling hebben onderzocht. In dat geval worden deze experimenten uiteraard niet herhaald, en wordt deze data gebruikt als input voor de experimenten met de combinatie. Er kan dan volstaan worden met een kleiner aantal groepen.

Fase 1: Aanpassen van de bestaande modellen

In geval gewerkt gaat worden met bacteriestammen waarmee de onderzoeksgroep nog geen ervaring heeft, zal het bestaande model voor deze stam worden aangepast. Dit wordt gedaan voor maximaal 10 bacteriestammen. Muizen worden geïnfecteerd met 3 verschillende inocula. Op 3 verschillende momenten wordt sectie verricht op de muizen om te zien of er een reproduceerbare infectie ontstaat. In verband met biologische variatie zullen 3 muizen per groep worden gebruikt. Daarnaast zal ook een groep van 3 muizen worden behandeld met een controle-antibioticum ("comparator-drug") waarvan bekend is dat dit effectief zal zijn *in vivo*, om aan te tonen dat de infectie behandelbaar is.

Voor deze proef zijn 540 muizen nodig:

10 bacteriestammen x 3 inocula x 3 sectiemomenten x (3 onbehandelde muizen + 3 controle-antibioticum controles)

Voor (succesvolle) middelen zijn de volgende proeven noodzakelijk:

Fase 2: Screening op vroege bacteriedodende activiteit

Voor nieuwe middelen wordt op vroege bacteriedodende activiteit gescreend voor maximaal 4 relevante bacteriestammen met verschillende gevoeligheden (om de variatie tussen stammen te bestuderen, aantal afhankelijk van het onderzochte middel), bij maximaal 8 verschillende doses en/of sectiemomenten (keuze voor meerdere doses en/of meerdere sectiemomenten afhankelijk van verwachting over de effectieve dosis en killingsnelheid), voor elke dosis 2 muizen (1 muis in onvoldoende i.v.m. biologische variatie, meer dan 2 is onnodig omdat het hier een screening betreft) en 6 controles (2 infectiecontroles waarop sectie wordt verricht bij start behandeling, 2 placebo-behandelde groeiconroles en 2 muizen behandeld met een comparator-antibioticum). (Een comparator-antibioticum is vooral van belang om het effect van voornamelijk nieuwe middelen te vergelijken met dat van een bestaand antibioticum.)

Voor mono-behandeling zijn 88 muizen nodig:

4 bacteriestammen x 8 (doses en/of sectiemomenten) x 2 muizen per groep
+
4 bacteriestammen x (2 infectiecontroles + 2 groeiconroles + 2 comparator-antibioticum controles)

Voor 10 middelen als mono-behandeling zijn theoretisch $10 \times 88 = 880$ muizen nodig.

Voor combinatie-behandeling zijn 88 muizen nodig:

Nieuwe middelen worden in het algemeen gecombineerd met bestaande middelen. Voor het bestaande middel zijn deze screeningsexperimenten niet nodig, wel voor het nieuwe middel.

4 bacteriestammen x 8 (doses en/of sectiemomenten) x 2 muizen per groep
+
4 bacteriestammen x (2 infectiecontroles + 2 groeiconroles + 2 comparator-antibioticum controles)

Voor 5 combinaties van middelen zijn theoretisch $5 \times 88 = 440$ muizen nodig.

Fase 3: Exposure-respons relatie; Studie A: Bepaling van het *in vivo* PK profiel

Voor het modelleren van het PK profiel van een middel of combinatie van middelen zijn plasma- en ELF-concentraties van de middelen nodig op voldoende tijdstippen (maximaal 12 voor het maken van een volledige PK curve) bij voldoende verschillende doses (meestal 6-8, maximaal 8 voor het maken van een volledige PK curve) in triplo (1 sample is onvoldoende i.v.m. biologische variatie, 2 samples kan voldoende zijn wanneer de verwachte biologische variatie beperkt is, meer dan 3 is onnodig omdat een hele PK-curve wordt gecreëerd). Tijdstippen worden gekozen aan de hand van beschikbare data over PK en PD in literatuur en/of uit eigen eerdere studies, en/of aan de hand van data van vergelijkbare middelen (bijvoorbeeld dezelfde antibioticum-klasse). Dit wordt gedaan voor 1 bacteriestam (het gaat erom dat de muis geïnfecteerd is; de verwachte verschillen in PK profiel tussen muizen geïnfecteerd met verschillende stammen is minimaal).

Voor mono-behandeling zijn 294 muizen nodig:

(1 bacteriestam x 12 tijdstippen x 8 doses x maximaal 3 muizen per groep)
+
(1 bacteriestam x (3 infectiecontroles + 3 groeiconroles))

Voor 10 middelen als mono-behandeling zijn theoretisch $10 \times 294 = 2.940$ muizen nodig.

Voor combinatie-behandeling zijn 588 muizen nodig:

2 middelen x 294 muizen per middel

Voor 5 combinaties van middelen zijn theoretisch $5 \times 588 = 2.940$ muizen nodig.

Fase 3: Exposure-respons relatie; Studie B: Bepaling van de effectiviteit van middelen – en daarmee met behulp van het PK profiel expositie – als mono-behandeling

Dit wordt gedaan voor maximaal 8 bacteriestammen met verschillende gevoeligheden (2 bacteriespecies, 4 stammen per species met goede, slechte en gemiddelde gevoeligheid, om inzicht te krijgen in de variatie tussen en binnen species, aantal afhankelijk van het onderzochte middel), bij 6 verschillende doses (4 vrijheidsgraden, dus minimaal $4+1=5$ doses; om te voorkomen dat een experiment herhaald moet worden, worden 6 doses gekozen), voor elke dosis maximaal 3 muizen en 9 controles (3 infectiecontroles, 3 groeiconroles, 3 comparator-antibioticum controles).

Voor mono-behandeling zijn 216 muizen nodig:

(8 bacteriestammen x 6 doses x 3 muizen per groep)
+
(8 bacteriestammen x (3 infectiecontroles + 3 groeiconroles + 3 comparator-antibioticum controles))

Voor 10 middelen als mono-behandeling zijn theoretisch $10 \times 216 = 2.160$ muizen nodig.

Voor combinatie-behandeling zijn 432 muizen nodig:

2 middelen x 216 muizen per middel

Voor 5 combinaties van middelen zijn theoretisch $5 \times 432 = 2.160$ muizen nodig.

Fase 3: Exposure-respons relatie; Studie C: Dosis-fractioneringsstudie

Dit wordt gedaan voor 2 tot maximaal 4 (vaak andere dan in studie B gebruikte, aantal afhankelijk van het onderzochte middel) bacteriestammen met verschillende gevoeligheden (geeft inzicht in de variatie tussen stammen; eenzelfde hoeveelheid stammen als in studie B is niet nodig omdat de focus in dit experiment op de doseringsschema's ligt), in maximaal 18 (mono-behandeling) of 20 (combinatie-behandeling) verschillende doseringsschema's, voor elk schema maximaal 3 muizen en voor de hele proef maximaal 9 controles (3 infectiecontroles, 3 groeicontroles, 3 comparator-antibioticum controles). Bij combinatie-experimenten zijn bovendien maximaal 6 single-drug controles (3 single-drug controles van het ene en 3 van het andere middel) per combinatie van middelen.

Voor mono-behandeling zijn 504 muizen nodig:

(8 bacteriestammen x 18 doseringsschema's x 3 muizen per groep)

+

(8 bacteriestammen x (3 infectiecontroles + 3 groeicontroles + 3 comparator-antibioticum controles))

Voor 10 middelen als mono-behandeling zijn theoretisch $10 \times 504 = 5.040$ muizen nodig.

Voor combinatie-behandeling zijn 600 muizen nodig:

(8 bacteriestammen x 20 doseringsschema's x 3 muizen per groep)

+

(8 bacteriestammen x (3 infectiecontroles + 3 groeicontroles + 3 comparator-antibioticum controles))

+

(8 bacteriestammen x (3 single-drug controles middel 1 + 3 single-drug controles middel 2))

Voor 5 combinaties van middelen zijn theoretisch $5 \times 600 = 3.000$ muizen nodig.

Fase 4: Validatie van de PK/PD voor de bepaling van de farmacodynamische target en de variatie daarin tussen stammen ter ondersteuning van breekpunt bepaling

Dit wordt gedaan voor minimaal 4 tot maximaal 6 andere bacteriestammen dan de eerder gebruikte stammen (geeft, gecombineerd met data uit studies B en C, fase 2, een uitgebreid inzicht in de variatie tussen stammen, bij verschillende doseringsschema's; aantal afhankelijk van het onderzochte middel), in 12 verschillende doseringsschema's (bijv. 3 schema's voor het ene en 4 schema's voor het andere middel; gekozen wordt voor de meest belovende schema's uit studie B voor een uitgebreider stammenpanel), voor elk schema maximaal 3 muizen, 9 controles (3 infectiecontroles, 3 groeicontroles, 3 comparator-antibioticum controles) en voor combinaties van middelen bovendien maximaal 6 single-drug controles (3 single-drug controles van het ene en 3 van het andere middel).

Voor mono-behandeling zijn 270 muizen nodig:

(6 bacteriestammen x 12 doseringsschema's x 3 muizen per groep)

+

(6 bacteriestammen x (3 infectiecontroles + 3 groeicontroles + 3 comparator-antibioticum controles))

Voor 10 middelen als mono-behandeling zijn theoretisch $10 \times 270 = 2.700$ muizen nodig.

Voor combinatie-behandeling zijn 306 muizen nodig:

(6 bacteriestammen x 12 doseringsschema's x 3 muizen per groep)
+
(6 bacteriestammen x (3 infectiecontroles + 3 groeicontroles + 3 comparator-antibioticum controles))
+
(6 bacteriestammen x (3 single-drug controles middel 1 + 3 single-drug controles middel 2))

Voor 5 combinaties van middelen zijn theoretisch $5 \times 306 = 1.530$ muizen nodig.

Fase 5: Effect van verschillende doseringsverhoudingen van twee middelen

Dit wordt gedaan voor 2 verschillende bacteriestammen (geeft, gecombineerd met de resultaten van experimenten uit fases 3 en 4 een vrijwel volledig inzicht in de variatie tussen stammen bij verschillende doseringsschema's; aantal afhankelijk van het onderzochte middel), in 6 verschillende doseringsschema's per middel (dus maximaal 6 schema's voor het ene en 6 schema's voor het andere middel; 4 vrijheidsgraden, dus minimaal 5 schema's; om te voorkomen dat een experiment herhaald moet worden, worden 6 schema's gekozen), voor elk schema maximaal 3 muizen. (Dit is een *in vivo* checkerboard assay.) De focus in dit experiment ligt op de doseringsschema's die voor een klein stammenpanel worden bestudeerd. Daarnaast zijn maximaal 18 infectiecontroles, 18 groeicontroles en 18 comparator-antibioticum controles nodig voor de hele proef.

Voor combinatie-behandeling zijn 324 muizen nodig:

(2 bacteriestammen x 36 doseringsschema's x 3 muizen per groep)
+
(2 bacteriestammen x (18 infectiecontroles + 18 groeicontroles + 18 comparator-antibioticum controles))

Voor 5 combinaties van middelen zijn theoretisch $5 \times 324 = 1.620$ muizen nodig.

Voor één succesvol middel als mono-behandeling zijn in totaal maximaal $88+294+216+504+270= 1.372$ muizen nodig.

Voor één succesvolle combinatie van middelen zijn in totaal maximaal $88+588+432+600+306+324= 2.338$ muizen nodig.

Voor 10 middelen als mono-behandeling zijn theoretisch $10 \times 1.372 = 13.720$ muizen nodig. Voor 5 combinaties van middelen zijn theoretisch $5 \times 2.338 = 11.690$ muizen nodig. Echter, niet alle (combinaties van) middelen zullen even succesvol zijn en deze zullen in verschillende stadia van het *in vivo* onderzoek afvallen ten gevolge van de GO/NO GO-criteria. Op basis van ervaring weten we dat waarschijnlijk ongeveer 1/3 deel van het theoretisch aantal benodigde muizen nodig is. $(13.720 + 11.690) : 3 = 8.470$ muizen.

In totaal zijn hiermee maximaal 540 (fase 1) + 8.470 (fases 2-5) = 9.010 muizen nodig.

Geslacht

Standaardisatie van het model is belangrijk om resultaten onderling te kunnen vergelijken. Er is meestal een directe correlatie tussen de PK/PD indexen in vrouwelijke proefdieren en mensen (vrouw én man) voor verschillende antibiotica. Wanneer studies worden uitgevoerd bij vrouwelijke muizen hoeven de resultaten daarom niet ook nog eens bij mannelijke muizen bevestigd te worden. Het gaat immers primair om de concentratie-effect relatie. (Nota bene, de doseringen om die concentraties te bereiken kunnen wel verschillend zijn tussen man en vrouw).

	<p>In het in de literatuur beschreven dijspiermodel wordt gebruik gemaakt van vrouwelijke muizen. Door in dit project ook vrouwelijke muizen te gebruiken kunnen resultaten vergeleken worden met eerder verkregen resultaten (literatuur en eigen data). Door voor de bepaling van het PK profiel alleen vrouwelijke dieren te gebruiken wordt een zeer gestandaardiseerd PK profiel bepaald met weinig variatie. Alleen bij een PK profiel met weinig variatie is het mogelijk de groeps groottes in de proeven voor bepaling van de exposure-respons relatief klein te houden. Daarnaast zijn mannelijke muizen vanwege hun agressievere gedrag moeilijker in groepen te huisvesten.</p>
Genetisch gewijzigd	N.v.t.
Stam	Bij voorkeur worden CD-1 muizen gebruikt. Deze stam wordt ook in het dijspiermodel beschreven in de literatuur gebruikt.

C. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

Ja

Nee > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

D. Pijn en welzijnsaantasting

Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?

Nee >

Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

De mogelijke pijn die veroorzaakt wordt door lokale ontsteking en ziekte zal worden geminimaliseerd door gebruik van adequate analgetica waarvan gebleken is dat zij niet interfereren met de infectie. Pijnbestrijding zal worden toegepast bij alle dieren in alle experimenten voordat gestart wordt met behandeling met de verschillende middelen. In verband met standaardisatie ontvangen alle dieren analgesie. Omdat op voorhand niet bekend is welke therapie effectief is (dit is de vraagstelling van het onderzoek) kan er niet alleen aan de niet of slecht behandelde muizen pijnbestrijding gegeven worden. De eerste injectie zal zijn vlak voor de eerste behandeling. De dosis wordt zodanig gekozen dat deze 12 uur effectief is en pijn door ontsteking en ziekte voorkomt. Op dat moment wordt een volgende injectie gegeven, wat elke 12 uur herhaald wordt tot aan het einde van de proef. Uit eerdere experimenten binnen onze onderzoeksgroep en andere onderzoeksgroepen is gebleken dat toepassing van analgetica niet interfereert met het PK profiel van de tot nu toe onderzochte middelen. We verwachten dat dit ook voor andere middelen niet het geval zal zijn. Theoretisch zou wel een controlegroep meegenomen moeten worden zonder analgesie om dit uit te sluiten. Omdat er inmiddels vele middelen zijn bestudeerd waarbij gebruik wordt gemaakt van deze vorm van pijnstilling (door onszelf in eerder onderzoek en door andere onderzoeksgroepen) vinden wij het aannemelijk dat deze vorm van analgesie ook niet met het PK profiel van andere middelen zal interfereren. Het zou bovendien – als er al interferentie zou zijn – een systematische afwijking betreffen van het PK profiel. Ook de dieren waar het PK profiel bij is bepaald hebben immers deze pijnstilling gehad. Een extra controlegroep zou om extra dieren vragen zonder dat dit ook maar enige bijdrage levert aan de uitkomst van de experimenten. In uitzonderlijke gevallen duren experimenten langer dan 48 uur, tot maximaal 7 dagen. In die gevallen zal pijnbestrijding gedurende de eerste 48 uur worden toegepast, om mogelijke bijwerkingen van langdurige pijnbestrijding zo veel mogelijk te voorkomen.

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Wanneer de infectie onbehandeld blijft of wanneer de behandeling niet effectief is, dan zullen de achterpoten van het dier ontstoken raken. Hierdoor kunnen ze deze niet meer goed gebruiken en zullen ze zich vooral met de voorpoten voortbewegen. In sommige gevallen zal de infectie dissemineren en ontaarden in een sepsis. In beide gevallen worden de dieren direct geëuthanaseerd. Wel willen we benadrukken dat de experimenten meestal maar 24 uur, soms 48 uur en maar bij uitzondering langer dan 48 uur (na start behandeling) duren. Deze klinische effecten komen in de meeste gevallen pas na 24 uur tot uiting.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Stress kan ontstaan door experimentele handelingen (hanteren, infecteren, injecties, euthanasie onder anesthesie). Ziekte kan ontstaan door de bacteriële infecties bij niet-effectieve doseringsschema's of bijwerkingen van de middelen.

Beschrijf welke maatregelen worden genomen om deze schadelijke effecten te voorkomen of waar mogelijk te minimaliseren.

Stress door experimentele handelingen kan niet worden voorkomen. Handelingen zullen alleen uitgevoerd worden door competente medewerkers die getraind zijn om met muizen te werken. Bij het bereiken van de humane eindpunten zal het dier worden geëuthanaseerd. Euthanasie vindt plaats onder anesthesie.

E. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

Nee > Ga verder met vraag F.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

De dieren worden gescoord met 0, 1 of 2 op de volgende criteria:

- a) Gewichtsverlies (afname van 20% of meer binnen 48 uur of 15% of meer binnen 24 uur na infectie)
- b) Temperatuurdaling tot 34°C of lager
- c) Uitdroging
- d) Donkere ogen
- e) Opstaande vacht
- f) Lethargie of hyperactiviteit door disseminatie van infectie naar de hersenen
- g) Tollen (bij infectie van de hersenen)

Als de totale score geteld over meerdere dagen hoger dan 7 is, dan wordt het dier zonder uitstel geëuthanaseerd en bemonsterd.

Wanneer bij a, b, f of g een 2 (ernstig aanwezig) gescoord wordt, dan moet het dier direct uit het experiment genomen worden.

Het is belangrijk dat voorkomen wordt dat de eindpunt criteria al (te) scherp worden gedefinieerd, waardoor het wetenschappelijk eindpunt niet zou worden bereikt en het doel van de proef niet wordt gerealiseerd.

Bij termineren van de dieren voordat het ongerief hoog wordt kan de vraagstelling niet worden beantwoord. Voor de vraagstelling is het van groot belang dat het doseringsschema kan worden afgemaakt. Dit schema wordt opgesteld aan de hand van gegevens uit literatuur en op basis van resultaten van onze eigen *in vitro* experimenten. Het schema wordt niet langer gemaakt dat strikt noodzakelijk is. Als er doseringsschema's of tijdstippen missen doordat dieren voortijdig geëuthanaseerd worden, dan kan de exposure-response relatie (farmacodynamische index en farmacodynamische target) niet of minder nauwkeurig worden berekend. Daardoor zullen de proeven met een aangepast doseringsschema moeten worden herhaald en zijn ook opnieuw de bijbehorende controledieren nodig. Bij een kleine groep dieren zal dit dus mogelijk leiden tot relatief hoger ongerief, maar het voorkomt wel dat proeven herhaald moeten worden.

Welk percentage van de dieren loopt per diersoort kans deze criteria te halen?

Ziekte komt in de meeste gevallen pas na 24 uur tot uiting. Bij proeven in fase 1 blijven dieren onbehandeld, en dieren waarbij het inoculum te hoog worden hebben een grotere kans het humane eindpunt te bereiken. Ingeschat is dat bij maximaal de helft van de dieren het humane eindpunt wordt bereikt.

Voor fase 1: maximaal 50%

Proeven waarbij het PK profiel (fase 3, studie A) wordt bepaald duren over het algemeen niet langer dan 24 uur (na start behandeling) en voor het grootste aantal groepen korter, waardoor de kans op het bereiken van de humane eindpunten klein is.

Voor PK-proeven (fase 3, studie A): 5%

Proeven waarbij de exposure-respons relatie wordt bepaald (fase 2, fase 3 studie B en C, fase 4, fase 5) duren meestal 24 uur (na start behandeling), maar in sommige gevallen langer dan 48 uur, maximaal 7 dagen na start therapie. In die gevallen kan het voorkomen – afhankelijk van de effectiviteit van de (combinatie van) middelen – dat de humane eindpunten bereikt worden.

Voor exposure-respons proeven (fase 2, fase 3 studie B en C, fase 4, fase 5): 15%

F. Classificatie van ongerief

Benoem de experiment gebonden factoren die bijdragen aan het ongerief en geef voor elk van deze factoren aan hoe het ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig'. Geef per diersoort en behandelgroep het cumulatieve ongerief aan in percentages van het totale aantal dieren.

Het ongerief ten gevolge van de experimentele handelingen is voor alle dieren ingeschat op matig:

Dag -4 en -1: IP cyclofosfamide, wegen

T = ± -2h: IM infectie in beide dijspieren

T = 0: behandeling, meestal SC

T = ...: behandeling, meestal SC, frequentie afhankelijk van doseringsschema, maximaal 18 toedieningen per maximaal 7 dagen; bij aanleiding wegen en temperaturen (infrarood thermometer)

Daarnaast kan er ongerief zijn ten gevolge van de infectie. Bij (te) lage inocula, bij middelen die succesvol blijken, bij middelen zonder bijwerkingen en bij groepen waarbij sectie vroeg na start behandeling plaatsvindt zal het ongerief ten gevolge van infectie minder hoog zijn. Echter, bij welke inocula en middelen dit het geval is, is van tevoren niet te voorspellen; dit is de onderzoeksvraag.

Bij dieren die de humane eindpunten niet bereiken is het totale ongerief ingeschat op matig; bij dieren die de humane eindpunten wel bereiken is het totale ongerief nu ingeschat op ernstig. Naar verwachting is dit 50% van de dieren in fase 1-studies (Aanpassen van de bestaande modellen), 5% van de dieren in PK proeven (fase 3, studie A) en 15% van de dieren in exposure-respons proeven (fase 2, fase 3 studie B en C, fase 4, fase 5). In absolute aantallen geldt onderstaande beredeneerde schatting:

Fase 1: Aanpassen van de bestaande modellen

Bij deze proeven zal maximaal 50% van de muizen (n=270) de humane eindpunten bereiken ten gevolge van te hoge inocula. Bij deze muizen is het totale ongerief ingeschat op ernstig. Bij de overige 50% (=270 muizen) zal het inoculum te laag of goed zijn; bij deze muizen is het totale ongerief ingeschat op maximaal matig.

PK-proeven (fase 3, studie A):

5% van de dieren in PK-experimenten ondervindt ernstig ongerief (inschatting o.b.v. ervaringen in het verleden met dergelijke experimenten). In deze experimenten worden per middel maximaal 294 muizen gebruikt (voor een combinatie komt dit dus neer op $2 \times 294 = 588$ muizen). Voor 10 succesvolle mono-behandelingen en 5 combinatie-behandelingen zouden dit $10 \times 294 + 5 \times 588 = 5.880$ muizen zijn. $1/3$ van het totaal aantal muizen is nodig i.v.m. uitval ten gevolge van de GO/NO GO criteria: $5.880 : 3 = 1.960$ muizen. 5% hiervan zal ernstig ongerief ondervinden: $1.960 \times 0,05 = 98$ muizen die ernstig ongerief ondervinden. De overige dieren ($1.960 - 98 = 1.862$ muizen) ondervinden matig ongerief.

Exposure-respons proeven (fase 2, fase 3 studie B en C, fase 4, fase 5):

15% van de dieren in PK/PD-experimenten ondervindt ernstig ongerief (inschatting o.b.v. ervaringen in het verleden met dergelijke experimenten). In deze experimenten worden per mono-behandeling maximaal 88 (fase 2) + 216 (fase 3 studie B) + 504 (fase 3 studie C) + 270 (fase 4) = 1.078 muizen gebruikt; per combinatie-behandeling maximaal 88 (fase 2) + 432 (fase 3 studie B) + 600 (fase 3 studie C) + 306 (fase 4) + 324 (fase 5) = 1.750 muizen. Voor 10 succesvolle mono-behandelingen en 5 combinatie-behandelingen zouden dit $10 \times 1.078 + 5 \times 1.750 = 19.530$ muizen zijn. 1/3 van het totaal aantal muizen is nodig i.v.m. uitval ten gevolge van de GO/NO GO criteria: $19.530 : 3 = 6.510$ muizen. 15% hiervan zal ernstig ongerief ondervinden: $6.510 \times 0,15 = 976$ muizen die ernstig ongerief ondervinden. De overige dieren ($6.510 - 976 = 5.534$ muizen) ondervinden matig ongerief.

Totaal:

Matig ongerief: 270 (fase 1) + 1.862 (PK-proeven) + 5.534 (exposure-respons proeven) = 7.666 muizen

Ernstig ongerief: 270 (fase 1) + 98 (PK-proeven) + 976 (exposure-respons proeven) = 1.344 muizen

Totaal: $7.666 + 1.344 = 9.010$ muizen

G. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welke keuzes daarbij zijn gemaakt.

Vervanging	<p>Voordat middelen in dieren getest worden, zijn ze reeds <i>in vitro</i> getest. Alleen de (combinaties van) middelen met potentie om <i>in vivo</i> werkzaam te kunnen zijn, zullen in dieren onderzocht worden.</p> <p>Op basis van de data die wordt verkregen uit het <i>in vivo</i> en het <i>in vitro</i> onderzoek kan de stap naar klinische studies worden gemaakt, omdat de exposure-respons relaties in dit model goed overeenkomen met de verwachte respons bij patiënten. Ook voor het opstellen of herzien van de productinformatie van middelen is deze data nodig. De European Medicines Agency (EMA) heeft het voornemen om de productinformatie van bestaande antibiotica de komende jaren te herzien onder andere aan de hand van informatie gegenereerd in diermodellen die relevant zijn voor de latere indicatie. Voor colistine is dit inmiddels gebeurd. Vervangen van deze dierproeven is daarom niet mogelijk.</p>
Vermindering	<p>Door de gestandaardiseerde opzet van de proeven kunnen de resultaten verkregen voor een middel (of combinatie) goed vergeleken worden met die voor een ander middel (of combinatie), verkregen in dit project, eerdere projecten, of beschreven in de literatuur. Ook is door de gekozen gestandaardiseerde opzet slechts een beperkt aantal onbehandelde controledieren nodig.</p> <p>Voor het bepalen van een standaard exposure-respons curve wordt het minimale aantal dieren gebruikt waarvan verwacht mag worden dat daarmee het effect kan worden beschreven, zonder de noodzaak tot veelvuldig herhalen van de proef. Dit laatste zou bovendien extra controledieren vragen.</p> <p>Door het hanteren van heldere GO/NO GO-criteria worden middelen die al in een vroeg stadium van het onderzoek blijken geen potentie te hebben om <i>in vivo</i> werkzaam te zijn niet verder onderzocht en wordt onnodig proefdiergebruik voorkomen. Experimentele middelen worden vaak voor 1 bacteriesoort ontwikkeld. Bij screening op vroege bacteriedodende activiteit (fase 2) worden dan niet meteen 4 bacteriestammen gebruikt voor infectie, maar eerst 1 stam. Als het middel dan geen activiteit vertoont, is dit een NO GO. Deze experimenten worden met kleine groepen ($n=2$) uitgevoerd, dit is voldoende om eventueel aanwezige vroege bacteriedodende activiteit te zien.</p>

	<p>Alle andere experimenten worden uitgevoerd met minimaal 2 en maximaal 3 muizen per groep. Het definitieve aantal dieren per groep wordt bepaald aan de hand van de te verwachten inter-individuele variatie. Bij kleine inter-individuele variatie kan volstaan worden met 2 muizen per groep; bij grotere variatie (ondanks de standaardisatie van het model) zijn 3 muizen per groep noodzakelijk. Wanneer 2 muizen per groep nodig zijn, dan zijn uiteraard ook in totaal per middel of per combinatie minder dieren nodig; de berekeningen zijn gemaakt op basis van 3 dieren per groep.</p> <p>Wanneer voor concentratie-bepaling van middelen kan volstaan met een kleine hoeveelheid plasma, dan wordt ook tijdens het experiment bloed afgenomen bij de muizen. Dit leidt tot een reductie van het aantal sectie-momenten, en dus tot reductie van het benodigd aantal proefdieren.</p> <p>In geval van nieuwe antibiotica is een comparator-antibioticum nodig als controle om het effect van het nieuwe antibioticum mee te vergelijken. De noodzaak voor deze controlegroep is er bij bestaande antibiotica niet altijd. Daarom kan deze groep in voorkomende gevallen vervallen, wat leidt tot een vermindering van het benodigd aantal dieren.</p> <p>In een aantal gevallen kunnen 2 verschillende bacteriestammen per muis gebruikt worden, 1 stam per dijspier. Dit gaat op voor stammen waarvan bekend is dat beide infecties geen invloed hebben op elkaars beloop. Alleen in die gevallen kan het benodigd aantal muizen gehalveerd worden, omdat per muis 2 bacteriestammen worden gebruikt.</p> <p>De proefopzet van de proeven wordt voorgelegd aan de IvD. Hierbij wordt het aantal dieren gedetailleerd verantwoord.</p> <p>Door het gebruik van computermodellen voor bepaling van het PK profiel en de exposure-respons relatie, zijn – op basis van jarenlange eigen ervaring en gepubliceerde literatuur – minimaal 2 dieren en maximaal 3 dieren per groep voldoende om met voldoende power de parameters te bepalen. (De uiteindelijke groeps grootte hangt af van de verwachte inter-individuele variatie.) Vermindering van deze aantallen of vermindering van het aantal datapunten zou leiden tot onvoldoende power.</p>
Verfijning	<p>Voor de <i>in vivo</i> doseringen wordt rekening gehouden met hetgeen bekend is over toxiciteit en/of tolerantie van de middelen, de minimaal toxische dosis of de maximaal getolereerde dosis is de hoogste dosis die <i>in vivo</i> wordt getest voor het bepalen van exposure-response relaties.</p> <p>De geïntroduceerde infectie zal bij de hogere doseringen niet leiden tot een uitgebreide infectie.</p> <p>Dosering van cyclofosfamide via de intraperitoneale route is zo geoptimaliseerd dat ziekte door neutropenie zo minimaal mogelijk is.</p> <p>De ernst van de welzijnsaantasting wordt verder zoveel mogelijk beperkt door het in acht nemen van de humane eindpunten.</p> <p>Door dieren in groepen te huisvesten met gepaste kooiverrijking wordt de proef verder verfijnd.</p> <p>Zo veel als mogelijk is zal het werken met bacteriestammen die ernstig ongerief kunnen veroorzaken vermeden worden. Echter, soms is dit niet mogelijk vanwege de klinische relevantie van deze stammen.</p>

Proeven waarin het PK profiel wordt bepaald zijn slechts van relatief korte duur, waardoor de ziekte nog niet veel progressie heeft gemaakt.

Voor nieuwe antibiotica, non-antibiotica en voor sommige oude antibiotica geldt dat onbekend is bij welk doseringsschema ze antibacterieel effectief zijn. Doseringsschema's die niet effectief blijken te zijn, zullen relatief meer ongerief kunnen veroorzaken dan succesvolle schema's. Omdat dit de vraagstelling van het onderzoek is, kan in de keuze van middelen en doseringsschema's, die gemaakt worden op basis van literatuur en verwachtingen, geen verdere verfijning plaatsvinden.

Ongerief wordt zo veel mogelijk geminimaliseerd door gebruik van adequate analgetica.

Hoewel we ons realiseren dat een doseringsschema met relatief korte intervallen tussen de dosering ongerief veroorzaakt, is er momenteel geen alternatief. Het gebruik van automatische pompjes (zoals ALZET pompjes) is niet mogelijk vanwege de instabiliteit van de meeste middelen. Daarnaast is dit voor combinaties van middelen – waarbij de doseringsfrequentie van het ene middel wel en het andere middel niet wordt gevarieerd – niet mogelijk. Middelen worden indien mogelijk wel gemengd in de spuit, zodat per dosismoment maar een keer toegediend hoeft te worden.

Zijn er nadelige milieueffecten te verwachten?

Nee

Ja > Benoem de te verwachten milieueffecten en geef aan welke maatregelen zijn genomen om deze tot een minimum te beperken.

H. Hergebruik

Worden er dieren ingezet die eerder in een andere dierproef zijn gebruikt?

Nee, ga verder met vraag I.

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico op) ernstig ongerief?

Nee

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

I. Herhaling

Geef voor wettelijk vereist onderzoek aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing, geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

N.v.t., dit betreft geen wettelijk vereist onderzoek.

J. Plaats waar de dierproef wordt uitgevoerd

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder Wod valt?

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

K. Bestemming van de dieren bij einde experiment

Worden de dieren gedood?

Nee > Beschrijf de bestemming van de dieren.

Ja > Geef aan waarom de dieren worden gedood.

Aan het eind van de proef worden de dieren geëuthanaseerd voor het verzamelen van bloed, dijspieren en relevante organen en het verrichten van BAL. Uit deze materialen wordt het optimale bacterieel inoculum en de PK/PD relatie bepaald.

Indien dieren worden gedood, wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van Richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja > Betreft het een dodingsmethode die alleen onder specifieke voorwaarden mag worden toegepast?

Nee > Beschrijf de dodingsmethode

Cervicale dislocatie (onder isofluraan-anesthesie) of CO₂ verstikking.

De onderzoeksgroep is zeer ervaren met deze methode van doden. Het is een snelle methode met kortdurend lijden voor het proefdier. Na nekbreek kan BAL worden uitgevoerd en kunnen dijspieren en relevante organen worden verzameld.

Ja > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Indien dieren worden gedood, maar niet in het kader van de proef, geef aan of herplaatsing is overwogen en waarom hiervan is afgezien.

De dieren worden alleen in het kader van de proeven gedood of om welzijnsproblemen te voorkomen door gebruik van humane eindpunten.



Bijlage

Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u in de 'Toelichting op de te gebruiken formulieren voor de aanvraag van een projectvergunning' op de website www.centralecommissiedierproeven.nl
- Of neem telefonisch contact op (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in. 5.1 lid2h
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in. 5.1 lid2h
- 1.3 Vul het volgnummer en de titel van de dierproef in.
- | Volgnummer | Titel dierproef |
|------------|-----------------|
| 2 | Longmodel |

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.3 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

Middelen en combinaties van middelen zullen volgens de gestandaardiseerde aanpak van het PK/PD onderzoek worden bestudeerd, in het dijspier- en/of het longmodel. In deze modellen wordt gebruik gemaakt van neutropene muizen. Deze bijlage beschrijft het longmodel.

Wanneer gewerkt gaat worden met nog niet eerder door de onderzoeksgroep gebruikte klinisch relevante bacteriestammen, zal het bestaande en in de literatuur uitgebreid beschreven longmodel voor deze stammen worden aangepast. De onderzoeksgroep heeft veel ervaring met een ruim aantal species, waaronder *Escherichia coli* en *Klebsiella pneumoniae*. Voor deze species is bekend dat een standaard inoculum leidt tot een reproduceerbare infectie. Voor een aantal andere species, zoals *Pseudomonas aeruginosa* en *Acinetobacter baumannii*, is bekend dat het geschikte inoculum voor een reproduceerbare infectie stam-afhankelijk is.

Fase 1. Aanpassen van de bestaande modellen

Indien nodig wordt het bestaande longmodel aangepast voor klinisch relevante bacteriestammen. Er zal bepaald worden welk inoculum leidt tot een reproduceerbare infectie.

Primaire uitkomstparameter: het ontstaan van een reproduceerbare infectie, waarbij de inter-individuele variatie beperkt is, waarbij de bacteriële load voldoende hoog is, maar die niet leidt tot ernstige sepsis.

GO/NO GO: Wanneer een bacteriestam niet leidt tot een reproduceerbare infectie, zal niet verder gewerkt worden met deze stam.

Na deze aanpassing zal gestart worden met het daadwerkelijke PK/PD onderzoek. Voor geheel nieuwe middelen zal gestart worden met fase 2. Voor alle andere middelen zal gestart worden met fase 3.

In alle gevallen gelden onderstaande entrée criteria voor fase 2 (nieuwe middelen) respectievelijk fase 3 (bestaande middelen):

1. Uit *in vitro* onderzoek moet blijken dat het middel activiteit vertoont tegen de geselecteerde bacterie, en
2. Toxiciteits- en/of tolerantiegegevens moeten beschikbaar zijn.

Fase 2. Screening op vroege bacteriedodende activiteit

Alleen voor geheel nieuwe middelen waarvan nog geen informatie is over de aanwezigheid van *in vivo* activiteit/effectiviteit worden screeningsexperimenten uitgevoerd naar de vroege bacteriedodende activiteit. Neutropene, geïnficeerde muizen worden behandeld met het middel, per os of parenteraal, de route die het meest passend is op basis van verwachtingen aan de hand van bijvoorbeeld de structuur of antibioticum-klasse (meestal SC, IM, IV, IP of soms per maagsonde). Daarbij wordt het maximaal toe te dienen volume voor die route in acht genomen (Principles of Laboratory Animal Science revised edition, Van Zutphen 2001, tabel 16-1).

Primaire uitkomstparameter: bacteriële load in de longen in behandelde vs onbehandelde muizen.

GO/NO GO: Als een nieuw middel:

1. geen vroege bacteriedodende of bacteriostatische activiteit vertoont, of
2. in combinatie met een ander middel waarschijnlijk geen bacteriedodende of bacteriostatische activiteit zal vertonen (bijvoorbeeld in geval van een antibioticum gecombineerd met remmers van beta-lactamase enzymen, waarvan de laatste meestal zelf geen activiteit hebben)

dan valt dit middel af na deze fase.

Door uitvoering van deze proef met een klein aantal dieren wordt een eerste indruk gekregen of het nieuwe middel *in vivo* werkzaam kan zijn. Als dit niet het geval is, hoeven geen uitgebreide PK en PD studies gedaan te worden. Dit voorkomt onnodig gebruik van proefdieren.

Fase 3: Exposure-respons relatie

In deze fase worden het *in vivo* PK profiel en de effectiviteit van middelen (met een vaste doseringsfrequentie of met verschillende doseringsfrequenties) bepaald en aan elkaar gerelateerd. De volgorde van deze experimenten is afhankelijk van de beschikbare informatie uit literatuur, eerder verkregen data en/of data beschikbaar van partners. Wanneer er bijvoorbeeld al concrete aanwijzingen zijn over het PK profiel van een middel, dan zal eerst naar de effectiviteit van het middel gekeken worden, en later alsnog naar het PK profiel (in hetzelfde proefdiermodel). Wanneer er al duidelijkheid is over de meest geschikte doseringsfrequentie van het middel, dan zal een dosis-fractioneringsstudie (met verschillende doseringsfrequenties van het middel) minder prioriteit hebben, en pas na bepaling van het PK profiel en de effectiviteit (met een vaste doseringsfrequentie van het middel) worden geconfirmeerd.

Na elke studie binnen deze fase volgt een GO/NO GO moment waarop bepaald wordt of het zinvol is om door te gaan met de andere studies in deze fase, of naar de volgende fase. De GO/NO GO-criteria zijn onderstaand per studie vermeld.

Studie A: Bepaling van het *in vivo* PK profiel

Voor alle (combinaties van) middelen wordt het PK profiel (concentraties van het middel in de tijd bij verschillende doses) bepaald. Neutropene, geïnficeerde muizen worden éénmalig (of, in specifieke situaties, meerdere malen, maximaal 3 keer) behandeld, waarna op verschillende tijdstippen de muizen worden gedood om het concentratieverloop van het middel te bepalen.

Primaire uitkomstparameter: concentratie van het middel in de loop van de tijd.

GO/NO GO: Verdere studies met dit middel worden alleen uitgevoerd als de PK studie aantoont dat het middel werkzaam zou kunnen zijn, bijvoorbeeld wanneer middelen een veelbelovend concentratiebeloop laten zien, zoals concentraties die lange tijd boven de minimaal remmende concentratie (MRC) blijven of een gunstige verhouding hebben tussen topspiegel en de MRC.

Op basis van de resultaten van de *in vitro* assays en van het (te verwachten of aangetoonde) PK profiel in het dier worden doseringsschema's gekozen voor studies naar de effectiviteit van middelen.

Studie B: Bepaling van de effectiviteit van middelen – en daarmee met behulp van het PK profiel expositie – als mono-behandeling

De exposure-respons relatie van de (combinatie van) middelen wordt bepaald. Hiervoor wordt de effectiviteit van de middelen als mono-behandeling bepaald. Neutropene, geïnficeerde muizen worden behandeld met verschillende doseringsschema's met een vaste doseringsfrequentie.

Primaire uitkomstparameter: bacteriële load in de longen in behandelde vs onbehandelde muizen, en daarmee de bacteriostatische dosis (dosis waarbij geen uitgroei van de bacterie plaatsvindt) van het middel als mono-behandeling.

GO/NO GO: Als een middel:

1. geen bacteriedodende of bacteriostatische activiteit vertoont, of
2. in combinatie met een ander middel waarschijnlijk geen bacteriedodende of bacteriostatische activiteit zal vertonen (bijvoorbeeld in geval van een antibioticum gecombineerd met remmers van beta-lactamase enzymen, waarvan de laatste meestal zelf geen activiteit hebben)

dan valt dit middel af na deze studie.

Studie C: Dosis-fractioneringsstudie

De exposure-respons relatie van de (combinatie van) middelen wordt verder onderzocht. Hiervoor wordt een dosis-fractioneringsstudie uitgevoerd. Neutropene, geïnfecteerde muizen worden behandeld met verschillende doseringsschema's met verschillende doseringsfrequenties van een middel of combinatie van middelen.

Primaire uitkomstparameter: bacteriële load in de longen in behandelde vs onbehandelde muizen, en daarmee bepaling van de PK/PD index die de exposure-respons relatie het beste beschrijft.

GO/NO GO: Als een middel:

1. geen bacteriedodende of bacteriostatische activiteit vertoont, of
2. in combinatie met een ander middel waarschijnlijk geen bacteriedodende of bacteriostatische activiteit zal vertonen (bijvoorbeeld in geval van een antibioticum gecombineerd met remmers van beta-lactamase enzymen, waarvan de laatste meestal zelf geen activiteit hebben)

dan valt dit middel af na deze studie.

Fase 4: Validatie van de PK/PD voor de bepaling van de farmacodynamische target en de variatie daarin tussen stammen ter ondersteuning van breekpunt bepaling

Na deze fase 3-studies wordt de waarde van de PK/PD index gevalideerd voor een aantal andere bacteriestammen. Ook wordt in deze fase gekeken naar de variatie tussen stammen.

Primaire uitkomstparameter: bacteriële load in de longen in behandelde vs onbehandelde muizen, en daarmee validatie van de PK/PD index en bepaling van de PD target.

Fase 5: Effect van verschillende doseringsverhoudingen van twee middelen

Deze fase wordt alleen uitgevoerd voor combinaties van middelen. Er wordt een *in vivo* checkerboard experiment uitgevoerd. Neutropene, geïnfecteerde muizen worden behandeld met verschillende doseringsverhoudingen van twee middelen.

Primaire uitkomstparameter: bacteriële load in de longen in behandelde vs onbehandelde muizen, en daarmee het effect van verschillende doseringsverhoudingen van twee middelen.

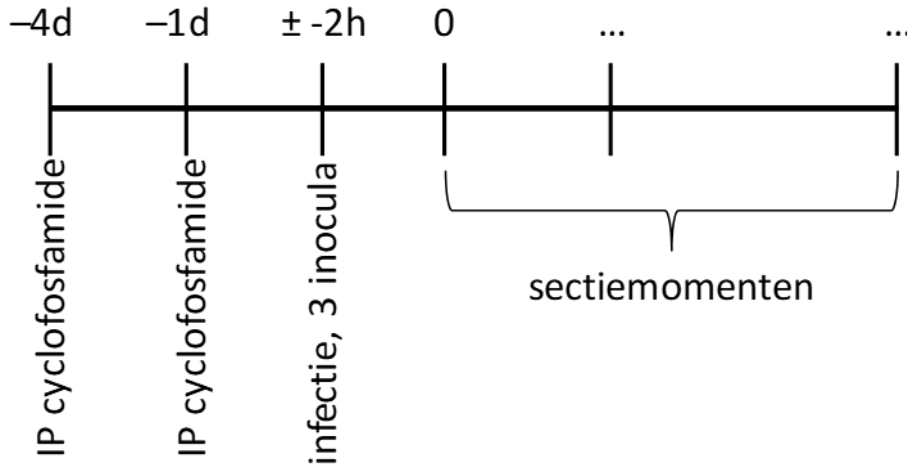
Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

In alle proeven zal infectie worden aangebracht onder adequate anesthesie. Ongerief wordt zo veel mogelijk geminimaliseerd door gebruik van adequate analgetica. Alle dieren in alle experimenten zullen deze analgesie ontvangen. Euthanasie zal plaatsvinden onder adequate anesthesie. Ongerief wordt gedurende het experiment geregistreerd op een score sheet, waarbij de humane eindpunt criteria worden meegenomen. Hiervoor worden de muizen gewogen (dag -4, dag -1, na infectie wanneer daar aanleiding toe is) en temperatuur (infrarood thermometer) wordt gemeten (na infectie wanneer daar aanleiding toe is).

Fase 1: Aanpassen van de bestaande modellen

Muizen worden neutropeen gemaakt door voorbehandeling met cyclofosfamide (IP op dag -4 en dag -1 voor infectie). Op dag 0 worden de muizen onder narcose geïnfecteerd in beide dijspieren met een van de drie bacteriële inocula. Op het moment dat normaliter behandeling wordt gestart (2 uur na infectie), op het moment dat normaliter behandeling wordt beëindigd (meestal 24 uur na start behandeling), en op een tussenliggend tijdstip (afhankelijk van de bacteriestam) worden groepen dieren gedood voor bepaling van de bacteriële load in de longen. Het inoculum dat leidt tot een reproduceerbare infectie wordt gekozen voor vervolgonderzoek.

Deze experimenten duren in het algemeen maximaal 26 uur (Figuur 1). In een beperkt aantal experimenten zal zo nodig ook na 48 en/of 72 uur een verificatie plaatsvinden. Dit kan bijvoorbeeld het geval zijn wanneer de bacteriestam minder snel dan verwacht blijkt te groeien.



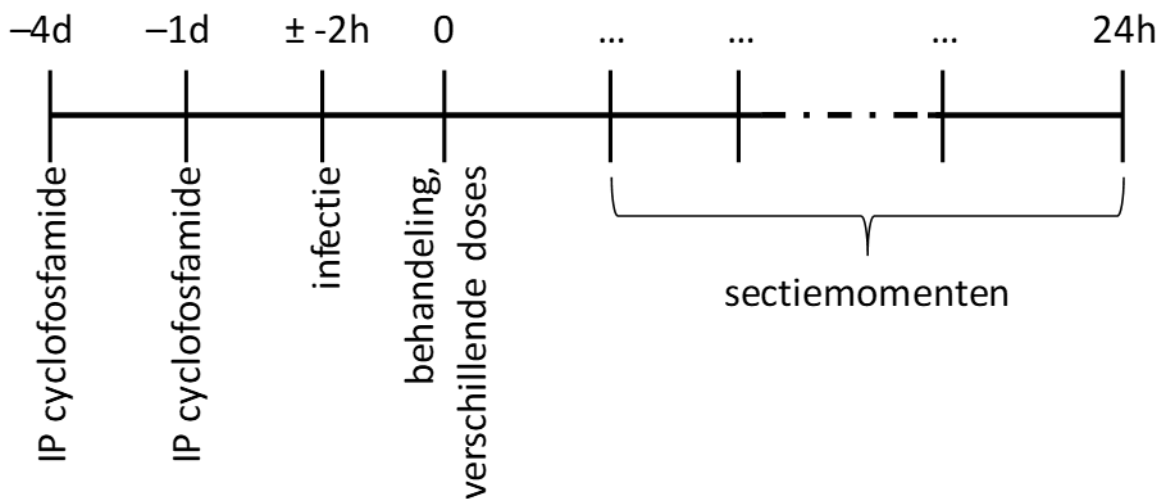
Figuur 1. Algemene opzet van 'Fase 1: Aanpassen van de bestaande modellen'.

Fase 2: Screening op vroege bacteriedodende activiteit

Neutropene, geïnfecteerde dieren worden éénmalig behandeld, dosisgroepen van enkele dieren met verschillende doses van het middel (maximaal 8). Behandeling met het middel is per os of parenteraal, de route die het meest passend is (meestal SC, IM, IV, IP of soms per maagsonde). Daarbij wordt het maximaal toe te dienen volume voor die route in acht genomen (Principles of Laboratory Animal Science revised edition, Van Zutphen 2001, tabel 16-1).

Enkele uren na deze toediening wordt op verschillende tijdstippen (maximaal 8) sectie verricht op de dieren om de vroege bacteriedodende activiteit te bepalen (Figuur 2).

Deze studies duren maximaal 26 uur (na start behandeling).



Figuur 2. Algemene opzet van 'Fase 2: Screening op vroege bacteriedodende activiteit'.

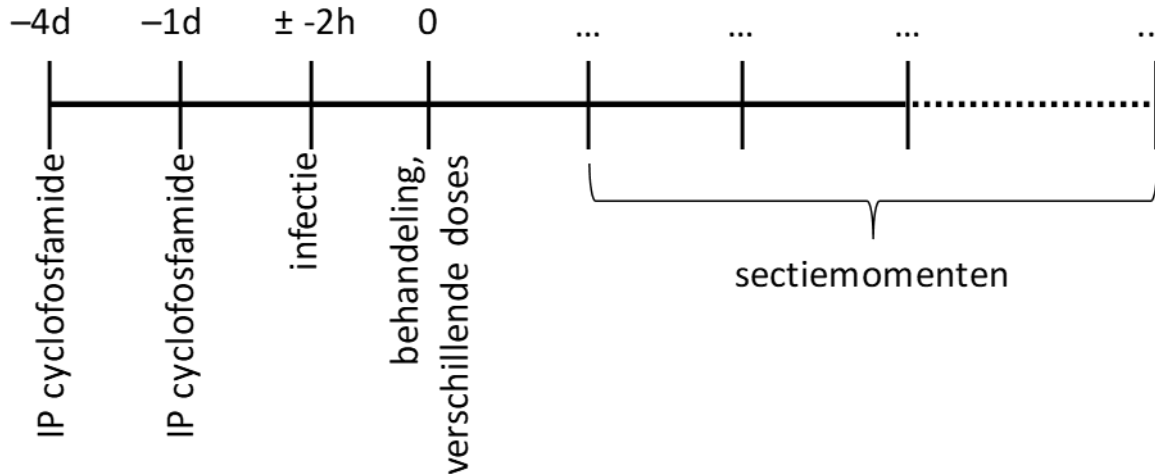
Fase 3: Exposure-respons relatie

Studie A: Bepaling van het *in vivo* PK profiel

Neutropene, geïnfecteerde dieren worden éénmalig (of, in specifieke situaties zoals zeer korte halfwaardetijd, meerdere malen, maximaal 3 keer) behandeld, verschillende dosisgroepen met verschillende doses van het middel (hoogste dosis niet hoger dan de drempelwaarde voor toxiciteit, maximaal 8 dosisgroepen). Op verschillende tijdstippen (maximaal 12) na de behandeling worden dieren gedood voor sectie om het concentratieverloop van het middel (PK profiel) in bloed en epithelial lining fluid (ELF) te bepalen (Figuur 3). Wanneer voor concentratie-bepaling van een middel kan worden volstaan met een

kleine hoeveelheid plasma, dan wordt ook tijdens het experiment bloed afgenomen bij de muizen, waarbij het aantal sectie-momenten gereduceerd kan worden.

Deze studies duren over het algemeen niet langer dan 48 uur, maar in uitzonderlijke gevallen, bijvoorbeeld als de halfwaardetijd van het middel uitzonderlijk lang is, maximaal 7 dagen (na start behandeling).

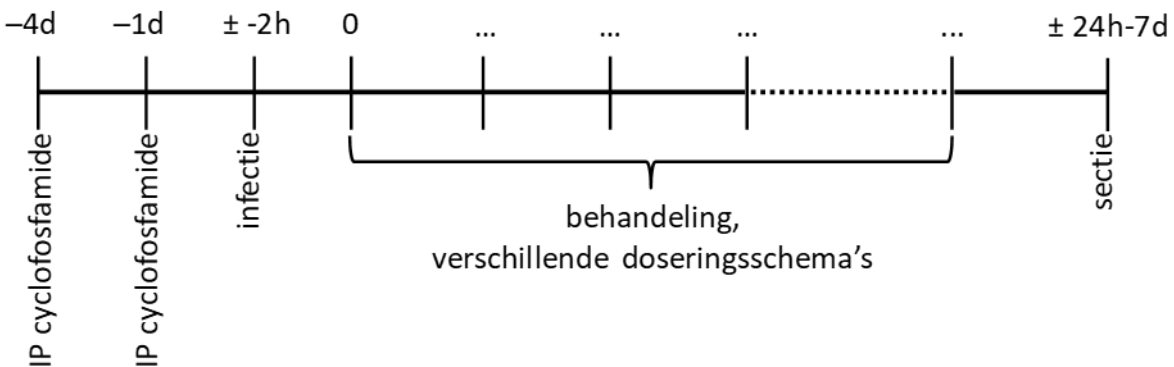


Figuur 3. Algemene opzet van 'Fase 3: Exposure-respons relatie. Studie A: Bepaling van het *in vivo* PK profiel'.

Studie B: Bepaling van de effectiviteit van middelen – en daarmee met behulp van het PK profiel expositie – als mono-behandeling

Neutropene, geïnfecteerde dieren (infectie door maximaal 8 bacteriestammen met verschillende gevoeligheden ofwel MRC's) worden behandeld met het middel als mono-behandeling gedurende 24 uur of maximaal 7 dagen. Er worden verschillende doses (maximaal 6) van het middel onderzocht (Figuur 4).

Deze studies duren meestal 24 uur en maximaal 7 dagen (na start behandeling). Het doseringsschema voor herhaalde toedieningen is mede afhankelijk van de verwachte halfwaardetijd van het middel en bedraagt maximaal 18 toedieningen per maximaal 7 dagen.

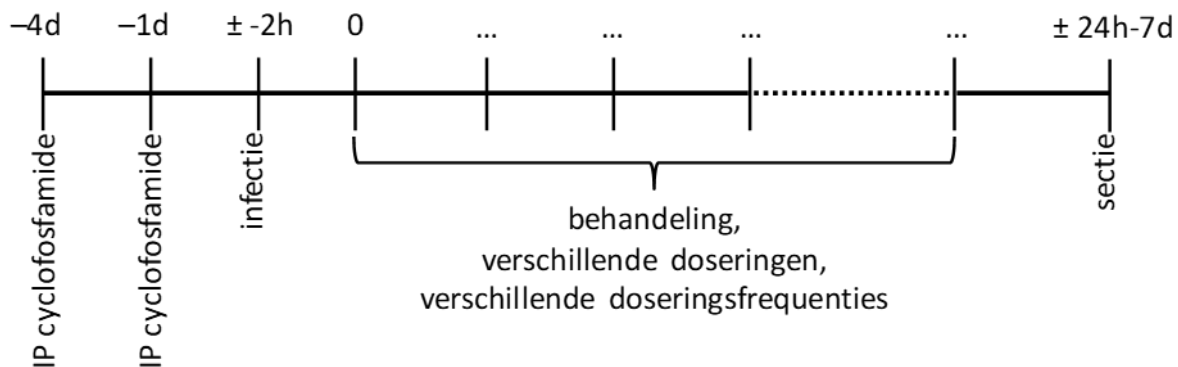


Figuur 4. Algemene opzet van 'Fase 3: Exposure-respons relatie. Studie B: Bepaling van de effectiviteit van middelen – en daarmee met behulp van het PK profiel expositie – als mono-behandeling'.

Studie C: Dosis-fractioneringsstudie

Neutropene, geïnfecteerde dieren (infectie door maximaal 4 verschillende bacteriestammen met verschillende gevoeligheden) worden behandeld met een (combinatie van) middelen waarbij de doseringsfrequentie varieert, maximaal 18 of 20 verschillende doseringsschema's, voor mono-respectievelijk combinatie-behandeling (Figuur 5).

Deze studies duren meestal 24 uur en maximaal 7 dagen (na start behandeling). Het doseringsschema voor herhaalde toedieningen is mede afhankelijk van de verwachte halfwaardetijd van het middel en bedraagt maximaal 18 toedieningen per maximaal 7 dagen.



Figuur 5. Algemene opzet van 'Fase 3: Exposure-respons relatie. Studie C: Dosis-fractioneringsstudie' en van 'Fase 4: Validatie van de PK/PD voor de bepaling van de farmacodynamische target en de variatie daarin tussen stammen ter ondersteuning van breekpunt bepaling'.

Fase 4: Validatie van de PK/PD voor de bepaling van de farmacodynamische target en de variatie daarin tussen stammen ter ondersteuning van breekpunt bepaling

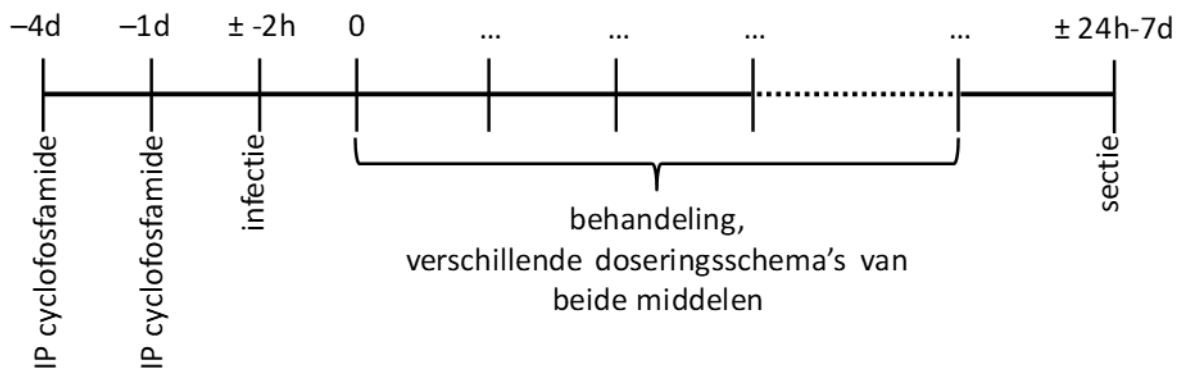
Deze proef is in opzet hetzelfde als studie C (fase 3), maar wordt gedaan met andere bacteriestammen (maximaal 6), om zo te verifiëren of de waarde van de PK/PD index gevonden in fase 2 ook geldig is bij andere bacteriestammen met andere gevoeligheden en andere resistentiemechanismen (Figuur 5). Er worden maximaal 12 verschillende doseringsschema's bestudeerd.

Deze studies duren meestal 24 uur en maximaal 7 dagen (na start behandeling). Het doseringsschema voor herhaalde toedieningen is mede afhankelijk van de verwachte halfwaardetijd van het middel en bedraagt maximaal 18 toedieningen per maximaal 7 dagen.

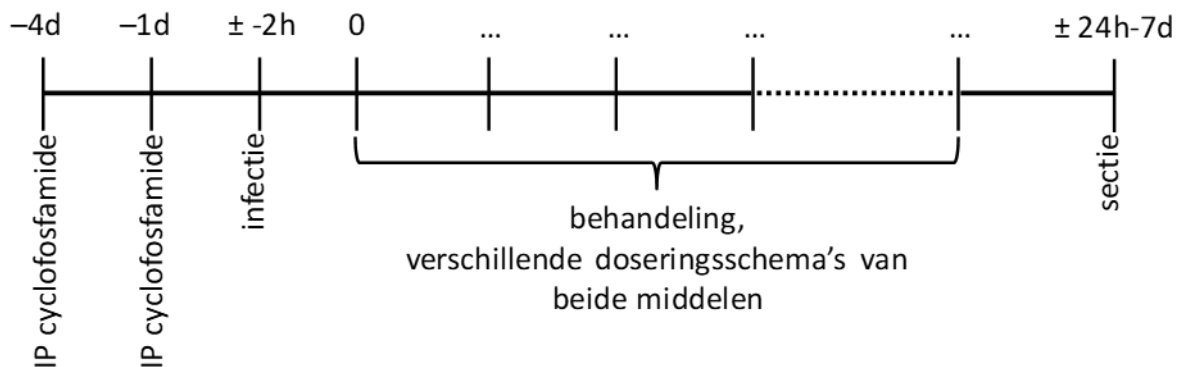
Fase 5: Effect van verschillende doseringsverhoudingen van twee middelen

In deze proef wordt een *in vivo* checkerboard assay gedaan, met verschillende doseringsschema's (maximaal 6) voor beide middelen (in totaal dus maximaal 6x6 doseringsschema's), voor verschillende bacteriestammen (maximaal 2). Verschil met de eerdere dosisfractioneringsstudies is dat in deze fase de doseringsschema's van beide middelen variëren, met juist hoge of lage concentraties van een van de middelen. Resultaten worden vergeleken met die van de *in vitro* checkerboard assays (Figuur 6).

Deze studies duren meestal 24 uur en maximaal 7 dagen (na start behandeling). Het doseringsschema voor herhaalde toedieningen is mede afhankelijk van de verwachte halfwaardetijd van de middelen en bedraagt maximaal 18 toedieningen per maximaal 7 dagen.



Figuur 6. Algemene opzet van 'Fase 5: Effect van verschillende doseringsverhoudingen van twee middelen'.



Figuur 6. Algemene opzet van 'Fase 5: Effect van verschillende doseringsverhoudingen van twee middelen'.

Geef aan welke overwegingen en statistische methoden worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken.

Voor het modelleren van het PK profiel zijn plasma- en ELF-concentraties nodig in de tijd. Uit jarenlange eigen ervaring en gepubliceerde literatuur is gebleken dat het PK profiel gemodelleerd kan worden op basis van minimaal 2-3 dieren per tijdstip. (Het precieze aantal dieren hangt af van de te verwachten inter-individuele variatie in de concentraties van de middelen.) Het aantal tijdstipen per dosis en de exacte tijdstipen wordt gebaseerd op het aantal vrijheidsgraden van de modelcurve en de te verwachten kinetiek van het middel en mogelijke te verwachten interacties. Dit zal per middel verschillen.

Voor het modelleren van de exposure-respons relatie wordt een E_{max} -model gebruikt met variabele helling (slope). Het benodigde aantal datapunten wordt gebaseerd op het aantal vrijheidsgraden (4 bij het E_{max} -model) en de te verwachten respons curve. Voor een goede curve fit zijn op basis hiervan minimaal 5 datapunten (dus 5 doseringsschema's) nodig (aantal vrijheidsgraden + 1): 1 datapunt op het maximale effect, 1 punt op het minimale effect en 3 punten voor het beschrijven van de helling. Echter, van tevoren is niet precies bekend bij welk doseringsschema het maximum of minimum effect optreedt. Er wordt daarom standaard bij 6 schema's gemeten. Dit is een balans tussen enerzijds te vaak een proef te moeten herhalen omdat er geen goede curvedescriptie kan worden bepaald (de punten op de effectcurve liggen te veel naar links of naar rechts ten opzichte van de EC50 en/of het bacteriostatische effect) en anderzijds standaard heel veel punten meten waarbij onnodig veel dieren worden gebruikt. Vanwege de biologische variatie in expositie en respons bij de individuele dieren moet elk datapunt in duplo of in triplo (afhankelijk van de te verwachten inter-individuele variatie) worden uitgevoerd. Daarnaast zijn per middel (of combinatie) infectiecontroles, groei-controles en comparator-antibioticum controles (behandeld met een middel waarvan het effect bekend is) nodig en single drug controles bij proeven met combinaties van middelen. Voor de aanvang van de proef wordt de proefopzet in detail voorgelegd aan de IvD.

B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, levensstadia, geschatte aantallen per levensstadium, geslacht, genetische wijzigingen en, indien van belang voor het behalen van de doelstelling, de te gebruiken stam.

Volgnr.	Diersoort	Herkomst	Levensstadium	Aantal	Geslacht	Genetisch gewijzigd	Stam
1	Mus Musculus	Dieren gefokt voor onderzoek	Jong volwassen	9010	vrouwelijk	NVT	Bij voorkeur worden CD-1 muizen gebruikt.

Onderbouw de bovengenoemde keuzes.

Diersoort	Standaardisatie van het model is belangrijk om resultaten onderling te kunnen vergelijken. In het longmodel dat in de literatuur beschreven is, wordt gebruik gemaakt van muizen. Er is een directe correlatie tussen de PK/PD indexen in muizen en mensen voor verschillende antibiotica.
Herkomst	Standaardisatie, ook van de microbiologische status van het gebruikte proefdier, is belangrijk om resultaten onderling te kunnen vergelijken. De normale flora van de muis

	<p>kan invloed hebben op het beloop van de infectie. Door muizen te betrekken van een geregistreerde proefdierleverancier wordt deze flora zo veel mogelijk gestandaardiseerd.</p>
Levensstadia	<p>In het longmodel dat in de literatuur beschreven is, wordt gebruik gemaakt van jong volwassen (5-10 weken) muizen. Deze standaardisatie is belangrijk om resultaten onderling te kunnen vergelijken.</p>
Aantal	<p>Fase 1-proeven moeten eenmalig worden uitgevoerd; als de modellen zijn aangepast dan kunnen (combinaties van) middelen getest worden in de fases 2-5.</p> <p>Het aantal te testen (combinaties van) middelen zal enerzijds afhangen van (combinaties van) middelen met potentie uit eigen <i>in vitro</i> onderzoek in het kader van wetenschappelijke onderzoeksprojecten en anderzijds van de interesse vanuit de farmaceutische industrie. Dit aantal is daarom niet geheel nauwkeurig in te schatten. Op basis van ervaring in de afgelopen jaren schatten we in dat we per 5 jaar maximaal 10 middelen als mono-behandeling en 5 combinaties van middelen gaan testen, waarvan een deel al in een vroeg stadium van het onderzoek zal afvallen ten gevolge van de GO/NO GO-criteria.</p> <p>Het totaal aantal dieren dat nodig zal zijn in 5 jaar hangt af van het succes van de (combinaties van) middelen. Wanneer een middel of combinatie in eerste proeven blijkt geen potentie te hebben om <i>in vivo</i> werkzaam te zijn, dan wordt dit middel niet verder <i>in vivo</i> onderzocht en wordt slechts een beperkt aantal dieren gebruikt. Wanneer een middel (of combinatie) wel succesvol is, dan worden alle proeven beschreven in fases 2-4 (voor mono-behandeling) of 2-5 (voor combinatie-behandeling) uitgevoerd. Dan zijn logischerwijs ook meer dieren nodig.</p> <p>In onderstaande berekeningen wordt uitgegaan van maximale aantallen. Wanneer de variatie binnen de groep naar verwachting kleiner is, dan kan worden volstaan met 2 dieren per groep, een kleiner aantal bacteriestammen en/of tijdspunten. Wanneer al enige informatie beschikbaar is over het doseringsschema (dosis en/of frequentie), dan kan in die gevallen eventueel worden volstaan met een beperkter aantal doseringsschema's. Voor de combinatie-behandelingen is uitgegaan van twee middelen die beide nog niet getest zijn als mono-behandeling. Uiteraard zullen er ook combinaties onderzocht worden van middelen waarvan we zelf (in eerder onderzoek of in het huidige project) het effect van mono-behandeling hebben onderzocht. In dat geval worden deze experimenten uiteraard niet herhaald, en wordt deze data gebruikt als input voor de experimenten met de combinatie. Er kan dan volstaan worden met een kleiner aantal groepen.</p> <p><u>Fase 1: Aanpassen van de bestaande modellen</u> In geval gewerkt gaat worden met bacteriestammen waarmee de onderzoeksgroep nog geen ervaring heeft, zal het bestaande model voor deze stam worden aangepast. Dit wordt gedaan voor maximaal 10 bacteriestammen. Muizen worden geïnfecteerd met 3 verschillende inocula. Op 3 verschillende momenten wordt sectie verricht op de muizen om te zien of er een reproduceerbare infectie ontstaat. In verband met biologische variatie zullen 3 muizen per groep worden gebruikt. Daarnaast zal ook een groep van 3 muizen worden behandeld met een controle-antibioticum ("comparator-drug") waarvan bekend is dat dit effectief zal zijn <i>in vivo</i>, om aan te tonen dat de infectie behandelbaar is.</p> <p>Voor deze proef zijn 540 muizen nodig:</p> <p>10 bacteriestammen x 3 inocula x 3 sectiemomenten x (3 onbehandelde muizen + 3 controle-antibioticum controles)</p> <p>Voor (succesvolle) middelen zijn de volgende proeven noodzakelijk:</p> <p><u>Fase 2: Screening op vroege bacteriedodende activiteit</u> Voor nieuwe middelen wordt op vroege bacteriedodende activiteit gescreend voor maximaal 4 relevante bacteriestammen met verschillende gevoeligheden (om de variatie</p>

tussen stammen te bestuderen, aantal afhankelijk van het onderzochte middel), bij maximaal 8 verschillende doses en/of sectiemomenten (keuze voor meerdere doses en/of meerdere sectiemomenten afhankelijk van verwachting over de effectieve dosis en killingsnelheid), voor elke dosis 2 muizen (1 muis in onvoldoende i.v.m. biologische variatie, meer dan 2 is onnodig omdat het hier een screening betreft) en 6 controles (2 infectiecontroles waarop sectie wordt verricht bij start behandeling, 2 placebo-behandelde groeiconroles en 2 muizen behandeld met een comparator-antibioticum). (Een comparator-antibioticum is vooral van belang om het effect van voornamelijk nieuwe middelen te vergelijken met dat van een bestaand antibioticum.)

Voor mono-behandeling zijn 88 muizen nodig:

4 bacteriestammen x 8 (doses en/of sectiemomenten) x 2 muizen per groep
+
4 bacteriestammen x (2 infectiecontroles + 2 groeiconroles + 2 comparator-antibioticum controles)

Voor 10 middelen als mono-behandeling zijn theoretisch $10 \times 88 = 880$ muizen nodig.

Voor combinatie-behandeling zijn 88 muizen nodig:

Nieuwe middelen worden in het algemeen gecombineerd met bestaande middelen. Voor het bestaande middel zijn deze screeningsexperimenten niet nodig, wel voor het nieuwe middel.

4 bacteriestammen x 8 (doses en/of sectiemomenten) x 2 muizen per groep
+
4 bacteriestammen x (2 infectiecontroles + 2 groeiconroles + 2 comparator-antibioticum controles)

Voor 5 combinaties van middelen zijn theoretisch $5 \times 88 = 440$ muizen nodig.

Fase 3: Exposure-respons relatie; Studie A: Bepaling van het *in vivo* PK profiel

Voor het modelleren van het PK profiel van een middel of combinatie van middelen zijn plasma- en ELF-concentraties van de middelen nodig op voldoende tijdstippen (maximaal 12 voor het maken van een volledige PK curve) bij voldoende verschillende doses (meestal 6-8, maximaal 8 voor het maken van een volledige PK curve) in triplo (1 sample is onvoldoende i.v.m. biologische variatie, 2 samples kan voldoende zijn wanneer de verwachte biologische variatie beperkt is, meer dan 3 is onnodig omdat een hele PK-curve wordt gecreëerd). Tijdstippen worden gekozen aan de hand van beschikbare data over PK en PD in literatuur en/of uit eigen eerdere studies, en/of aan de hand van data van vergelijkbare middelen (bijvoorbeeld dezelfde antibioticum-klasse). Dit wordt gedaan voor 1 bacteriestam (het gaat erom dat de muis geïnfecteerd is; de verwachte verschillen in PK profiel tussen muizen geïnfecteerd met verschillende stammen is minimaal).

Voor mono-behandeling zijn 294 muizen nodig:

(1 bacteriestam x 12 tijdstippen x 8 doses x maximaal 3 muizen per groep)
+
(1 bacteriestam x (3 infectiecontroles + 3 groeiconroles))

Voor 10 middelen als mono-behandeling zijn theoretisch $10 \times 294 = 2.940$ muizen nodig.

Voor combinatie-behandeling zijn 588 muizen nodig:

2 middelen x 294 muizen per middel

Voor 5 combinaties van middelen zijn theoretisch $5 \times 588 = 2.940$ muizen nodig.

Fase 3: Exposure-respons relatie; Studie B: Bepaling van de effectiviteit van middelen – en daarmee met behulp van het PK profiel expositie – als mono-behandeling

Dit wordt gedaan voor maximaal 8 bacteriestammen met verschillende gevoeligheden (2 bacteriespecies, 4 stammen per species met goede, slechte en gemiddelde gevoeligheid, om inzicht te krijgen in de variatie tussen en binnen species, aantal afhankelijk van het onderzochte middel), bij 6 verschillende doses (4 vrijheidsgraden, dus minimaal 4+1=5 doses; om te voorkomen dat een experiment herhaald moet worden, worden 6 doses gekozen), voor elke dosis maximaal 3 muizen en 9 controles (3 infectiecontroles, 3 groeicontroles, 3 comparator-antibioticum controles).

Voor mono-behandeling zijn 216 muizen nodig:

(8 bacteriestammen x 6 doses x 3 muizen per groep)

+

(8 bacteriestammen x (3 infectiecontroles + 3 groeicontroles + 3 comparator-antibioticum controles))

Voor 10 middelen als mono-behandeling zijn theoretisch $10 \times 216 = 2.160$ muizen nodig.

Voor combinatie-behandeling zijn 432 muizen nodig:

2 middelen x 216 muizen per middel

Voor 5 combinaties van middelen zijn theoretisch $5 \times 432 = 2.160$ muizen nodig.

Fase 3: Exposure-respons relatie; Studie C: Dosis-fractioneringsstudie

Dit wordt gedaan voor 2 tot maximaal 4 (vaak andere dan in studie B gebruikte, aantal afhankelijk van het onderzochte middel) bacteriestammen met verschillende gevoeligheden (geeft inzicht in de variatie tussen stammen; eenzelfde hoeveelheid stammen als in studie B is niet nodig omdat de focus in dit experiment op de doseringsschema's ligt), in maximaal 18 (mono-behandeling) of 20 (combinatie-behandeling) verschillende doseringsschema's, voor elk schema maximaal 3 muizen en voor de hele proef maximaal 9 controles (3 infectiecontroles, 3 groeicontroles, 3 comparator-antibioticum controles). Bij combinatie-experimenten zijn bovendien maximaal 6 single-drug controles (3 single-drug controles van het ene en 3 van het andere middel) per combinatie van middelen.

Voor mono-behandeling zijn 504 muizen nodig:

(8 bacteriestammen x 18 doseringsschema's x 3 muizen per groep)

+

(8 bacteriestammen x (3 infectiecontroles + 3 groeicontroles + 3 comparator-antibioticum controles))

Voor 10 middelen als mono-behandeling zijn theoretisch $10 \times 504 = 5.040$ muizen nodig.

Voor combinatie-behandeling zijn 600 muizen nodig:

(8 bacteriestammen x 20 doseringsschema's x 3 muizen per groep)

+

(8 bacteriestammen x (3 infectiecontroles + 3 groeicontroles + 3 comparator-antibioticum controles))

+

(8 bacteriestammen x (3 single-drug controles middel 1 + 3 single-drug controles middel 2))

Voor 5 combinaties van middelen zijn theoretisch $5 \times 600 = 3.000$ muizen nodig.

Fase 4: Validatie van de PK/PD voor de bepaling van de farmacodynamische target en de variatie daarin tussen stammen ter ondersteuning van breekpunt bepaling

Dit wordt gedaan voor minimaal 4 tot maximaal 6 andere bacteriestammen dan de eerder gebruikte stammen (geeft, gecombineerd met data uit studies B en C, fase 2, een uitgebreid inzicht in de variatie tussen stammen, bij verschillende doseringsschema's; aantal afhankelijk van het onderzochte middel), in 12 verschillende doseringsschema's (bijv. 3 schema's voor het ene en 4 schema's voor het andere middel; gekozen wordt voor de meest belovende schema's uit studie B voor een uitgebreider stammenpanel), voor elk schema maximaal 3 muizen, 9 controles (3 infectiecontroles, 3 groei-controles, 3 comparator-antibioticum controles) en voor combinaties van middelen bovendien maximaal 6 single-drug controles (3 single-drug controles van het ene en 3 van het andere middel).

Voor mono-behandeling zijn 270 muizen nodig:

(6 bacteriestammen x 12 doseringsschema's x 3 muizen per groep)

+

(6 bacteriestammen x (3 infectiecontroles + 3 groei-controles + 3 comparator-antibioticum controles))

Voor 10 middelen als mono-behandeling zijn theoretisch $10 \times 270 = 2.700$ muizen nodig.

Voor combinatie-behandeling zijn 306 muizen nodig:

(6 bacteriestammen x 12 doseringsschema's x 3 muizen per groep)

+

(6 bacteriestammen x (3 infectiecontroles + 3 groei-controles + 3 comparator-antibioticum controles))

+

(6 bacteriestammen x (3 single-drug controles middel 1 + 3 single-drug controles middel 2))

Voor 5 combinaties van middelen zijn theoretisch $5 \times 306 = 1.530$ muizen nodig.

Fase 5: Effect van verschillende doseringsverhoudingen van twee middelen

Dit wordt gedaan voor 2 verschillende bacteriestammen (geeft, gecombineerd met de resultaten van experimenten uit fases 3 en 4 een vrijwel volledig inzicht in de variatie tussen stammen bij verschillende doseringsschema's; aantal afhankelijk van het onderzochte middel), in 6 verschillende doseringsschema's per middel (dus maximaal 6 schema's voor het ene en 6 schema's voor het andere middel; 4 vrijheidsgraden, dus minimaal 5 schema's; om te voorkomen dat een experiment herhaald moet worden, worden 6 schema's gekozen), voor elk schema maximaal 3 muizen. (Dit is een *in vivo* checkerboard assay.) De focus in dit experiment ligt op de doseringsschema's die voor een klein stammenpanel worden bestudeerd. Daarnaast zijn maximaal 18 infectiecontroles, 18 groei-controles en 18 comparator-antibioticum controles nodig voor de hele proef.

Voor combinatie-behandeling zijn 324 muizen nodig:

(2 bacteriestammen x 36 doseringsschema's x 3 muizen per groep)

+

(2 bacteriestammen x (18 infectiecontroles + 18 groei-controles + 18 comparator-antibioticum controles))

Voor 5 combinaties van middelen zijn theoretisch $5 \times 324 = 1.620$ muizen nodig.

Voor één succesvol middel als mono-behandeling zijn in totaal maximaal $88+294+216+504+270= 1.372$ muizen nodig.

Voor één succesvolle combinatie van middelen zijn in totaal maximaal $88+588+432+600+306+324= 2.338$ muizen nodig.

Voor 10 middelen als mono-behandeling zijn theoretisch $10 \times 1.372 = 13.720$ muizen nodig. Voor 5 combinaties van middelen zijn theoretisch $5 \times 2.338 = 11.690$ muizen nodig. Echter, niet alle (combinaties van) middelen zullen even succesvol zijn en deze zullen in verschillende stadia van het *in vivo* onderzoek afvallen ten gevolge van de GO/NO GO-criteria. Op basis van ervaring weten we dat waarschijnlijk ongeveer 1/3 deel van het theoretisch aantal benodigde muizen nodig is. $(13.720 + 11.690) : 3 = 8.470$ muizen.

In totaal zijn hiermee maximaal 540 (fase 1) + 8.470 (fases 2-5) = 9.010 muizen nodig.

Fase 4: Validatie van de PK/PD voor de bepaling van de farmacodynamische target en de variatie daarin tussen stammen ter ondersteuning van breekpunt bepaling

Dit wordt gedaan voor minimaal 4 tot maximaal 6 andere bacteriestammen dan de eerder gebruikte stammen (geeft, gecombineerd met data uit studies B en C, fase 2, een uitgebreid inzicht in de variatie tussen stammen, bij verschillende doseringsschema's; aantal afhankelijk van het onderzochte middel), in 12 verschillende doseringsschema's (bijv. 3 schema's voor het ene en 4 schema's voor het andere middel; gekozen wordt voor de meest belovende schema's uit studie B voor een uitgebreider stammenpanel), voor elk schema maximaal 3 muizen, 9 controles (3 infectiecontroles, 3 groei-controles, 3 comparator-antibioticum controles) en voor combinaties van middelen bovendien maximaal 6 single-drug controles (3 single-drug controles van het ene en 3 van het andere middel).

Voor mono-behandeling zijn 270 muizen nodig:

(6 bacteriestammen x 12 doseringsschema's x 3 muizen per groep)

+

(6 bacteriestammen x (3 infectiecontroles + 3 groei-controles + 3 comparator-antibioticum controles))

Voor 10 middelen als mono-behandeling zijn theoretisch $10 \times 270 = 2.700$ muizen nodig.

Voor combinatie-behandeling zijn 306 muizen nodig:

(6 bacteriestammen x 12 doseringsschema's x 3 muizen per groep)

+

(6 bacteriestammen x (3 infectiecontroles + 3 groei-controles + 3 comparator-antibioticum controles))

+

(6 bacteriestammen x (3 single-drug controles middel 1 + 3 single-drug controles middel 2))

Voor 5 combinaties van middelen zijn theoretisch $5 \times 306 = 1.530$ muizen nodig.

Fase 5: Effect van verschillende doseringsverhoudingen van twee middelen

Dit wordt gedaan voor 2 verschillende bacteriestammen (geeft, gecombineerd met de resultaten van experimenten uit fases 3 en 4 een vrijwel volledig inzicht in de variatie tussen stammen bij verschillende doseringsschema's; aantal afhankelijk van het onderzochte middel), in 6 verschillende doseringsschema's per middel (dus maximaal 6 schema's voor het ene en 6 schema's voor het andere middel; 4 vrijheidsgraden, dus minimaal 5 schema's; om te voorkomen dat een experiment herhaald moet worden, worden 6 schema's gekozen), voor elk schema maximaal 3 muizen. (Dit is een *in vivo* checkerboard assay.) De focus in dit experiment ligt op de doseringsschema's die voor

	<p>een klein stammenpanel worden bestudeerd. Daarnaast zijn maximaal 18 infectiecontroles, 18 groeiconroles en 18 comparator-antibioticum controles nodig voor de hele proef.</p> <p>Voor combinatie-behandeling zijn 324 muizen nodig:</p> <p>(2 bacteriestammen x 36 doseringsschema's x 3 muizen per groep) + (2 bacteriestammen x (18 infectiecontroles + 18 groeiconroles + 18 comparator-antibioticum controles))</p> <p>Voor 5 combinaties van middelen zijn theoretisch $5 \times 324 = 1.620$ muizen nodig.</p> <p>Voor één succesvol middel als mono-behandeling zijn in totaal maximaal $88+294+216+504+270= 1.372$ muizen nodig.</p> <p>Voor één succesvolle combinatie van middelen zijn in totaal maximaal $88+588+432+600+306+324= 2.338$ muizen nodig.</p> <p>Voor 10 middelen als mono-behandeling zijn theoretisch $10 \times 1.372 = 13.720$ muizen nodig. Voor 5 combinaties van middelen zijn theoretisch $5 \times 2.338 = 11.690$ muizen nodig. Echter, niet alle (combinaties van) middelen zullen even succesvol zijn en deze zullen in verschillende stadia van het <i>in vivo</i> onderzoek afvallen ten gevolge van de GO/NO GO-criteria. Op basis van ervaring weten we dat waarschijnlijk ongeveer 1/3 deel van het theoretisch aantal benodigde muizen nodig is. $(13.720 + 11.690) : 3 = 8.470$ muizen.</p> <p>In totaal zijn hiermee maximaal 540 (fase 1) + 8.470 (fases 2-5) = 9.010 muizen nodig.</p>
Geslacht	<p>Standaardisatie van het model is belangrijk om resultaten onderling te kunnen vergelijken. Er is meestal een directe correlatie tussen de PK/PD indexen in vrouwelijke proefdieren en mensen (vrouw én man) voor verschillende antibiotica. Wanneer studies worden uitgevoerd bij vrouwelijke muizen hoeven de resultaten daarom niet ook nog eens bij mannelijke muizen bevestigd te worden. Het gaat immers primair om de concentratie-effect relatie. (Nota bene, de doseringen om die concentraties te bereiken kunnen wel verschillend zijn tussen man en vrouw).</p> <p>In het in de literatuur beschreven longmodel wordt gebruik gemaakt van vrouwelijke muizen. Door in dit project ook vrouwelijke muizen te gebruiken kunnen resultaten vergeleken worden met eerder verkregen resultaten (literatuur en eigen data).</p> <p>Door voor de bepaling van het PK profiel alleen vrouwelijke dieren te gebruiken wordt een zeer gestandaardiseerd PK profiel bepaald met weinig variatie. Alleen bij een PK profiel met weinig variatie is het mogelijk de groeps groottes in de proeven voor bepaling van de exposure-respons relatief klein te houden.</p> <p>Daarnaast zijn mannelijke muizen vanwege hun agressievere gedrag moeilijker in groepen te huisvesten.</p>
Genetisch gewijzigd	N.v.t.
Stam	Bij voorkeur worden CD-1 muizen gebruikt. Deze stam wordt ook in het longmodel beschreven in de literatuur gebruikt.

C. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

Ja

Nee > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

D. Pijn en welzijnsaantasting

Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?

Nee >

Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

De mogelijke pijn die veroorzaakt wordt door lokale ontsteking en ziekte zal worden geminimaliseerd door gebruik van adequate analgetica waarvan gebleken is dat zij niet interfereren met de infectie.

Pijnbestrijding zal worden toegepast bij alle dieren in alle experimenten voordat gestart wordt met behandeling met de verschillende middelen. In verband met standaardisatie ontvangen alle dieren analgesie. Omdat op voorhand niet bekend is welke therapie effectief is (dit is de vraagstelling van het onderzoek) kan er niet alleen aan de niet of slecht behandelde muizen pijnbestrijding gegeven worden. De eerste injectie zal zijn vlak voor de eerste behandeling. De dosis wordt zodanig gekozen dat deze 12 uur effectief is en pijn door ontsteking en ziekte voorkomt. Op dat moment wordt een volgende injectie gegeven, wat elke 12 uur herhaald wordt tot aan het einde van de proef. Uit eerdere experimenten binnen onze onderzoeksgroep en andere onderzoeksgroepen is gebleken dat toepassing van analgetica niet interfereert met het PK profiel van de tot nu toe onderzochte middelen. We verwachten dat dit ook voor andere middelen niet het geval zal zijn. Theoretisch zou wel een controlegroep meegenomen moeten worden zonder analgesie om dit uit te sluiten. Omdat er inmiddels vele middelen zijn bestudeerd waarbij gebruik wordt gemaakt van deze vorm van pijnstilling (door onszelf in eerder onderzoek en door andere onderzoeksgroepen) vinden wij het aannemelijk dat deze vorm van analgesie ook niet met het PK profiel van andere middelen zal interfereren. Het zou bovendien – als er al interferentie zou zijn – een systematische afwijking betreffen van het PK profiel. Ook de dieren waar het PK profiel bij is bepaald hebben immers deze pijnstilling gehad. Een extra controlegroep zou om extra dieren vragen zonder dat dit ook maar enige bijdrage levert aan de uitkomst van de experimenten.

In uitzonderlijke gevallen duren experimenten langer dan 48 uur, tot maximaal 7 dagen. In die gevallen zal pijnbestrijding gedurende de eerste 48 uur worden toegepast, om mogelijke bijwerkingen van langdurige pijnbestrijding zo veel mogelijk te voorkomen.

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Wanneer de infectie onbehandeld blijft of wanneer de behandeling niet effectief is, dan zullen de dieren benauwd worden en/of blauw gaan zien. Dit is in de afgelopen 5 jaar echter niet vastgesteld. In sommige gevallen zal de infectie dissemineren en ontaarden in een sepsis. In beide gevallen worden de dieren direct geëuthanaseerd. Wel willen we benadrukken dat de experimenten meestal maar 24 uur, soms 48 uur en maar bij uitzondering langer dan 48 uur (na start behandeling) duren. Deze klinische effecten komen in de meeste gevallen pas na 24 uur tot uiting.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Stress kan ontstaan door experimentele handelingen (hanteren, infecteren, injecties, euthanasie onder anesthesie). Ziekte kan ontstaan door de bacteriële infecties bij niet-effectieve doseringsschema's of bijwerkingen van de middelen.

Beschrijf welke maatregelen worden genomen om deze schadelijke effecten te voorkomen of waar mogelijk te minimaliseren.

Stress door experimentele handelingen kan niet worden voorkomen. Handelingen zullen alleen uitgevoerd worden door competente medewerkers die getraind zijn om met muizen te werken. Bij het bereiken van de humane eindpunten zal het dier worden geëuthanaseerd. Euthanasie vindt plaats onder anesthesie.

E. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

Nee > Ga verder met vraag F.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

De dieren worden gescoord met 0, 1 of 2 op de volgende criteria:

- a) Gewichtsverlies (afname van 20% of meer binnen 48 uur of 15% of meer binnen 24 uur na infectie)
- b) Temperatuurdaling tot 34°C of lager
- c) Uitdroging
- d) Donkere ogen
- e) Opstaande vacht
- f) Lethargie of hyperactiviteit door disseminatie van infectie naar de hersenen
- g) Tollen (bij infectie van de hersenen)

Als de totale score geteld over meerdere dagen hoger dan 7 is, dan wordt het dier zonder uitstel geëuthanaseerd en bemonsterd.

Wanneer bij a, b, f of g een 2 (ernstig aanwezig) gescoord wordt, dan moet het dier direct uit het experiment genomen worden.

Het is belangrijk dat voorkomen wordt dat de eindpunt criteria al (te) scherp worden gedefinieerd, waardoor het wetenschappelijk eindpunt niet zou worden bereikt en het doel van de proef niet wordt gerealiseerd.

Bij termineren van de dieren voordat het ongerief hoog wordt kan de vraagstelling niet worden beantwoord. Voor de vraagstelling is het van groot belang dat het doseringsschema kan worden afgemaakt. Dit schema wordt opgesteld aan de hand van gegevens uit literatuur en op basis van resultaten van onze eigen *in vitro* experimenten. Het schema wordt niet langer gemaakt dat strikt noodzakelijk is. Als er doseringsschema's of tijdstippen missen doordat dieren voortijdig geëuthanaseerd worden, dan kan de exposure-response relatie (farmacodynamische index en farmacodynamische target) niet of minder nauwkeurig worden berekend. Daardoor zullen de proeven met een aangepast doseringsschema moeten worden herhaald en zijn ook opnieuw de bijbehorende controledieren nodig. Bij een kleine groep dieren zal dit dus mogelijk leiden tot relatief hoger ongerief, maar het voorkomt wel dat proeven herhaald moeten worden.

Welk percentage van de dieren loopt per diersoort kans deze criteria te halen?

Ziekte komt in de meeste gevallen pas na 24 uur tot uiting. Bij proeven in fase 1 blijven dieren onbehandeld, en dieren waarbij het inoculum te hoog worden hebben een grotere kans het humane eindpunt te bereiken. Ingeschat is dat bij maximaal de helft van de dieren het humane eindpunt wordt bereikt.

Voor fase 1: maximaal 50%

Proeven waarbij het PK profiel (fase 3, studie A) wordt bepaald duren over het algemeen niet langer dan 24 uur (na start behandeling) en voor het grootste aantal groepen korter, waardoor de kans op het bereiken van de humane eindpunten klein is.

Voor PK-proeven (fase 3, studie A): 5%

Proeven waarbij de exposure-respons relatie wordt bepaald (fase 2, fase 3 studie B en C, fase 4, fase 5) duren meestal 24 uur (na start behandeling), maar in sommige gevallen langer dan 48 uur, maximaal 7 dagen na start therapie. In die gevallen kan het voorkomen – afhankelijk van de effectiviteit van de (combinatie van) middelen – dat de humane eindpunten bereikt worden.

Voor exposure-respons proeven (fase 2, fase 3 studie B en C, fase 4, fase 5): 15%

F. Classificatie van ongerief

Benoem de experiment gebonden factoren die bijdragen aan het ongerief en geef voor elk van deze factoren aan hoe het ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig'. Geef per diersoort en behandelgroep het cumulatieve ongerief aan in percentages van het totale aantal dieren.

Het ongerief ten gevolge van de experimentele handelingen is voor alle dieren ingeschat op matig:

Dag -4 en -1: IP cyclofosfamide, wegen

T = ± -2h: IN infectie in de longen onder isofluraan anesthesie

T = 0: behandeling, meestal SC

T = ...: behandeling, meestal SC, frequentie afhankelijk van doseringsschema, maximaal 18 toedieningen per maximaal 7 dagen; bij aanleiding wegen en temperaturen (infrarood thermometer)

Daarnaast kan er ongerief zijn ten gevolge van de infectie. Bij (te) lage inocula, bij middelen die succesvol blijken, bij middelen zonder bijwerkingen en bij groepen waarbij sectie vroeg na start behandeling plaatsvindt zal het ongerief ten gevolge van infectie minder hoog zijn. Echter, bij welke inocula en middelen dit het geval is, is van tevoren niet te voorspellen; dit is de onderzoeksvraag.

Bij dieren die de humane eindpunten niet bereiken is het totale ongerief ingeschat op matig; bij dieren die de humane eindpunten wel bereiken is het totale ongerief nu ingeschat op ernstig. Naar verwachting is dit 50% van de dieren in fase 1-studies (Aanpassen van de bestaande modellen), 5% van de dieren in PK proeven (fase 3, studie A) en 15% van de dieren in exposure-respons proeven (fase 2, fase 3 studie B en C, fase 4, fase 5). In absolute aantallen geldt onderstaande beredeneerde schatting:

Fase 1: Aanpassen van de bestaande modellen

Bij deze proeven zal maximaal 50% van de muizen (n=270) de humane eindpunten bereiken ten gevolge van te hoge inocula. Bij deze muizen is het totale ongerief ingeschat op ernstig. Bij de overige 50% (=270 muizen) zal het inoculum te laag of goed zijn; bij deze muizen is het totale ongerief ingeschat op maximaal matig.

PK-proeven (fase 3, studie A):

5% van de dieren in PK-experimenten ondervindt ernstig ongerief (inschatting o.b.v. ervaringen in het verleden met dergelijke experimenten). In deze experimenten worden per middel maximaal 294 muizen gebruikt (voor een combinatie komt dit dus neer op $2 \times 294 = 588$ muizen). Voor 10 succesvolle mono-behandelingen en 5 combinatie-behandelingen zouden dit $10 \times 294 + 5 \times 588 = 5.880$ muizen zijn. $1/3$ van het totaal aantal muizen is nodig i.v.m. uitval ten gevolge van de GO/NO GO criteria: $5.880 : 3 = 1.960$ muizen. 5% hiervan zal ernstig ongerief ondervinden: $1.960 \times 0,05 = 98$ muizen die ernstig ongerief ondervinden. De overige dieren ($1.960 - 98 = 1.862$ muizen) ondervinden matig ongerief.

Exposure-respons proeven (fase 2, fase 3 studie B en C, fase 4, fase 5):

15% van de dieren in PK/PD-experimenten ondervindt ernstig ongerief (inschatting o.b.v. ervaringen in het verleden met dergelijke experimenten). In deze experimenten worden per mono-behandeling maximaal 88 (fase 2) + 216 (fase 3 studie B) + 504 (fase 3 studie C) + 270 (fase 4) = 1.078 muizen gebruikt; per combinatie-behandeling maximaal 88 (fase 2) + 432 (fase 3 studie B) + 600 (fase 3 studie C) + 306 (fase 4) + 324 (fase 5) = 1.750 muizen. Voor 10 succesvolle mono-behandelingen en 5 combinatie-behandelingen zouden dit $10 \times 1.078 + 5 \times 1.750 = 19.530$ muizen zijn. $1/3$ van het totaal aantal muizen is nodig i.v.m. uitval ten gevolge van de GO/NO GO criteria: $19.530 : 3 = 6.510$ muizen. 15% hiervan zal ernstig ongerief ondervinden: $6.510 \times 0,15 = 976$ muizen die ernstig ongerief ondervinden. De overige dieren ($6.510 - 976 = 5.534$ muizen) ondervinden matig ongerief.

Totaal:

Matig ongerief: 270 (fase 1) + 1.862 (PK-proeven) + 5.534 (exposure-respons proeven) = 7.666 muizen

Ernstig ongerief: 270 (fase 1) + 98 (PK-proeven) + 976 (exposure-respons proeven) = 1.344 muizen

Totaal: $7.666 + 1.344 = 9.010$ muizen

G. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welke keuzes daarbij zijn gemaakt.

<p>Vervanging</p>	<p>Voordat middelen in dieren getest worden, zijn ze reeds <i>in vitro</i> getest. Alleen de (combinaties van) middelen met potentie om <i>in vivo</i> werkzaam te kunnen zijn, zullen in dieren onderzocht worden.</p> <p>Op basis van de data die wordt verkregen uit het <i>in vivo</i> en het <i>in vitro</i> onderzoek kan de stap naar klinische studies worden gemaakt, omdat de exposure-respons relaties in dit model goed overeenkomen met de verwachte respons bij patiënten. Ook voor het opstellen of herzien van de productinformatie van middelen is deze data nodig. De European Medicines Agency (EMA) heeft het voornemen om de productinformatie van bestaande antibiotica de komende jaren te herzien onder andere aan de hand van informatie gegenereerd in diermodellen die relevant zijn voor de latere indicatie. Voor colistine is dit inmiddels gebeurd. Vervangen van deze dierproeven is daarom niet mogelijk.</p>
<p>Vermindering</p>	<p>Door de gestandaardiseerde opzet van de proeven kunnen de resultaten verkregen voor een middel (of combinatie) goed vergeleken worden met die voor een ander middel (of combinatie), verkregen in dit project, eerdere projecten, of beschreven in de literatuur. Ook is door de gekozen gestandaardiseerde opzet slechts een beperkt aantal onbehandelde controledieren nodig.</p> <p>Voor het bepalen van een standaard exposure-respons curve wordt het minimale aantal dieren gebruikt waarvan verwacht mag worden dat daarmee het effect kan worden beschreven, zonder de noodzaak tot veelvuldig herhalen van de proef. Dit laatste zou bovendien extra controledieren vragen.</p> <p>Door het hanteren van heldere GO/NO GO-criteria worden middelen die al in een vroeg stadium van het onderzoek blijken geen potentie te hebben om <i>in vivo</i> werkzaam te zijn niet verder onderzocht en wordt onnodig proefdiergebruik voorkomen. Experimentele middelen worden vaak voor 1 bacteriespecies ontwikkeld. Bij screening op vroege bacteriedodende activiteit (fase 2) worden dan niet meteen 4 bacteriestammen gebruikt voor infectie, maar eerst 1 stam. Als het middel dan geen activiteit vertoont, is dit een NO GO. Deze experimenten worden met kleine groepen (n=2) uitgevoerd, dit is voldoende om eventueel aanwezige vroege bacteriedodende activiteit te zien.</p> <p>Alle andere experimenten worden uitgevoerd met minimaal 2 en maximaal 3 muizen per groep. Het definitieve aantal dieren per groep wordt bepaald aan de hand van de te verwachten inter-individuele variatie. Bij kleine inter-individuele variatie kan volstaan worden met 2 muizen per groep; bij grotere variatie (ondanks de standaardisatie van het model) zijn 3 muizen per groep noodzakelijk. Wanneer 2 muizen per groep nodig zijn, dan zijn uiteraard ook in totaal per middel of per combinatie minder dieren nodig; de berekeningen zijn gemaakt op basis van 3 dieren per groep.</p> <p>Wanneer voor concentratie-bepaling van middelen kan volstaan met een kleine hoeveelheid plasma, dan wordt ook tijdens het experiment bloed afgenomen bij de muizen. Dit leidt tot een reductie van het aantal sectie-momenten, en dus tot reductie van het benodigd aantal proefdieren.</p> <p>In geval van nieuwe antibiotica is een comparator-antibioticum nodig als controle om het effect van het nieuwe antibioticum mee te vergelijken. De noodzaak voor deze controlegroep is er bij bestaande antibiotica niet altijd. Daarom kan deze groep in voorkomende gevallen vervallen, wat leidt tot een vermindering van het benodigd aantal dieren.</p> <p>In een aantal gevallen kunnen 2 verschillende bacteriestammen per muis gebruikt worden, 1 stam per dijspier. Dit gaat op voor stammen waarvan bekend is dat beide</p>

	<p>infecties geen invloed hebben op elkaars beloop. Alleen in die gevallen kan het benodigd aantal muizen gehalveerd worden, omdat per muis 2 bacteriestammen worden gebruikt.</p> <p>De proefopzet van de proeven wordt voorgelegd aan de IvD. Hierbij wordt het aantal dieren gedetailleerd verantwoord.</p> <p>Door het gebruik van computermodellen voor bepaling van het PK profiel en de exposure-respons relatie, zijn – op basis van jarenlange eigen ervaring en gepubliceerde literatuur – minimaal 2 dieren en maximaal 3 dieren per groep voldoende om met voldoende power de parameters te bepalen. (De uiteindelijke groeps grootte hangt af van de verwachte inter-individuele variatie.) Vermindering van deze aantallen of vermindering van het aantal datapunten zou leiden tot onvoldoende power.</p>
Verfijning	<p>Voor de <i>in vivo</i> doseringen wordt rekening gehouden met hetgeen bekend is over toxiciteit en/of tolerantie van de middelen, de minimaal toxische dosis of de maximaal getolereerde dosis is de hoogste dosis die <i>in vivo</i> wordt getest voor het bepalen van exposure-response relaties.</p> <p>De geïntroduceerde infectie zal bij de hogere doseringen niet leiden tot een uitgebreide infectie.</p> <p>Dosering van cyclofosfamide via de intraperitoneale route is zo geoptimaliseerd dat ziekte door neutropenie zo minimaal mogelijk is.</p> <p>De ernst van de welzijnsaantasting wordt verder zoveel mogelijk beperkt door het in acht nemen van de humane eindpunten.</p> <p>Door dieren in groepen te huisvesten met gepaste kooiverrijking wordt de proef verder verfijnd.</p> <p>Zo veel als mogelijk is zal het werken met bacteriestammen die ernstig ongerief kunnen veroorzaken vermeden worden. Echter, soms is dit niet mogelijk vanwege de klinische relevantie van deze stammen.</p> <p>Proeven waarin het PK profiel wordt bepaald zijn slechts van relatief korte duur, waardoor de ziekte nog niet veel progressie heeft gemaakt.</p> <p>Voor nieuwe antibiotica, non-antibiotica en voor sommige oude antibiotica geldt dat onbekend is bij welk doseringsschema ze antibacterieel effectief zijn. Doseringsschema's die niet effectief blijken te zijn, zullen relatief meer ongerief kunnen veroorzaken dan succesvolle schema's. Omdat dit de vraagstelling van het onderzoek is, kan in de keuze van middelen en doseringsschema's, die gemaakt worden op basis van literatuur en verwachtingen, geen verdere verfijning plaatsvinden.</p> <p>Ongerief wordt zo veel mogelijk geminimaliseerd door gebruik van adequate analgetica.</p> <p>Hoewel we ons realiseren dat een doseringsschema met relatief korte intervallen tussen de dosering ongerief veroorzaakt, is er momenteel geen alternatief. Het gebruik van automatische pompjes (zoals ALZET pompjes) is niet mogelijk vanwege de instabiliteit van de meeste middelen. Daarnaast is dit voor combinaties van middelen – waarbij de doseringsfrequentie van het ene middel wel en het andere middel niet wordt gevarieerd – niet mogelijk. Middelen worden indien mogelijk wel</p>

gemengd in de spuit, zodat per dosismoment maar een keer toegediend hoeft te worden.

Zijn er nadelige milieueffecten te verwachten?

Nee

Ja > Benoem de te verwachten milieueffecten en geef aan welke maatregelen zijn genomen om deze tot een minimum te beperken.

H. Hergebruik

Worden er dieren ingezet die eerder in een andere dierproef zijn gebruikt?

Nee, ga verder met vraag I.

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico op) ernstig ongerief?

Nee

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

I. Herhaling

Geef voor wettelijk vereist onderzoek aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing, geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

N.v.t., dit betreft geen wettelijk vereist onderzoek.

J. Plaats waar de dierproef wordt uitgevoerd

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder Wod valt?

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

K. Bestemming van de dieren bij einde experiment

Worden de dieren gedood?

Nee > Beschrijf de bestemming van de dieren.

Ja > Geef aan waarom de dieren worden gedood.

Aan het eind van de proef worden de dieren geëuthanaseerd voor het verzamelen van bloed, longen en andere relevante organen en het verrichten van BAL. Uit deze materialen wordt het optimale bacterieel inoculum en de PK/PD relatie bepaald.

Indien dieren worden gedood, wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van Richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja > Betreft het een dodingsmethode die alleen onder specifieke voorwaarden mag worden toegepast?

Nee > Beschrijf de dodingsmethode

Cervicale dislocatie (onder isofluraan-anesthesie) of CO₂ verstikking.

De onderzoeksgroep is zeer ervaren met deze methode van doden. Het is een snelle methode met kortdurend lijden voor het proefdier. Na nekbreek kan BAL worden uitgevoerd en kunnen longen en relevante organen worden verzameld.

Ja > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Indien dieren worden gedood, maar niet in het kader van de proef, geef aan of herplaatsing is overwogen en waarom hiervan is afgezien.

De dieren worden alleen in het kader van de proeven gedood of om welzijnsproblemen te voorkomen door gebruik van humane eindpunten.

Naam van het project	Nieuwe (combinatie)therapiën tegen infecties door multiresistente en moeilijk behandelbare bacteriën 2
NTS-identificatiecode	NTS-NL-278804 v.1
Nationale identificatiecode van de NTS <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Land	Nederland
Taal	nl
Indiening bij EU <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	ja
Duur van het project, uitgedrukt in maanden.	60
Trefwoorden	bacterie infectie resistentie antibioticum optimale dosering
Doel(en) van het project	Omzettinggericht en toegepast onderzoek: Besmettelijke ziekten van de mens

DOELSTELLINGEN EN VERWACHTE VOORDELEN VAN HET PROJECT

<p>Beschrijf de doelstellingen van het project (bijvoorbeeld het aanpakken van bepaalde wetenschappelijke onduidelijkheden, of wetenschappelijke of klinische behoeften).</p>	<p>Wereldwijd neemt het aantal infecties veroorzaakt door multiresistente en andere moeilijk behandelbare bacteriën toe. Optimale behandeling van deze patiënten met antibiotica is daardoor vaak niet meer goed mogelijk, met soms zelfs overlijden tot gevolg. Er moet daarom gezocht worden naar alternatieve behandelingen. Van oude antibiotica is vaak maar weinig bekend over de meest optimale dosering zoals met name de frequentie van toediening en de wijze van toediening, en over de indicaties (infecties) waarbij het middel gebruikt kan worden. Daarnaast is van een aantal niet-antibiotica ook werkzaamheid tegen bacteriële infecties beschreven, die vaak niet uitgebreid onderzocht is. Ook zijn er niet-antibiotica die bijvoorbeeld resistentie-veroorzakende enzymen remmen, waardoor antibiotica die anders onwerkzaam zijn wel bruikbaar blijven. Daarom onderzoeken we in dit project of oude antibiotica, niet-antibiotica en ook nieuwe antibiotica, en combinaties hiervan, werkzaam zijn in de behandeling van infecties veroorzaakt door multiresistente en moeilijk behandelbare bacteriën. Hiermee komt informatie beschikbaar over de blootstelling aan deze middelen in vivo en over hun effectiviteit. Met deze informatie kunnen de potentieel succesvolle (combinaties van) middelen in klinische studies worden onderzocht, waardoor geen onnodige klinische studies hoeven worden uitgevoerd.</p> <p>Om nieuwe behandelingen te ontwikkelen zijn modellen voor bacteriële infecties nodig. In vitro modellen worden gebruikt voor een eerste screening van middelen op mogelijke effectiviteit. Daarna worden, in dit project, 10 potente middelen en 5 combinaties in vivo onderzocht in twee veelgebruikte modellen in muizen. We bepalen de concentraties van de middelen in het lichaam van de dieren en het effect van de blootstelling aan deze middelen op het aantal bacteriën. De resultaten worden vervolgens vertaald naar optimale doseringen van deze middelen bij de mens.</p>
<p>Welke potentiële voordelen kan dit project opleveren? Leg uit hoe de wetenschap vooruit kan worden geholpen of mensen, dieren of het milieu uiteindelijk voordeel kunnen hebben bij het project. Maak, waar van toepassing, een onderscheid tussen voordelen op korte</p>	<p>In dit project zullen de beschreven proefdiermodellen van weefsel- en longinfectie aangepast worden voor een aantal klinisch relevante bacteriestammen, om de effectiviteit van middelen bij deze stammen te onderzoeken. Verder zal uit dit project blijken welke van de 10 middelen en 5 combinaties van middelen potentie hebben om in de patiënt werkzaam te zijn. We verwachten dat er hiervan 3 succesvol zullen zijn in onze dierproeven. Deze potentieel succesvolle (combinaties van) middelen kunnen vervolgens onderzocht worden in klinische studies. Op basis van de resultaten van deze dierproeven kunnen de beste doseringsschema's (hoeveel en hoe vaak doseren) bepaald worden die later in studies in patiënten gebruikt kunnen worden. Hiermee kunnen antibiotica</p>

termijn (binnen de looptijd van het project) en voordelen op lange termijn (die mogelijk pas worden bereikt nadat het project is afgerond).

mogelijk beter gedoseerd worden, waardoor de huidige antibiotica behouden kunnen blijven, met betere effectiviteit, minder ontstaan van resistentie, en minder toxiciteit.

VOORSPELDE SCHADE

<p>In welke procedures worden de dieren gewoonlijk gebruikt (bijvoorbeeld injecties, chirurgische procedures)? Vermeld het aantal en de duur van deze procedures.</p>	<p>Er wordt gewerkt met muizen met verminderde afweer. Hiervoor worden de muizen voorafgaand aan de infectie twee keer intraperitoneaal geïnjecteerd met cyclofosfamide. De dieren zullen geïnfecteerd worden met bacteriën, intranasaal voor longinfectie, intramusculair voor weefselinfectie. Tijdens de infectie worden de dieren behandeld met antibiotica, niet-antibiotica of combinaties daarvan. Aan het eind van het experiment worden de relevante organen gekweekt om de aantallen bacteriën te bepalen, of wordt bloed en longspoeling afgenomen om concentraties van de middelen te bepalen. Longinfectie en euthanasie vinden plaats onder narcose. Alle dieren ontvangen pijnstilling.</p>																
<p>Wat zijn de verwachte gevolgen/nadelige effecten voor de dieren, bijvoorbeeld pijn, gewichtsverlies, inactiviteit/verminderde mobiliteit, stress, abnormaal gedrag, en wat is de duur van die effecten?</p>	<p>Het is noodzaak de dieren te infecteren met bacteriën om de meest geschikte doseringsschema's van middelen in behandeling van infecties te kunnen onderzoeken. Dit kan ongerief met zich meebrengen wanneer een middel of combinatie van middelen niet effectief blijkt tegen de bacterie waarmee het dier geïnfecteerd is.</p> <p>Bij proeven waarin concentraties van middelen gemeten worden is er een risico op koorts of ondertemperatuur. De kans op het ontwikkelen van een infectie in bloed en organen is klein, omdat de proeven over het algemeen beëindigd zijn voordat de infectie kans heeft gehad zich op een dergelijke wijze te manifesteren.</p> <p>Bij proeven waarin gekeken wordt naar het effect van de blootstelling aan middelen op het aantal bacteriën kunnen de dieren een infectie in bloed en organen ontwikkelen, waarbij de ernst van de infectie afhangt van de effectiviteit van de middelen die getest worden. Dieren kunnen hierdoor koorts of ondertemperatuur krijgen, gewicht verliezen, meer/minder actief worden (meer/minder voortbewegen) en minder alert worden (reageren minder op prikkels). De klinische verschijnselen worden gescoord en als de totaalscore de drempelwaarde overschrijdt, dan worden dieren voortijdig uit het experiment gehaald om hoger ongerief te voorkomen. Naast de gevolgen van de infectie zal het welzijn van de dieren worden beïnvloed door eventuele bijwerkingen van de toegediende middelen, toediening van middelen die de werking van het immuunsysteem remmen, de toediening van bacteriën en het (herhaaldelijk) toedienen van de te testen middelen.</p>																
<p>Welke soorten en aantallen dieren zullen naar verwachting worden gebruikt? Wat zijn de verwachte ernstgraden en de aantallen dieren in elke ernstcategorie (per soort)?</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Soort:</th> <th rowspan="2">Totaal aantal</th> <th colspan="4">Geraamde aantallen naar ernstgraad</th> </tr> <tr> <th>Terminaal</th> <th>Licht</th> <th>Matig</th> <th>Ernstig</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Muizen (<i>Mus musculus</i>)</td> <td>18020</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>15332</td> <td>2688</td> </tr> </tbody> </table>	Soort:	Totaal aantal	Geraamde aantallen naar ernstgraad				Terminaal	Licht	Matig	Ernstig	Muizen (<i>Mus musculus</i>)	18020	0	0	15332	2688
Soort:	Totaal aantal			Geraamde aantallen naar ernstgraad													
		Terminaal	Licht	Matig	Ernstig												
Muizen (<i>Mus musculus</i>)	18020	0	0	15332	2688												
<p>Wat gebeurt er met de dieren die aan het einde van de procedure in leven worden gehouden?</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Soort:</th> <th colspan="3">Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren</th> </tr> <tr> <th>Hergebruikt</th> <th>Teruggeplaatst</th> <th>Geadopteerd</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Soort:	Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren			Hergebruikt	Teruggeplaatst	Geadopteerd									
Soort:	Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren																
	Hergebruikt	Teruggeplaatst	Geadopteerd														
<p>Geef de redenen voor het geplande lot van de dieren na de procedure.</p>	<p>Aan het eind van de proef worden de dieren op humane wijze gedood, teneinde bloed en weefsels voor verdere wetenschappelijke analyse te kunnen verkrijgen. Het doden van de dieren aan het eind van de proef is ook noodzakelijk vanwege biologische veiligheidsvoorschriften (werk met multiresistente en moeilijk behandelbare bacteriën).</p>																

TOEPASSING VAN DE DRIE V'S

<p>1. Vervanging Beschrijf welke diervrije alternatieven op dit gebied voorhanden zijn en waarom zij niet voor het project kunnen worden gebruikt.</p>	<p>Voordat gestart wordt met dierproeven worden middelen altijd uitgebreid in vitro getest, bijvoorbeeld ter vaststelling van de Minimaal Remmende Concentratie (MRC) voor verschillende soorten bacteriën en de killingsnelheid. Alleen wanneer middelen in deze experimenten potentie laten zien zullen ze in dierproeven onderzocht worden. Een diemodel is essentieel vanwege de complexe interacties tussen middelen en bacteriën in vivo, inclusief het menselijk lichaam. In vitro modellen kunnen deze interacties niet reproduceren en voorspellen weinig over de beste manier van toedienen van de middelen.</p>
<p>2. Vermindering Leg uit hoe de aantallen dieren voor dit project zijn bepaald. Beschrijf de stappen die zijn genomen om het aantal te gebruiken dieren te verminderen en de beginselen die zijn gebruikt bij het opzetten van de studies. Beschrijf, waar van toepassing, de praktijken die gedurende het hele project zullen worden toegepast om het aantal dieren die in overeenstemming met de wetenschappelijke doelstellingen werden gebruikt, tot een minimum te beperken. Deze praktijken kunnen bijvoorbeeld bestaan uit proefprojecten, computermodellen, het delen van weefsel en hergebruik.</p>	<p>Voorafgaand aan een studie wordt de proefopzet met de benodigde groepsgroottes voorgelegd aan de IvD. Door gebruik te maken van gestandaardiseerde dieren (vrij van specifieke ziekteverwekkers, zoals vooraf getest) en van bepaalde leeftijd, gewicht en geslacht wordt de benodigde groepsgrootte verder beperkt. De te bestuderen middelen zullen eerst in detail worden bestudeerd in vitro. Alleen (combinaties van) middelen die potentie hebben om in vivo werkzaam te kunnen zijn, worden in dieren bestudeerd. Wanneer in een vroege fase van het in vivo onderzoek blijkt dat een middel geen gewenst concentratieverloop heeft of dat het niet effectief is, dan worden niet alle dierexperimenten voor dit middel uitgevoerd en valt het middel al in een vroege fase af. Door de gestandaardiseerde opzet van de proeven kunnen resultaten van verschillende studies onderling goed vergeleken worden, ook met data uit de literatuur, waardoor onnodig gebruik van dieren wordt voorkomen.</p> <p>Verder is in de berekeningen van de benodigde aantallen dieren gerekend met maximale aantallen. Wanneer bijvoorbeeld de verwachte variatie tussen de dieren beperkt is, dan kunnen kleinere groepen gebruikt worden, waardoor het totaal aantal benodigde aantal dieren verminderd kan worden. Dit is afhankelijk van de middelen die gebruikt zullen worden in het onderzoek.</p>
<p>3. Verfijning Geef voorbeelden van de specifieke maatregelen (bv. verscherpte monitoring, postoperatieve behandeling, pijnbestrijding, training van dieren) die in verband met de procedures moeten worden genomen om de welzijnskosten (schade) voor de dieren tot een minimum te beperken. Beschrijf de mechanismen om gedurende de looptijd van het project nieuwe verfijningstechnieken in gebruik te nemen.</p>	<p>De modellen van weefsel- en longinfectie in de muis worden wereldwijd gebruikt. Van het model van weefselinfectie is aangetoond dat de resultaten verkregen in dit model goed overeenkomen met de verwachte respons bij patiënten. Antibiotica werken niet altijd op alle infectielocaties, dit geldt met name voor de long. Daarom is het belangrijk om de te testen middelen ook te onderzoeken in een model van longinfectie.</p> <p>Met de standaard opzet van de experimenten, ook beschreven door de European Medicines Agency, voor optimalisatie van doseringsschema's van middelen is ruime ervaring binnen de onderzoeksgroep.</p> <p>De dierproeven worden uitgevoerd door deskundig personeel. De infectie van de longen en de uiteindelijke euthanasie vinden plaats onder narcose om het ongerief zo veel mogelijk te beperken. Verder wordt pijnstilling toegepast om het ongerief zo veel mogelijk te minimaliseren. De dierproeven waarbij concentraties van de middelen worden bepaald worden relatief kort gehouden, waardoor de infectie zich nog niet zo ver kan ontwikkelen en het ongerief zo laag mogelijk wordt gehouden. Bovendien wordt het verloop van de infectie van de dieren nauwgezet gevolgd, zodat de dieren bij ernstige ziekteverschijnselen op basis van humane eindpunt criteria vroegtijdig uit de proef kunnen worden genomen.</p>
<p>Licht de keuze van de soorten en de bijbehorende levensstadia toe</p>	<p>In de in de literatuur omschreven modellen van weefsel- en longinfectie zijn opgezet in jong-volwassen muizen. Om resultaten uit dit project te kunnen vergelijken met resultaten die eerder (door ons of door anderen) in deze modellen verkregen zijn, is het belangrijk dezelfde diersoort en levensstadia te gebruiken. Bovendien is aangetoond dat de resultaten verkregen in het model van weefselinfectie (met jong-volwassen muizen) goed overeenkomen met de verwachte respons bij patiënten.</p>

VOOR EEN BEOORDELING ACHTERAF GESELECTEERD PROJECT

Project geselecteerd voor BA?	ja
Termijn voor BA	31-05-2028
Reden voor de beoordeling achteraf	
Bevat ernstige procedures	ja
Maakt gebruik van niet-menselijke primaten	
Andere reden	
Toelichting van de andere reden voor de beoordeling achteraf	

AANVULLENDE VELDEN

Nationaal veld 1 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 2 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 3 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 4 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 5 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Startdatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Einddatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Goedkeuringsdatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 1 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 2 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 3 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Link naar de eerdere versie van de NTS buiten het EC-systeem	

Van: info@zbo-ccd.nl
Verzonden: vrijdag 25 maart 2022 15:37
Aan: 5.1 lid2h
Onderwerp: Verzoek om advies over projectvergunningaanvraag AVD 5.1 lid2h 202215947
Bijlagen: PPL_2022_0004_NTS.xlsx; PPL_2022_0004_Bijlage_1.docx; PPL_2022_0004_Bijlage_2.docx; PPL_2022_0004_aanvraag_projectvergunning.pdf; PPL_2022_0004_Projectvoorstel_.docx

Categorieën: Nieuwe aanvragen (of nummer)

Geachte leden van 5.1 lid2h

De Centrale Commissie Dierproeven (hierna: CCD) verzoekt u in het kader van vergunningverlening advies te geven over het project met als titel: "Nieuwe (combinatie)therapieën tegen infecties door multiresistente en moeilijk behandelbare bacteriën 2" en aanvraagnummer: AVD 5.1 lid2h 202215947.

Uw commissie wordt verzocht op grond van artikel 10.a.2 van de Wet op de dierproeven de aanvraag te beoordelen en een ethische toetsing uit te voeren waarbij wordt afgewogen of de doelstelling van het project, de verwachte voordelen voor mens, dier of milieu en de haalbaarheid van de doelstellingen, het gebruik van dieren en de schade die zal worden toegebracht aan de dieren in de vorm van lijden, pijn en angst kan rechtvaardigen.

Graag ontvangen wij van u bericht dat deze e-mail goed is ontvangen en wanneer u dit advies in de vergadering gaat bespreken.

Voor het in te dienen advies dient de DEC gebruik te maken van de meest actuele versie van het op de website van de CCD gepubliceerde Format DEC-advies en de toelichting daarbij. U dient deze aanvraag vertrouwelijk te behandelen. Voor de communicatie met de CCD dient u gebruik te maken van FileSecure.

De CCD verzoekt u uiterlijk binnen 20 werkdagen, na 25-03-2022, uw advies bij de CCD in te dienen. Indien de aanvraag door uw commissie niet in behandeling kan worden genomen, dient u dit per ommekeer per e-mail aan de CCD te melden.

Ingeval uw commissie tussentijds aanvullende informatie wil inwinnen bij de aanvrager wordt de termijn opgeschort en geeft u in uw advies aan wanneer dit is geweest. Opschorting van de adviestermijn vindt niet plaats ingeval u ten behoeve van uw advies een onafhankelijk extern expert raadpleegt. Mocht u verwachten door een andere reden dan opschorting uw advies later dan 20 werkdagen na 25-03-2022 bij de CCD in te dienen, dan verzoeken wij u dit direct aan de CCD te melden.

Mocht u vragen hebben, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,
 Centrale Commissie Dierproeven

www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
 Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag

T: 0800 789 0789
E: info@zbo-ccd.nl

Format DEC-advies

Maak bij de toepassing van dit format gebruik van de Praktische Handreiking: Ethisch Toetsingskader voor proefdiergebruik. Voor voorbeelden, zie bijlage I.

Herhaling van antwoorden is niet nodig. Indien van toepassing kan verwezen worden naar een bij een eerdere vraag verstrekt antwoord.

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: AVD **5.1 lid2h** 202215947
2. Titel van het project: Nieuwe (combinatie)therapieën tegen infecties door multiresistente en moeilijk behandelbare bacteriën 2
3. Titel van de NTS: Nieuwe (combinatie)therapieën tegen infecties door multiresistente en moeilijk behandelbare bacteriën 2.
4. Type aanvraag:
 - X Nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: **5.1 lid2h**
 - telefoonnummer contactpersoon: **5.1 lid2h**
 - E-mailadres contactpersoon: **5.1 lid2h**
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: 10-03-2022 (door CCD ingediend 25-03-2022)
 - aanvraag compleet: 14-07-2022
 - in vergadering besproken: 28-03-2022, 24-05-2022, 08-07-2022 en 25-07-2022
 - anderszins behandeld: nvt
 - termijnonderbreking(en) (van/tot): 04-04-2022 tot 16-05-2022
27-05-2022 tot 20-06-2022
26-06-2022 tot 08-07-2022
11-07-2022 tot 14-07-2022
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen n.v.t.
 - aanpassing aanvraag: 16-05-2022, 20-06-2022, 08-07-2022 en 14-07-2022
 - advies aan CCD: advies aan CCD en aanvrager gestuurd 04-08-2022
7. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.
De aanvraag is afgestemd met de IvD van de aanvrager en heeft de instemming van de IvD. Een vertegenwoordiger van de IvD was bij alle commissiebesprekingen aanwezig.

Bij de punten 8 t/m 10 kan worden volstaan met 'n.v.t.' wanneer de betreffende acties niet aan de orde zijn geweest.

8. Eventueel horen van aanvrager

- n.v.t.

-

9. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: 04-04-2022

Gestelde vragen en opmerkingen betroffen de volgende onderwerpen

- Onderbouwing beschrijving en aantallen dieren met ernstig ongerief
- Overwegingen (bijv. medisch, wetenschappelijk, beschikbaarheid nieuw middel?) om nieuw middel te gaan testen.
- Wanneer noodzaak om EMA richtlijnen te volgen
- Onderbouwing aantallen te testen componenten
- Nadere beschrijving doelstelling (bepalentoepassing/concentraties in klinische trials)
- Beschrijving van de belangen die in het geding zijn (eigen afdeling, samenwerkende partners)
- Testen van combi preparaten
- Onderbouwing gebruik neutropene muizen
- Beschrijving go/nogo in de strategie
- Beschrijving onderbouwing van de strategie
- Onderbouwing infectie van beide dijbeenspieren in zelfde muis
- Nadere toelichting breekpuntbepalingen
- Onderbouwing experimentele parameters en aantallen dieren in verschillende fases van experimentele strategie (maximum scenario)
- Ernstige pijn (humaan eindpunt, toepassing van pijnstilling?)
- Nadere toelichting/onderbouwing scoringsschema (ongerief consequenties, humane eindpunten)
- Beschrijving en onderbouwing van de aantallen dieren met risico op ernstig ongerief en de beschrijving en onderbouwing van de humane eindpunten die hierbij gehanteerd worden.
- Tekstuele aanpassingen
- NTS: vervangen 'euthanasie' en 'hoger ongerief' (hoger dan ernstig kan niet)

Datum antwoord: 16-05-2022

- Datum: 27-05-2022

Gestelde vragen en opmerkingen betroffen de volgende onderwerpen

- Testen van combi preparaten
- Onderbouwing infectie van beide dijbeenspieren in zelfde muis
- Onderbouwing experimentele parameters en aantallen dieren in verschillende fases van experimentele strategie (maximum scenario)
- Ernstige pijn (humaan eindpunt, toepassing van pijnstilling?)
- Beschrijving en onderbouwing van de aantallen dieren met risico op ernstig ongerief en de beschrijving en onderbouwing van de humane eindpunten die hierbij gehanteerd worden.

Datum antwoord: 20-06-2022

- Datum: 26-06-2022

Gestelde vragen en opmerkingen betroffen de volgende onderwerpen

- Beschrijving en onderbouwing van de aantallen dieren met risico op ernstig ongerief en de beschrijving en onderbouwing van de humane eindpunten die hierbij gehanteerd worden.

Datum antwoord: 08-07-2022

- Datum: 11-07-2022

Gestelde vragen en opmerkingen betroffen de volgende onderwerpen

- Beschrijving en onderbouwing van de aantallen dieren met risico op ernstig ongerief en de beschrijving en onderbouwing van de humane eindpunten die hierbij gehanteerd worden.

Datum antwoord: 14-07-2022

Het heeft de commissie een aantal besprekronde gekost om op alle vragen die in de eerste ronde al waren gesteld duidelijke antwoorden te krijgen. Speciaal de onderbouwing van de noodzaak van het doormaken van ernstig ongerief bij een substantieel aantal dieren heeft een aantal besprekronde gekost. Vooral omdat dit een belangrijk aspect in de afweging is geweest. Alle antwoorden zijn verwerkt in de aanvraag.

10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC)

- n.v.t.

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.*
Indien niet vergunningplichtig, ga verder met onderdeel E. Advies.
Deze aanvraag betreft dierproeven in de zin der wet en is daarmee vergunningplichtig.
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag (vervolg op AVD **5.1 lid 2h**)
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.
Geen van de DEC-leden is betrokken bij het project en derhalve uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies.

C. Beoordeling (inhoud)

1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft (*Zie handreiking 'Invulling definitie project'; zie bijlage I voor toelichting en voorbeeld*).
Antibiotica zijn essentieel bij de behandeling van bacteriële infecties. Deze behandelingen zijn niet in alle gevallen effectief. Hierdoor kunnen bacteriële infecties gecompliceerd of zelfs fataal verlopen.
In de afgelopen periode zijn veel bacteriën resistent geworden tegen de bestaande antibiotica. Dit resistent worden wordt wel de grootste bedreiging van de gezondheid in de komende jaren genoemd.
Naast een sterke behoefte aan nieuwe antibiotica zijn ook van reeds jaren gebruikte antibiotica niet altijd de optimale doserings- en toedieningsschema's bepaald
Deze kennis is essentieel om bij een bacteriële infectie een effectieve dosering te kunnen toepassen.
Onder dit project worden op basis van PK/PD analyses de effectieve doseringen en toedieningswijzen bepaald van reeds bestaande en nieuwe antibiotica (waaronder combinatie preparaten).

Dit onderzoek vindt plaats in twee modellen die worden aanbevolen in de richtlijnen van het European Medicines Agency (EMA) en die internationaal geaccepteerd zijn voor het bepalen van de PK/PD index en de PD target, om doseringen in klinische studies te bepalen.

De gevolgde experimentele strategie is duidelijk. De aanvrager heeft beschreven welke criteria (milestones, selectiecriteria) de keuze voor uitvoering en de volgorde van uitvoering van de experimenten bepalen. Er worden gedurende de looptijd van het project besluiten genomen over het welzijn van de betrokken dieren en de voortgang binnen elk van de experimenten en binnen het onderzoek als geheel. De directe doelen van het project en de relatie tussen deze directe doelen en het uiteindelijke doel zijn duidelijk uitgewerkt. Voor het testen van een zelfde component zijn de directe doelen tijds- en uitkomstafhankelijk van elkaar, en vormen een eenheid, waardoor toetsen op een lager aggregatieniveau niet mogelijk is.

Het is duidelijk welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Het ongerief waarmee de dieren mogelijk zouden kunnen worden geconfronteerd wordt in belangrijke mate bepaald door de effecten van de bacteriële infecties. De DEC is dan ook van mening dat de aanvraag voldoende samenhang heeft en toetsbaar is.

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 Flora- en faunawet).

NVT

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 in de aanvraag aangekruiste doelcategorie "*Translatieel of toegepast onderzoek*" sluit aan bij de hoofddoelstelling.

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 (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C4; zie bijlage I voor voorbeeld*).

In toenemende mate blijken bacteriële infecties ongevoelig voor de huidige antibiotica. Om toch een adequate behandeling te kunnen geven is het noodzakelijk van bestaande middelen, nieuwe combinaties en nieuwe middelen de doseringen en toedieningswijzen te optimaliseren en te ontwikkelen.

De directe doelen van dit project zijn:

- A. Het aanpassen van het bestaande dijspier- en longmodel voor nog niet eerder door de onderzoeksgroep gebruikte klinisch relevante bacteriestammen.
- B. Het bepalen van de exposure-response relaties (PK/PD) van 10 middelen als mono-behandeling en 5 combinaties van bestaande en/of nieuwe antibiotica en/of non-antibiotica gericht op multiresistente en moeilijk behandelbare bacteriële infecties om inzicht te verkrijgen in welke dosering, in welke frequentie, via welke route en hoe lang deze toegediend moeten worden.

Hiermee worden dossiers opgebouwd voor het vervolgens uitvoeren van klinisch onderzoek.

Uiteindelijk zal dit onderzoek leiden tot het breed beschikbaar komen van geoptimaliseerde behandelingen van multiresistente en moeilijk behandelbare bacteriële infecties.

Hoewel een aantal van de te testen middelen al worden toegepast in de kliniek en het veiligheidsprofiel al bekend is, zou zonder het uitvoeren van de in dit project voorgestelde dierproeven de noodzakelijke optimalisering van het gebruik hiervan veel langdurige klinische studies vereisen.

De DEC is van mening dat er een duidelijke relatie bestaat tussen de directe doelen en het uiteindelijke doel en dat de directe doelen gerechtvaardigd zijn in de context van dit onderzoeksveld en het toepassingsgebied.

De onderzoeksgroep heeft veel ervaring met dit type onderzoek en de daarbij gebruikte modellen. Het is aannemelijk dat mede ook door de inbedding positieve resultaten uit dit onderzoek zullen leiden tot toepassingen in de kliniek.

De DEC is daarom van mening dat er binnen dit project een reële relatie is tussen het directe doel en het uiteindelijke doel. Bovendien is zij van mening dat het directe doel in wetenschappelijke zin gerechtvaardigd is zowel in bredere zin als binnen de context van het betreffende onderzoeksveld.

5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 2.B en tabel 1; zie bijlage I voor voorbeeld*)

De belangrijkste belanghebbenden in dit project zijn: de proefdieren, de doelgroep patiënten, de maatschappij, het onderzoeksveld, de indieners en de farmaceutische industrie.

- Voor de proefdieren geldt dat hun welzijn matig (voor 85% van de dieren) en ernstig (voor 15% van de dieren) zal worden aangetast. De experimentele handelingen zijn op zichzelf weinig belastend. Het ongerief wordt vooral veroorzaakt door de klinische verschijnselen die optreden na de bacteriële challenge. De integriteit van de proefdieren wordt aangetast door het instrumentele gebruik, het ziek maken, de huisvesting in een proefdierfaciliteit (beperkingen van fysiologische en ethologische behoeftes) en het doden in het kader van het experiment. De dieren hebben er belang bij gevrijwaard te blijven van aantasting van hun welzijn en integriteit.
- Voor de doelgroep (patiënten met een bacteriële infectie) is het onderzoek van belang omdat het beschikbaar komen van nieuwe/verbeterde behandelingen kan bijdragen aan hun gezondheid en aan verbetering van hun kwaliteit van leven. Het beter en efficiënter kunnen behandelen van soms levensbedreigende infecties zal de ziektelast verkorten en mogelijk levens redden.
- De maatschappij is een belangrijke belanghebbende in dit project. De resultaten uit het voorgestelde onderzoek kunnen effectievere antibacteriële behandelingen opleveren en nieuwe kennis over de werkzaamheid en werkingsmechanismen hiervan. Hiermee kunnen uiteindelijk betere voorspellingen worden gedaan over de keuze en de toepassing van antibacteriële middelen en de maatschappelijke last van bacteriële infecties worden vermindert.
- Het onderzoeksveld heeft belang bij dit onderzoek omdat het de fundamentele kennis over het optimaliseren van behandelingen en het ontwikkelen van resistentie zal opleveren. Er zijn wel methoden ontwikkeld om de PK/PD relaties van antimicrobiële middelen te bestuderen, maar methoden om het *in vivo* effect van non-antibiotica en combinaties te bepalen zijn niet beschikbaar. In dit project worden deze methoden ontwikkeld en verder geoptimaliseerd. Door studies uit te voeren in twee modellen kunnen bovendien de doseringsschema's bij verschillende soorten infecties worden onderzocht. Door het ontwikkelen van computermodellen op basis van de resultaten van de experimenten wordt

getracht het effect van de (combinaties van) middelen steeds beter te kunnen voorspellen.

- Voor de aanvrager is er sprake van een wetenschappelijke en een economische activiteit. Het project past bij de missie van de instelling, het bevorderen van gezondheid van de mens.
- Voor de farmaceutische industrie die (deels) de te onderzoeken middelen zal aanleveren is er sprake van een economisch belang.

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

De in het project beschreven experimenten bestaan uit het besmetten van muizen met klinisch relevante bacterie stammen. De commissie gaat er vanuit dat door de instelling alle maatregelen m.b.t. bio-containment worden genomen om de risico's voor de omgeving volledig te voorkomen en er dus geen sprake is van substantiële milieueffecten.

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. *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C5).*

De kennis en kunde van de aanvrager en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd. De aanvrager, een ervaren onderzoeksorganisatie, beschikt over uitgebreide ervaring met dit soort studies en over de daarvoor benodigde voorzieningen. De commissie is ervan overtuigd dat de ervaring en expertise bij de aanvrager ertoe zullen leiden dat de directe doelstellingen en de einddoelstelling haalbaar zijn, dat er zorgvuldig met de dieren gewerkt zal worden en dat er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden.

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. *Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C6).*

De doelstellingen van het project zijn realistisch en de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten hier logisch en herleidbaar bij aan. De indieners hebben veel ervaring in dit onderzoeksveld en met de voorgestelde diermodellen.

Er zijn voor de 5 verschillende fases in het onderzoek en het gebruik van één of beide modellen (zie ook C15) entreecriteria (go/no go momenten) beschreven. Deze keuzes zijn voldoende onderbouwd.

De commissie is van mening dat uitgaande van de inherente onzekerheden rond de uiteindelijk te testen middelen, met de voorgestelde opzet de directe doelen, haalbaar zijn binnen de aangevraagde looptijd van het project.

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 *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C1; zie bijlage I voor toelichting en voorbeelden).*

NVT.

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 zullen worden gehuisvest conform de 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 (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*).

De indieners hebben duidelijk gemaakt dat het voor het behalen van de doelstellingen in een aantal gevallen het bereiken van een situatie met ernstig ongerief onvermijdelijk is. De humane eindpunten zijn zodanig geformuleerd dat deze situatie nooit langer dan 8 uur zal duren.

Bij het aanpassen van de beide bestaande modellen zal maximaal 50% van de 540 dieren worden geconfronteerd met een humaan eindpunt resulterend in ernstig ongerief.

Op basis van de resultaten uit het voorafgaande onderzoek is de verwachting dat in de PK experimenten (in elk model 10 monobehandelingen en 5 combinatie-behandelingen) 33% van de dieren (3920) zal uitvallen. Hiervan zal 5% (196 dieren) geconfronteerd worden met ernstig ongerief. Voor alle overige dieren is sprake van matig ongerief.

Voor de exposure-respons experimenten is op basis van de ervaringen met dit type experimenten in het verleden de inschatting dat ongeveer de helft van de studies zal worden uitgevoerd met stammen die een gematigd klinisch beeld geven (muizen ondervinden maximaal matig ongerief). De andere helft van de experimenten zal uitgevoerd worden met stammen die in de placebo-behandelde en in de laag-gedoseerde muizen een ernstig klinisch beeld geven. De verwachting is dat in beide modellen 15% van de dieren (totaal 1952 dieren) geconfronteerd zal worden met ernstig ongerief.

Voor de overige dieren is sprake van matig ongerief.

Het ongerief is gegeven de inherente onzekerheid rond de uiteindelijk te gebruiken bacteriestammen en de te testen middelen herleidbaar ingeschat en geclassificeerd. Omdat de wetenschappelijke eindpunten alleen bereikt kunnen worden wanneer de dieren het volledige doseringsschema kunnen afmaken is de kans op ernstig ongerief bij dieren waarbij de testmiddelen niet werken of die een controle middel krijgen onvermijdelijk.

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. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*). (*zie bijlage I voor voorbeeld*).

De integriteit van de dieren wordt aangetast door het instrumentele gebruik, het ziek maken, de huisvesting in een proefdierfaciliteit (beperking van fysiologische en ethologische behoeftes) en het doden na afloop van de proef.

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 (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

Er wordt voor het toepassen van de humane eindpunten een scoringsysteem toegepast. Dit is specifiek toegespitst op de in dit project voorgestelde type experimenten. Tijdens de experimenten worden de dieren dagelijks met behulp van dit scoringsysteem gemonitord.

De indieners hebben aangegeven dat om wetenschappelijke conclusies te kunnen trekken het noodzakelijk is dat per studie een groep dieren een hoge bacteriële load krijgt, om een effectieve (bacteriedodende) dosering van een middel te kunnen bepalen. Alleen op deze manier kunnen de dosering en de PK/PD index die nodig is voor bacteriostasis (geen bacteriegroei) en voor afdoding van de bacteriën bepaald worden. In deze groep dieren met een hoge bacteriële load kan dit leiden tot een ernstige klinische infectie resulterend in ernstig ongerief.

De duur van dit ernstig ongerief wordt beperkt door het humane eindpunt '*maximaal 8 uur ernstig ongerief*'. Op basis van deze strategie/criteria valt voor de betreffende dieren het wetenschappelijke eindpunt dus samen met het humane eindpunt. Aangegeven is dat deze periode met ernstig ongerief noodzakelijk is om wetenschappelijke conclusies te kunnen trekken uit dit onderzoek.

3V's

14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

Voordat middelen in dieren getest worden, worden ze eerst *in vitro* onderzocht. Alleen de (combinaties van) middelen met potentie om *in vivo* werkzaam te kunnen zijn, zullen in dieren onderzocht worden. Voor het opstellen of herzien van de productinformatie van middelen zijn gegevens uit dierexperimenten (nog) nodig.

Er zijn nog geen *in vitro* of *in silico* methoden beschikbaar om de complexe interacties tussen de immunologische en fysiologische reacties en de effecten van antibiotica op een bacteriële infectie in een levend organisme te modelleren.

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 (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

De aantallen experimenten (en dus de aantallen dieren) worden bepaald door vragen vanuit de kliniek en de partners in het onderzoek, waaronder de industrie.

Voor de berekening van de aantallen experimenten onder dit project wordt in eerste instantie uitgegaan van een 'theoretisch' maximum scenario. Dit wordt bepaald door het aantal verwachte te testen componenten (10 mono-behandelingen en 5 combinatie-behandelingen) en het in alle gevallen testen hiervan in beide modellen (het dijbeenspiermodel en het longmodel).

De experimentele variabelen die vervolgens het aantal benodigde dieren bepalen (aantallen bacteriestammen, aantallen inocula, sectiemomenten, doseringsschema's, groepsgroottes) alsmede de verschillende controlegroepen en eventuele comparator groepen zijn bepaald op basis van de kennis en ervaring in het verleden.

Voor elk model zijn er in principe 5 experimentele fases:

Fase 1: Aanpassen van de bestaande modellen.

Er wordt hierbij uitgegaan van het testen van 10 verschillende bacteriestammen (540 muizen per model)

Fase 2: Screening op vroege bacteriedodende activiteit.

Per behandeling (10x mono en 5x combinatie) 88 muizen (1320 muizen per model)

Fase 3: Exposure-respons relatie;

Studie A: Bepaling van het in vivo PK profiel: Per behandeling (10x mono en 5x combinatie) 88 muizen (1320 muizen per model)

Studie B: Bepaling van de effectiviteit van middelen – en daarmee met behulp van het PK profiel expositie: Per behandeling (10x mono (2160 muizen) en 5x combinatie (2160 muizen)) (totaal 4320 muizen per model)

Studie C: Dosis-fractioneringsstudie: Per behandeling (10x mono (5040 muizen) en 5x combinatie (3000 muizen)) (totaal 8040 muizen per model)

Fase 4: Validatie van de PK/PD voor de bepaling van de farmacodynamische target en de variatie daarin tussen stammen ter ondersteuning van breekpunt bepaling:

Per behandeling (10x mono (2700 muizen) en 5x combinatie (1530 muizen)) (totaal 4230 muizen per model)

Fase 5: Effect van verschillende doseringsverhoudingen van twee middelen:

Per behandeling (5x combinatie (1620 muizen))

De indieners hebben aangegeven dat van dit theoretisch totaal aantal dieren van 25410 dieren per model 2/3 zal afvallen ten gevolge van Go/no go beslissingen tussen de verschillende fases en ook omdat er minder dan het maximaal aantal berekende dierproeven voor alle bacteriestammen, doseringsschema's en tijdstippen nodig zullen zijn. Het totaal aantal dieren dat onder dit project aangevraagd wordt is dus voor 2 modellen $2 \times 9010 = 18020$ muizen.

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 (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

Het project is in overeenstemming met de vereiste van verfijning van dierproeven. De neutropenie is zodanig geoptimaliseerd dat het risico op ziekte/ongerief minimaal is.

Voor de *in vivo* doseringen wordt rekening gehouden met wat bekend is over toxiciteit en/of tolerantie van de middelen, de minimaal toxische dosis of de maximaal getolereerde dosis zijn de hoogste doses die *in vivo* worden getest voor het bepalen van exposure-response relaties.

De commissie onderschrijft de conclusie dat op dit moment verdere verfijningen niet mogelijk zijn.

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.
Het betreft geen wettelijk vereist 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. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3; zie bijlage I voor voorbeeld*).

De experimenten worden uitgevoerd in vrouwelijke dieren. Hierdoor wordt een zeer gestandaardiseerd PK profiel bepaald met weinig variatie. Alleen dan is het mogelijk de groepsgroottes in de proeven voor bepaling van de exposure-respons relatief klein te houden.

Er is meestal een directe correlatie tussen de PK/PD indexen in vrouwelijke proefdieren en mensen (vrouw én man) voor verschillende antibiotica. In het in de literatuur beschreven dijspiermodel wordt ook gebruik gemaakt van vrouwelijke muizen. Door in dit project ook vrouwelijke muizen te gebruiken kunnen resultaten vergeleken worden met eerder verkregen resultaten (literatuur en eigen data).

Om de microbiële status van de dieren in alle experimenten constant te houden worden alle dieren betrokken van een geregistreerd fok en toeleveringsbedrijf. Er ontstaan door de keuze voor vrouwelijke dieren lokaal dan ook geen fokoverschotten.

De commissie acht de keuzes voor het exclusief gebruik van vrouwelijke dieren voldoende onderbouwd.

19. Geef aan of dieren gedood worden in 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 (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

Aan het einde van de experimenten worden de dieren gedood omdat de weefsels gebruikt worden voor wetenschappelijke analyses. Hieruit worden het optimale bacteriële inoculum en de PK/PD relaties bepaald.

Alle dieren worden gedood met een dodingsmethode passend voor de betreffende diersoort en die vermeld staat in bijlage IV van de richtlijn.

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

Er worden geen dieren gedood om niet-wetenschappelijke redenen.

NTS

21. Is de niet-technische samenvatting een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd?

De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

1. Benoem de centrale morele vraag (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.A*).

Rechtvaardigt het belang van de op basis van gestandaardiseerde PK/PD informatie in twee modellen verzamelde kennis over doseringen en toedieningswijzen van 10 middelen als mono-behandeling en 5 combinaties van middelen in mensen, de aantasting van het welzijn en de integriteit van maximaal 18020 muizen (80% matig en 20% ernstig ongerief)?

2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen 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 (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.B; zie bijlage I voor voorbeelden*).

Het welzijn van de aangevraagde 18020 muizen wordt matig (voor 80% van de dieren) of ernstig (voor 20% van de dieren) aangetast. Het ongerief wordt bepaald door de ziekteverschijnselen na de bacteriële besmettingen. Bij de dieren met een hoge bacteriële load kan dit leiden tot een ernstige klinische infectie resulterend in ernstig ongerief. Dit is noodzakelijk voor het behalen van de beoogde doelen. Dieren worden gedood voor analyse als onderdeel van de dierproef. De integriteit wordt aangetast door het instrumentele gebruik als proefdier, het ziek maken in het kader van de proef, de huisvesting in een proefdierfaciliteit en het doden aan het eind van de proef. Het belang van de proefdieren om gevrijwaard te blijven van deze aantasting van hun welzijn en integriteit, is groot.

Voor de maatschappij is het belang van de beschikbaarheid van optimale behandelingsstrategieën voor bestaande of nieuwe antibiotica of combinatiepreparaten die beschermen tegen nieuwe (resistente) bacterievarianten groot. Hiermee kunnen ziekte, sterfte en economische en maatschappelijke schade worden voorkomen.

Voor de aanvrager is er sprake van een klinisch, een toegepast wetenschappelijk en een economische belang. Het project sluit aan bij de missie van de instelling, het bevorderen van gezondheid bij de mens. Een economisch belang (bijvoorbeeld het verkrijgen van onderzoeksgelden) is vanuit ethisch gezichtspunt niet bezwaarlijk en staat bij deze studies ook niet voorop. De aanvrager zal het in dit geval vooral van belang achten te handelen in overeenstemming met de missie van de instelling.

De resultaten uit het onderzoek (een onderbouwd doseringsvoorstel voor de behandeling van een bepaalde bacteriële infectie met nieuwe of bestaande antibiotica) zullen als dossier aan de EMA worden aangeboden in voorbereiding op klinische studies naast de gebruikelijke wetenschappelijke communicatie via publicaties in wetenschappelijke tijdschriften en met de partners in dit onderzoek.

Voor de farmaceutische industrie kunnen de resultaten mogelijk helpen bij de ontwikkeling en het op de markt brengen van nieuwe antibioticaproducten om de resistentie tegen bestaande antibiotica te omzeilen. Dit dient tevens een maatschappelijk belang.

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 (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.C; zie bijlage I voor voorbeeld*).

De DEC is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager, van het belang van de doelstelling van het project: het ontwikkelen van onderbouwde toedieningsprotocollen voor bestaande en nieuw ontwikkelde antibiotica.

De project levert mede door de kwaliteit en positie van de aanvrager een directe bijdrage aan de kliniek, de maatschappij, de wetenschap en uiteindelijk mogelijk de industrie.

Met inzicht in de optimale toedieningsprocedures en eventuele resistentie tegen bestaande en nieuwe antibiotica kan uiteindelijk de maatschappij beter beschermd

worden en kan de industrie met een grotere kans meer gerichtere (en dus effectievere) antibiotica (of combinatiepreparaten) produceren. De commissie is van mening dat het belang van de doelstellingen voor met name de kliniek en de samenleving, voldoende zwaar wegen om het schaden van de belangen van de proefdieren in de vorm van de evidente aantasting van hun integriteit en aantasting van het welzijn te rechtvaardigen.

De DEC is van mening dat het project goed is opgezet en dat binnen de looptijd van het project de gekozen strategie en de experimentele aanpak kunnen leiden tot betrouwbare uitkomsten.

De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er voor de voorgestelde dierproeven geen geschikte vervangingsalternatieven zijn, dat het doel niet met minder dieren behaald kan worden, dat de gebruikte aanpak de meest verfijnde is en dat voorkomen wordt dat mens, dier en milieu onbedoelde negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven.

De DEC is van oordeel dat het belang van de doelstellingen de aantasting van de integriteit en de onvermijdelijke nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren, rechtvaardigt.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

- De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarde
 - Op grond van het wettelijk vereiste (het risico op ernstig ongerief in een deel van de dieren) dient de indiener bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.

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 (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.A; zie bijlage I voor voorbeeld*).

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op een meerderheidsstandpunt. Het minderheidsstandpunt had niet betrekking op het belang van het onderzoek, maar richtte zich op de belangen en waarden van de in dit project opgevoerde dieren waarvan een aanzienlijk deel geconfronteerd wordt met een risico op ernstig ongerief.

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 (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.B*).

De DEC ervaart het als een bezwaar dat op het moment van de beoordeling van een vervolgproject als dit het voorgaande project nog niet afgesloten is en er dus ook nog geen rapportage voor een beoordeling achteraf beschikbaar is. Deze kan nu dus niet betrokken worden in de afweging van het vervolgproject. Verder zijn er geen knelpunten of dilemma's geconstateerd - zowel binnen als buiten de context van het project - die de verantwoordelijkheid en competentie van de DEC overstijgen.



Aanvraag

Projectvergunning Dierproeven

Administratieve gegevens

- U bent van plan om één of meerdere dierproeven uit te voeren.
- Met dit formulier vraagt u een vergunning aan voor het project dat u wilt uitvoeren. Of u geeft aan wat u in het vergunde project wilt wijzigen.
- Meer informatie over de voorwaarden vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl, of in de toelichting op de website.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1

Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 5.1 lid2h <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen																										
1.2	Wat voor aanvraag doet u?	<input checked="" type="checkbox"/> Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 1.3 <input type="checkbox"/> Wijziging > Vul hiernaast het AVD nummer van uw vergunde project in en ga verder met vraag 2.1 <input type="checkbox"/> Melding > Vul hiernaast het AVD nummer van uw vergunde project in en ga verder met vraag 2.2																										
1.3	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table border="1"> <tr> <td>Naam instelling of organisatie</td> <td colspan="3">5.1 lid2h</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">Titel, voorletters en achternaam van de portefeuillehouder</td> <td>Titel</td> <td>Voorletters</td> <td>Achternaam</td> </tr> <tr> <td colspan="3">5.1 lid2h</td> </tr> <tr> <td>E-mailadres contactpersoon</td> <td colspan="3">5.1 lid2h</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">Titel, voorletters en achternaam van de diens gemachtigde (indien van toepassing)</td> <td>Titel</td> <td>Voorletters</td> <td>Achternaam</td> </tr> <tr> <td colspan="3"> <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw </td> </tr> <tr> <td>E-mailadres gemachtigde</td> <td colspan="3"></td> </tr> </table>	Naam instelling of organisatie	5.1 lid2h			Titel, voorletters en achternaam van de portefeuillehouder	Titel	Voorletters	Achternaam	5.1 lid2h			E-mailadres contactpersoon	5.1 lid2h			Titel, voorletters en achternaam van de diens gemachtigde (indien van toepassing)	Titel	Voorletters	Achternaam	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw			E-mailadres gemachtigde			
Naam instelling of organisatie	5.1 lid2h																											
Titel, voorletters en achternaam van de portefeuillehouder	Titel	Voorletters	Achternaam																									
	5.1 lid2h																											
E-mailadres contactpersoon	5.1 lid2h																											
Titel, voorletters en achternaam van de diens gemachtigde (indien van toepassing)	Titel	Voorletters	Achternaam																									
	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw																											
E-mailadres gemachtigde																												
	Vul de gegevens van het postadres in.	<table border="1"> <tr> <td>Straat en huisnummer</td> <td colspan="3">5.1 lid2h</td> </tr> <tr> <td>Postcode en plaats</td> <td colspan="3">5.1 lid2h</td> </tr> <tr> <td>Postbus, postcode en plaats</td> <td colspan="3">5.1 lid2h</td> </tr> </table>	Straat en huisnummer	5.1 lid2h			Postcode en plaats	5.1 lid2h			Postbus, postcode en plaats	5.1 lid2h																
Straat en huisnummer	5.1 lid2h																											
Postcode en plaats	5.1 lid2h																											
Postbus, postcode en plaats	5.1 lid2h																											
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1"> <tr> <td>(Titel) Naam en voorletters</td> <td>5.1 lid2e</td> <td><input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td>5.1 lid2e</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td>5.1 lid2h</td> <td></td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters	5.1 lid2e	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.	Functie	5.1 lid2e		Afdeling	5.1 lid2h																		
(Titel) Naam en voorletters	5.1 lid2e	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.																										
Functie	5.1 lid2e																											
Afdeling	5.1 lid2h																											

	Telefoonnummer	5.1 lid2e	
	E-mailadres	5.1 lid2e	
1.5	(Indien van toepassing) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	5.1 lid2e <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
	Functie	5.1 lid2e	
	Afdeling	5.1 lid2h	
	Telefoonnummer	5.1 lid2e	
	E-mailadres	5.1 lid2e	
1.6	(Indien van toepassing) Vul hier de gegevens in van de persoon aan wie de portefeuillehouder de verantwoordelijkheid inzake de algemene uitvoering van het project en de overeenstemming daarvan met de projectvergunning heeft gedelegeerd.	(Titel) Naam en voorletters	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
	Functie		
	Afdeling		
	Telefoonnummer		
	E-mailadres		
1.7	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de Instantie voor Dierenwelzijn	Telefoonnummer	5.1 lid2h
	E-mailadres	5.1 lid2h	
1.8	Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?	<input type="checkbox"/> Ja > Stuur dan het ingevulde formulier Melding Machtiging mee met deze aanvraag <input checked="" type="checkbox"/> Nee	

2 Over uw aanvraag

2.1	Gaat uw aanvraag over een wijziging op een vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn?	<input checked="" type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3 <input type="checkbox"/> Ja > Geef hier onder kort de wijziging en de onderbouwing daarvan weer. Geef in de originele formulieren (niet-technische samenvatting, projectvoorstel en bijlage dierproeven) duidelijk aan (bij voorbeeld in een andere kleur) waar de projectaanvraag wijzigt. Ga daarna verder met vraag 6.
2.2	Gaat uw aanvraag over een melding op een vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn?	<input checked="" type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3 <input type="checkbox"/> Ja > Geef hier onder weer wat deze melding inhoudt en ga verder met vraag 6

3 Over uw project

3.1	Wat is de geplande start- en einddatum van het project?	Startdatum 01 - 06 - 2022 Einddatum (t/m) 31 - 05 - 2027
3.2	Wat is de titel van het project?	Nieuwe (combinatie)therapieën tegen infecties door multiresistente en moeilijk behandelbare bacteriën 2
3.3	Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Nieuwe (combinatie)therapieën tegen infecties door multiresistente en moeilijk behandelbare bacteriën 2
3.4		Naam DEC 5.1 lid2h Postadres 5.1 lid2h

Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) van voorkeur?

E-mailadres

5.1 lid2h

4 Factuurgegevens

4.1 (indien factuuradres afwijkt van de gegevens uit vraag 1.3) Vul de gegevens van het factuuradres in.

Naam:		Afdeling:	
Straat:		Huisnummer:	
Postcode:	Plaats:		
Postbus:	Postcode:	Plaats:	
E-mail:			

4.2 (optioneel) Vul hier het ordernummer van de instelling in.

Ordernummer:

5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

- Projectvoorstel Aantal bijlage(n) dierproeven 2
- Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen, indien van toepassing

- Melding Machtiging
-

6 Ondertekening

6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD en per post naar de Centrale Commissie Dierproeven (voor adresgegevens zie website)

Ondertekening door de portefeuillehouder namens de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.8). De ondergetekende verklaart:

- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
- dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
- dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel C van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
- dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
- dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam	5.1 lid2e
Functie	Gemandateerd vergunninghouder
Plaats	5.1 lid2h 5.1 lid2e
Datum	17 - 03
Handtekening	



Formulier

Projectvoorstel dierproeven

- Dit formulier gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
- Bij dit formulier hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
- Meer informatie vindt u in de 'Toelichting op de te gebruiken formulieren voor de aanvraag van een projectvergunning' op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in. 5.1 lid2h
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in. 5.1 lid2h
- 1.3 Vul de titel van het project in. Nieuwe (combinatie)therapieën tegen infecties door multiresistente en moeilijk behandelbare bacteriën 2

2 Categorie van het project

- 2.1 In welke categorie valt het project?
- U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.*
- Fundamenteel onderzoek
- Translationeel of toegepast onderzoek
- Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
- Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid of het welzijn van mens of dier
- Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
- Hoger onderwijs of opleiding
- Forensisch onderzoek
- Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

Licht het project toe. Beschrijf de aanleiding, de achtergrond en de context. Besteed aandacht aan de bij vraag 2.1 aangekruiste categorieën.

Het probleem

Antibiotica zijn essentieel bij de behandeling van bacteriële infecties. Echter, dergelijke behandelingen zijn niet in alle gevallen effectief waardoor infecties toch nog gecompliceerd of zelfs fataal kunnen verlopen. Bijkomen probleem is de toegenomen **resistentie** tegen verschillende antibiotica.

In 2017 heeft de Wereldgezondheidsorganisatie een lijst met zogenaamde '**priority pathogens for R&D of new antibiotics**' gepubliceerd. Deze lijst geeft aan voor welke bacteriële infecties nieuwe behandelingen en/of nieuwe antibiotica het meest urgent zijn.

Priority 1 – critical:

- *Acinetobacter baumannii*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Enterobacterales*, waaronder *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*

Priority 2 – high:

- *Enterococcus faecium*
- *Staphylococcus aureus*
- *Helicobacter pylori*
- *Campylobacter* spp
- *Salmonellae*
- *Neisseria gonorrhoeae*

Priority 3 – medium:

- *Streptococcus pneumoniae*
- *Haemophilus influenzae*
- *Shigella* spp

Klinisch gezien worden *K. pneumoniae* en *E. coli* als meest voorkomende veroorzakers van infecties gezien en zijn dus klinisch ook zeer relevant. Dit soort organismen kunnen verschillende soorten infecties geven. Maar meest voorkomend zijn urineweginfecties al dan niet gepaard gaand met bacteremiën.

De *Acinetobacters* en *Pseudomonas* zijn vaak betrokken bij ziekenhuisinfecties. Patiënten worden eerst gekoloniseerd door deze organismen en kunnen vervolgens overgaan tot daadwerkelijke infecties. Het is dan ook nodig nieuwe strategieën te ontwikkelen tegen deze en andere organismen op deze lijst van priority pathogens door de toename in resistentie tegen bestaande middelen.

Veel van de antibiotica die we vandaag de dag gebruiken zijn zo'n 60 jaar geleden geïntroduceerd, in een tijd waarin we nog geen gebruik maakten van de **PK/PD** principes om de effectieve dosering vast te stellen. (Meer uitleg over deze PK/PD principes volgt hieronder.) Vandaar dat deze bestaande ("oude"), maar ook nieuwe middelen bestudeerd moeten worden om op grond van de **in vivo effectiviteit** en hun PK/PD relatie nauwkeurig de dosering vast te stellen.

Behalve deze aspecten zijn ook andere aspecten relevant voor de effectiviteit, zoals de bereikbaarheid van deze middelen op verschillende plekken in het lichaam. Bacteriën kunnen zich immers bevinden op een plek in het lichaam waar ze met systemisch toegediende medicatie niet bereikbaar zijn, iets dat ook bij overigens gezonde mensen kan leiden tot een ernstige afloop. Verder hebben tegenwoordig veel patiënten een verminderde afweer omdat ze behandeld worden met medicatie die immunosuppressief werkt (bij indicaties zoals auto-immuunziekten, orgaantransplantatie, kanker) waardoor het immuunsysteem niet voldoende bijdraagt aan de eliminatie van bacteriën. Ook zijn veel bacteriën intrinsiek resistent of resistent geworden tegen antibiotica (selectiedruk) waardoor er een dringende behoefte is aan nieuwe behandelingen. Deze problematiek is niet zozeer het gevolg van medisch handelen in Nederland (terughouden antibioticabeleid en microbiologische monitoring in ziekenhuizen), maar neemt wel toe door royaler medisch gebruik van antibiotica in het buitenland (vaak zonder dat moeite wordt gedaan om verdere verspreiding van resistentie te voorkomen) en is af en toe ook afkomstig uit de dierhouderij. In een in 2016 verschenen rapport in opdracht van de Engelse regering was de eindconclusie dat infecties door bacteriën die resistent zijn tegen bestaande antibiotica binnen enkele decennia de **grootste bedreiging voor de gezondheid** vormen.

Alternatieven voor de huidig gebruikte antibiotica zijn dringend nodig om bacteriële infecties ook in de toekomst te kunnen blijven behandelen. Een alternatief kan zijn het optimaliseren van de doseringsschema's van bestaande middelen ter verbetering van de effectiviteit en ter voorkoming van resistentieselectie tijdens therapie, en het ontwikkelen van doseringsschema's voor nieuwe (combinaties van) middelen (antibiotica en non-antibiotica).

Farmacokinetiek (PK) en farmacodynamiek (PD)

De **optimale dosering** van antibiotica is van belang voor de patiënt, enerzijds voor een effectieve behandeling, en anderzijds ter voorkoming van resistentie van het pathogeen en de normaal aanwezige microflora in en op het lichaam. De optimale dosering van een antibioticum om het gewenste effect te bereiken is afhankelijk van een aantal factoren, waarvan de belangrijkste zijn:

1. De activiteit van het antibioticum. Voor een bacterie wordt deze uitgedrukt in de **MRC (minimaal remmende concentratie)**, in het Engels MIC, minimum inhibitory concentration). Deze wordt eerst *in vitro* bepaald.
2. De wijze waarop het antibioticum de bacterie doodt. Dit kan heel langzaam zijn maar ook heel snel en verschilt per bacteriesoort en, in mindere mate, per bacteriestam (**farmacodynamiek, PD**).
3. De concentraties die bereikt worden in de patiënt (de 'exposure') over de tijd – de concentraties vertonen fluctuaties door de dosering en de eliminatie van het middel (**farmacokinetiek, PK**).
4. De concentratie-effect (exposure-respons) relatie over de tijd, waarbij als effectmaat de mate van doding ('killing') van bacteriën wordt gebruikt ten opzichte van de concentratie van het middel in de patiënt, is afhankelijk van ieder van de drie eerste factoren (**PK/PD**). De PK/PD index is een maat die deze relatie het best omschrijft. Deze geeft inzicht in hoe het optimale doseringsschema eruit ziet: is de totale dagdosis het belangrijkste, of de hoogste concentratie die bereikt kan worden, of moet juist heel vaak gedoseerd worden? Tevens kan de waarde van de PK/PD index bepaald worden die minimaal bereikt dient te worden voor een optimaal effect.

Deze vier factoren samen bepalen uiteindelijk welk doseringsschema voor een antibioticum de hoogste kans op slagen biedt. Door de **PK/PD index** en de waarde ervan te vertalen naar de patiënt kan het optimale doseringsschema in de patiënt worden bepaald. De interactie tussen de genoemde factoren is echter groot en met name het hierboven genoemde punt 4 – de exposure-respons relatie over de tijd, PK/PD – is niet goed voorspelbaar. Hiertoe zijn dierproeven noodzakelijk en de uitkomsten hiervan worden gebruikt om te komen tot aanbevolen doseringsschema's (hoogte, frequentie, duur). Uit de uitkomst van deze proeven kan vastgesteld worden wat de optimale dosering van een middel is en welke bacteriesoorten klinisch gevoelig zijn voor het middel. Dit laatste is uiteraard afhankelijk van de gebruikte dosering: met hogere doseringen kunnen relatief wat minder gevoelige bacteriën vaak nog goed bestreden worden, mits maar duidelijk is hoe precies de exposure-respons relatie in de tijd ligt. Dit wordt samenvattend de 'pharmacodynamic target' genoemd. Dit is de doel-exposure van het antibioticum ten opzichte van de MRC van de bacterie.

Voor deze proefdierstudies past onze afdeling twee beproefde en uitgebreid in de literatuur beschreven infectiemodellen van weefsel- en longinfectie toe om de effectiviteit van (combinaties van) antibiotica en/of non-antibiotica tegen multiresistente en moeilijk behandelbare bacteriën te onderzoeken:

- **Dijspiermodel**
- **Longmodel**

Deze modellen worden aanbevolen in de richtlijnen van het European Medicines Agency (EMA) en zijn internationaal geaccepteerd voor het bepalen van de PK/PD index en de PD target, om doseringen in klinische studies te bepalen. Het EMA moet uiteindelijk het doseringsvoorstel goedkeuren. Onze onderzoeksgroep en internationale partners hebben de ervaring dat resultaten verkregen in deze twee modellen door het EMA geaccepteerd worden in het dossier in voorbereiding op klinische studies. In de 'Guideline on the use of pharmacokinetics and pharmacodynamics in the development of antimicrobial medicinal products' van het EMA staat vermeld: "Most animal models involve mice. In the commonly used neutropenic mouse thigh and lung infection models mice are rendered neutropenic and then infected with an estimated inoculum of colony forming units ... in the thigh or lung that is known to be sufficient for assay sensitivity" Het dijspiermodel is een veelgebruikt en zeer gestandaardiseerd model dat gebruikt wordt om infecties in de weke delen te simuleren. Het longmodel wordt ook veel toegepast, omdat de penetratie van middelen in de longen kan afwijken van die in het bloed, waardoor middelen bij longinfecties verminderd effectief kunnen zijn.

In dit onderzoek worden de richtlijnen van het EMA gevolgd. In deze richtlijnen staat (in grote lijnen) wat voor soort studies gedaan moeten worden voor het bepalen van de PK/PD index en de PD target, maar betreffen geen precieze uitwerking van de studies. Deze richtlijnen voorkomen dat er studies worden gedaan waarvan de resultaten niet worden geaccepteerd voor het klinisch dossier. Welke studies met welke opzetten gedaan moeten worden, is afhankelijk van de reeds beschikbare informatie over het te onderzoeken middel, en van vergelijkbare middelen, met daarbij een duidelijke plaats voor wetenschappelijke overwegingen. (Het onderzoek betreft dus geen wettelijk verplicht onderzoek.)

Wat is er al gedaan?

Dit project is een vervolg op projectvergunning AVD5.1 lid2h "Nieuwe (combinatie)therapieën tegen infecties door multiresistente en moeilijk behandelbare bacteriën". In deze projectvergunning is de farmacokinetiek en -dynamiek van 10 bestaande ("oude") middelen als mono-behandeling, van 4 combinaties van deze middelen, en van 1 nieuw middel en verschillende analogen daarvan in het

dijspier- en/of het longmodel onderzocht. Analyse van de data van de bestaande middelen loopt momenteel. De data-analyse van het nieuwe middel wordt momenteel afgerond, de PK/PD index en target worden bepaald, en deze waarden worden gebruikt als input voor klinische studies die gepland staan. De analogen van dit nieuwe middel bleken soms meer, soms minder succesvol. Door dit te relateren aan onder andere de chemische structuur, verschillende *in vitro* karakteristieken (zoals MRC, maar bijvoorbeeld ook hemolytische activiteit) en *in vivo* tolerantie (onderzoek uitgevoerd door een projectpartner) zijn een beperkt aantal analogen uitgezocht met de meest gunstige eigenschappen geselecteerd voor verder onderzoek.

Het voorgestelde onderzoek

In dit project zal de effectiviteit van bestaande middelen, van nieuwe middelen (zowel antibiotica als non-antibiotica) en combinaties daarvan, worden onderzocht. Het is niet precies voorspelbaar welke middelen in de komende 5 jaar onderzocht zullen gaan worden. Voor nieuwe middelen is dit mede afhankelijk van de ontwikkelingsprogramma's van derden. Voor oude middelen en/of non-antibiotica zal eerst moeten blijken of er genoeg potentie is van combinaties *in vitro* om aannemelijk te maken dat zij *in vivo* werkzaam zullen zijn.

Deze (combinaties van) middelen zullen volgens de gestandaardiseerde aanpak van het PK/PD onderzoek worden bestudeerd. Dit zullen **bestaande middelen** zijn waarvan geen of zeer beperkte PK/PD data zijn, maar ook **nieuwe middelen** en **non-antibiotica**. Non-antibiotica omvatten bijvoorbeeld middelen die resistentiemechanismen neutraliseren (maar op zichzelf niet antimicrobieel werken) en middelen die niet geregistreerd zijn als antimicrobieel maar mogelijk wel een antibiotisch effect bezitten.

Voor het onderzoek worden middelen geselecteerd waarvan nog niet (volledig) bekend is, op basis van farmacokinetiek en -dynamiek, welke blootstelling er in patiënten minimaal nodig is voor een optimale antibiotische behandeling, waarbij ook het ontstaan van bacteriële resistentie wordt meegenomen.

De keuze voor (combinaties van) middelen wordt gebaseerd op:

- vragen vanuit de kliniek (bepaalde infecties zijn moeilijk te behandelen met de huidige antibiotica en behoeven therapieverbetering); en/of
- vragen van partners/opdrachtgevers met een nieuw middel waarvan nog geen/slechts beperkte PK/PD data beschikbaar is; en/of
- vragen vanuit wetenschappelijke projecten/samenwerkingen.

waarbij centraal staat dat het gaat over verbetering van behandeling van een klinisch relevante infectie die moeilijk behandelbaar is met de nu geregistreerde antibiotica in de toegepaste doseringsschema's.

Entrée criteria die worden gehanteerd bij het uiteindelijke besluit tot uitvoering van een studie zijn:

- De geselecteerde bacteriespecies en antibioticum(combinatie) zijn relevant voor de verbetering van behandeling van klinisch relevante infecties die moeilijk behandelbaar zijn met de nu geregistreerde antibiotica in de toegepaste doseringsschema's.
- Uit *in vitro* onderzoek moet blijken dat het middel of het middel gecombineerd met een antibioticum activiteit vertoont tegen de geselecteerde bacterie.
- Toxiciteits- en/of tolerantiegegevens van het middel moeten beschikbaar zijn.
- De uitkomst van deze studie moet richtinggevend zijn voor (latere) klinische vervolgstudies.

Context

De data die genereerd wordt in deze studies vormt een waardevol deel van de productinformatie van nieuwe (combinaties van) antibiotica en/of non-antibiotica te gebruiken bij bacteriële infecties en geeft een essentieel inzicht bij welke concentraties *in vivo* een middel effectief is. Op basis van deze resultaten kan besloten worden of doorgegaan wordt met klinische studies en/of de optimale dosering in patiënten met infecties worden vastgesteld.

De gegenereerde data zijn ook essentieel om het zogenaamde **klinische breekpunt** te kunnen vaststellen. Het klinisch breekpunt is de grenswaarde van de MRC die medisch microbiologische laboratoria gebruiken om aan te geven of een bacterie gevoelig of resistent is voor een middel. De behandelende arts gebruikt dit om te beoordelen of een middel juist wel of juist niet aan een patiënt kan of moet worden voorgeschreven.

3.2 Doel

3.2.1 Beschrijf het directe en het uiteindelijke doel van het project. Beschrijf de bijdrage van het behalen van het directe doel aan het uiteindelijke doel.

- Indien het directe doel bestaat uit verschillende subdoelstellingen, benoem deze dan hier.

De doelen van dit project zijn:

- A. Het aanpassen van het bestaande dijspier- en longmodel voor nog niet eerder door onze onderzoeksgroep gebruikte klinisch relevante bacteriestammen. Voor een aantal species waarmee onze onderzoeksgroep veel ervaring heeft, zoals *Escherichia coli* en *Klebsiella pneumoniae*, is bekend dat een standaard inoculum leidt tot een reproduceerbare infectie. Voor een aantal andere species, zoals *Pseudomonas aeruginosa* en *Acinetobacter baumannii*, is bekend dat het geschikte inoculum voor een reproduceerbare infectie wel sterk afhankelijk is van de stam waarmee men infecteert. Voor dit soort stammen is een voorafgaande inoculum-finding studie belangrijk.
- B. Het bestuderen van de exposure-response relatie (PK/PD) van (combinaties van) middelen (bestaande en/of nieuwe en/of non-antibiotica) bij multiresistente en moeilijk behandelbare bacteriële infecties om inzicht te verkrijgen in de vraag welke dosering, in welke frequentie en via welke route en hoe lang toegediend moet worden. Deze informatie kan worden gebruikt voor het opzetten van klinische trials.

Het **uiteindelijke doel** is:

Inzicht in de exposure-response relaties van deze (combinaties van) middelen zal uiteindelijk leiden tot verbetering en optimalisering van de behandeling van multiresistente en moeilijk behandelbare bacteriële infecties.

Welke middelen we precies zullen gaan onderzoeken in het dijspier- en in het longmodel is nog niet bekend, omdat de *in vitro* studies met verschillende (combinaties van) middelen momenteel volop gaande zijn. Hierbij wordt vaak 5.1 lid1c gebruikt. Het is zeer waarschijnlijk dat we dit middel dan ook in onze proefdiermodellen gaan onderzoeken. Andere middelen of combinaties zijn op dit moment nog niet bekend. Voor het onderzoek worden middelen geselecteerd waarvan nog niet (volledig) bekend is, op basis van farmacokinetiek en -dynamiek, welke blootstelling er in patiënten minimaal nodig is voor een optimale antibiotische behandeling, waarbij ook het ontstaan van bacteriële resistentie wordt meegenomen.

In de komende 5 jaar verwachten we per proefdiermodel 10 middelen als mono-behandeling en 5 combinaties van middelen (2 antibiotica gecombineerd of een antibioticum gecombineerd met remmers van beta-lactamase enzymen) te onderzoeken, voor klinisch relevante bacteriële infecties. We verwachten dat van deze middelen er 3 succesvol zullen zijn in onze dierproeven. Deze potentieel succesvolle (combinaties van) middelen kunnen vervolgens onderzocht worden in klinische studies.

3.2.2 Hoe wordt de haalbaarheid van het directe doel gewaarborgd?

Onze afdeling en onderzoeksgroep hebben jarenlange ervaring met dit soort onderzoek aan multiresistente en moeilijk behandelbare bacteriën en onderzoek met muizen, zodat haalbaarheid zeer waarschijnlijk is. Er is reeds uitgebreide ervaring binnen de onderzoeksgroep met de voorgestelde proeven en de benodigde faciliteiten en kennis om de doelstellingen te bereiken zijn aanwezig, zoals kennis van basale en moleculaire microbiologie, immunologie, en pathologie. Technieken zoals kweek van bacteriën, bepaling van antibioticumspiegels, etc. zijn allen operationeel en ook gestandaardiseerd. Daarnaast is in de faciliteit waar de proeven zullen worden uitgevoerd alle benodigde kennis over proefdieren aanwezig en ook de voorzieningen voor biologische veiligheid. Onze afdeling opereert binnen zeer sterke nationale en internationale samenwerkingsverbanden. Het voorgestelde onderzoek is wetenschappelijk getoetst binnen het kader van de projecten.

3.2.3 Is voor de uitvoering van dit project andere wet- en regelgeving van toepassing die een invloed zou kunnen hebben op het welzijn van de dieren en/of de haalbaarheid van het directe doel?

Nee

Ja > Geef aan welke wet-en regelgeving van toepassing is en beschrijf de effecten daarvan op het welzijn van de dieren en de haalbaarheid van het project.

3.3 Belang

3.3.1 Beschrijf het wetenschappelijk en/of maatschappelijk belang van de hierboven beschreven doelen.

Sociale relevantie

Door de wereldwijd toenemende mate van resistentie van bacteriën is behandeling van patiënten met infecties veroorzaakt door deze multiresistente bacteriën niet altijd meer goed mogelijk, met soms zelfs overlijden tot gevolg. Vanwege deze problematiek wordt er gezocht naar wegen om enerzijds behandeling van dergelijke multiresistente en moeilijk behandelbare infecties toch mogelijk te maken en om anderzijds resistentievorming te voorkomen of te omzeilen. Door het bestuderen van de exposure-respons relatie van (combinaties van) middelen in het *in vivo* dijspier- en/of longinfectiemodel kan het beste doseringsschema van (combinaties van) middelen voor latere klinische studies in patiënten met multiresistente en moeilijk behandelbare infecties bepaald worden. Zo hopen wij de behandeling van infecties door multiresistente en moeilijk behandelbare bacteriën te kunnen verbeteren en te optimaliseren.

Wetenschappelijke relevantie

Er zijn wel methoden ontwikkeld om de PK/PD relaties van antimicrobiële middelen te bestuderen, maar methoden om het *in vivo* effect van non-antibiotica en combinaties te bepalen zijn niet beschikbaar. In dit project worden deze methoden ontwikkeld en verder geoptimaliseerd. Door studies uit te voeren in zowel het dijspier- als het longmodel kunnen we bovendien de doseringsschema's bij verschillende soorten infecties onderzoeken. Door het ontwikkelen van computermodellen op basis van de resultaten van de experimenten wordt getracht het effect van de (combinaties van) middelen steeds beter te kunnen voorspellen.

3.3.2 Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden wat hun belang is.

De belanghebbenden bij de uitvoering van dit project:

- De proefdieren die gebruikt moeten worden om de projectdoelen te behalen. Zij hebben er belang bij de infecties en behandelingen niet te ondergaan, zodat hun welzijn niet wordt aangetast.
- Onze afdeling en onze onderzoeksgroep. Zij zijn geïnteresseerd in onderzoek naar de effectiviteit van bestaande en nieuwe middelen voor de behandeling van multiresistente en moeilijk behandelbare bacteriële infecties, en voeren de studies uit en publiceren hierover in internationale wetenschappelijke tijdschriften.
- Patiënten met multiresistente en moeilijk behandelbare infecties. Wanneer doseringsschema's van bestaande en nieuwe middelen zijn geoptimaliseerd, kunnen zij beter (effectiever) behandeld worden.
- Samenwerkende partners (industrie, academische partners). Het kan zijn dat partners middelen leveren om onderzocht te worden, en zij leveren data over bijvoorbeeld toxiciteit, tolerantie, en/of *in vitro*. Zij zijn geïnteresseerd in de effectiviteit van deze middelen tegen multiresistente en moeilijk behandelbare infecties. Industriële partners hebben ook commerciële belangen en kunnen onze studies financieren. Hiermee zijn zij mede bepalend in de keuze van de te onderzoeken (combinaties van) middelen.

3.4 Strategie

3.4.1 Geef een overzicht van de algemene opzet van het project. Besteed aandacht aan de eventuele fasering in de uitvoering en de samenhang. Vermeld eventuele mijlpalen, keuzemomenten en besliscriteria.

In deze studies wordt een duidelijk gefaseerde en gestandaardiseerde aanpak toegepast om de projectdoelen te behalen.

Als eerste zal ***in vitro* onderzoek** plaatsvinden, waaronder bijvoorbeeld MRC-bepalingen en time-kill curves. Kandidaat (combinaties van) middelen hiervoor worden geselecteerd door de onderzoeksgroep, door consortia binnen welke deze studies plaatsvinden en op basis van vraag door externe partners. Bacteriesoorten worden gekozen op basis van klinische relevantie, bestaande literatuur en verwachte werkingsmechanismen van de middelen. Op basis van de resultaten van deze *in vitro* studies wordt een keuze gemaakt voor (combinaties van) middelen die potentieel effectief kunnen zijn om vervolgens in proefdieren te onderzoeken. In het proefdieronderzoek worden die bacteriesoorten gebruikt waarbij *in vitro* activiteit gevonden wordt.

De *in vitro* karakterisering van een nieuw middel of combinatie zullen we voornamelijk zelf uitvoeren. Daarnaast kunnen data worden aangeleverd door derden, maar deze zullen door onszelf gevalideerd worden. Deze karakterisering kan bijvoorbeeld bepaling van de minimaal remmende concentraties van

de middelen zijn, een checkerboard assay met een zeer uitgebreid panel aan bacteriestammen (verschillende bacteriesoorten en verschillende stammen binnen het species en verschillende resistentiemechanismen), of time-kill experimenten waarin is aangetoond dat een (combinatie van) middelen *in vitro* groeiremmende activiteit vertoont. In de *in vitro* experimenten zullen alleen concentraties worden gebruikt die uiteindelijk haalbaar zijn in de patiënt en niet toxisch (in dier en mens). Als hieruit blijkt dat middelen additief of synergistisch werken, dan kunnen hierna *in vivo* experimenten starten.

Een vereiste voordat gestart wordt met het proefdieronderzoek is dat toxiciteits- en/of tolerantiegegevens van de middelen beschikbaar zijn (gegenereerd door anderen).

Fase 1: Aanpassen van de bestaande modellen

Wanneer gewerkt gaat worden met nog niet eerder door de onderzoeksgroep gebruikte klinisch relevante bacteriestammen, zal het bestaande dijspier- of longmodel voor deze stammen worden aangepast.

GO: Wanneer een bacteriestam leidt tot een reproduceerbare infectie, zal verder gewerkt worden met deze stam.



Fase 2: Screening op vroege bacteriedodende activiteit

Alleen voor geheel nieuwe middelen waarvan nog geen informatie is over de aanwezigheid van *in vivo* activiteit/effectiviteit.

Entrée criteria:

1. De geselecteerde bacteriesoorten en antibioticum (combinatie) zijn relevant voor de verbetering van behandeling van klinisch relevante infecties die moeilijk behandelbaar zijn met de nu geregistreerde antibiotica in de toegepaste doseringsschema's.
2. Uit *in vitro* onderzoek moet blijken dat het middel of het middel gecombineerd met een antibioticum activiteit vertoont tegen de geselecteerde bacterie.
3. Toxiciteits- en/of tolerantiegegevens moeten beschikbaar zijn.
4. De uitkomst van deze studie moet richtinggevend zijn voor (latere) klinische vervolgstudies.

GO: Als een nieuw middel:

1. vroege bacteriedodende of bacteriostatische activiteit vertoont, of
2. in combinatie met een ander middel waarschijnlijk bacteriedodende of bacteriostatische activiteit zal vertonen dan gaat dit middel door naar de volgende fase.



Fase 3: Exposure-respons relatie

De volgorde van deze experimenten is afhankelijk van de beschikbare informatie uit literatuur, eerder verkregen data en/of data beschikbaar van partners.

Entrée criteria:

1. De geselecteerde bacteriesoorten en antibioticum (combinatie) zijn relevant voor de verbetering van behandeling van klinisch relevante infecties die moeilijk behandelbaar zijn met de nu geregistreerde antibiotica in de toegepaste doseringsschema's.
2. Uit *in vitro* onderzoek moet blijken dat het middel of het middel gecombineerd met een antibioticum activiteit vertoont tegen de geselecteerde bacterie.
3. Toxiciteits- en/of tolerantiegegevens moeten beschikbaar zijn.
4. De uitkomst van deze studie moet richtinggevend zijn voor (latere) klinische vervolgstudies.

Studie A: Bepaling van het *in vivo* PK profiel

GO: Verdere studies met dit middel worden alleen uitgevoerd als de PK studie aantoont dat het middel werkzaam zou kunnen zijn, bijvoorbeeld wanneer middelen een veelbelovend concentratiebeloop laten zien, zoals concentraties die lange tijd boven de minimaal remmende concentratie (MRC) blijven of een gunstige verhouding hebben tussen topspiegel en de MRC.

Studie B: Bepaling van de effectiviteit – en daarmee met behulp van het PK profiel expositie – als mono-behandeling

GO: Als een middel:

1. bacteriedodende of bacteriostatische activiteit vertoont, of
2. in combinatie met een ander middel waarschijnlijk bacteriedodende of bacteriostatische activiteit zal vertonen dan wordt verder gewerkt met dit middel.

Studie C: Dosis-fractioneringsstudie

GO: Als een middel:

1. bacteriedodende of bacteriostatische activiteit vertoont, of
2. in combinatie met een ander middel waarschijnlijk bacteriedodende of bacteriostatische activiteit zal vertonen dan wordt verder gewerkt met dit middel.



Fase 4: Validatie van de PK/PD voor de bepaling van de farmacodynamische target en de variatie daarin tussen stammen ter ondersteuning van breekpunt bepaling



Fase 5: Effect van verschillende doseringsverhoudingen van twee middelen

Deze fase wordt alleen uitgevoerd voor combinaties van middelen.

Figuur. Verschillende fases en studies in het project.

In de studies wordt met neutropene muizen gewerkt omdat de meeste pathogenen voor de mens – zoals *Pseudomonas aeruginosa* – niet pathogeen zijn voor de immuuncompetente muis. In een immuuncompetente muis zal niet/nauwelijks een infectie optreden. Daarom zal het gebruik van een immuuncompetente muis een grote overschatting van het effect geven dat het middel bij de mens zou hebben. Daarnaast is ook de primaire vraag: wat is het effect van het middel zonder interferentie van een immuunsysteem?

Bij het **proefdieronderzoek** (zie figuur hierboven) wordt – indien gewerkt gaat worden met nog niet eerder door onze onderzoeksgroep gebruikte klinisch relevante bacteriestammen – het bestaande dijspier- en longmodel aangepast. Voor een aantal species waarmee onze onderzoeksgroep veel ervaring heeft, zoals *Escherichia coli* en *Klebsiella pneumoniae*, is bekend dat een standaard inoculum leidt tot een reproduceerbare infectie. Voor een aantal andere species, zoals *Pseudomonas aeruginosa* en *Acinetobacter baumannii*, is bekend dat het geschikte inoculum voor een reproduceerbare infectie stam-afhankelijk is. Voor dit soort species is een **inoculum-finding studie** (welk inoculum leidt tot een reproduceerbare infectie in het toegepast model?) belangrijk.

Zodra de proefdiermodellen zijn geoptimaliseerd, kan de aanpak gevolgd worden die nodig is in voorbereiding op klinische studies, zoals omschreven in de richtlijnen van de EMA. In de komende 5 jaar verwachten we per proefdiermodel 10 middelen als mono-behandeling en 5 combinaties van middelen te onderzoeken. Sommige middelen of combinaties zullen alleen in het dijspiermodel of alleen in het longmodel worden onderzocht, terwijl andere middelen in beide modellen bestudeerd zullen worden. De keuze hiervoor is afhankelijk van de (beoogde) indicatie voor het middel of de combinatie van middelen. Wanneer de indicatie van het middel de behandeling van pneumonieën betreft, zal het longmodel worden toegepast. Echter, voor sommige middelen of klassen is bekend dat de weefselpenetratie in de long laag is; deze middelen worden uiteraard niet in het longmodel bestudeerd. Wanneer de indicatie anders dan pneumonie is, dan zal het middel in het dijspiermodel worden toegepast. Wanneer de precieze indicatie nog niet bekend is (het middel heeft *in vitro* of *in vivo* activiteit laten zien tegen een moeilijk behandelbare bacterie, maar bijv. de longpenetratie is nog niet bekend), worden beide modellen toegepast. Omdat gebrek aan effectiviteit van een middel bij de ene indicatie effectiviteit van datzelfde middel bij een andere indicatie niet uitsluit, worden in dat geval beide modellen naast elkaar toegepast. Door toepassing van de GO/NO GO-criteria vallen middelen zonder effectiviteit in een van beide modellen af in een vroege fase, zonder daarbij alle fases in dat model te doorlopen.

Voor geheel nieuwe middelen wordt gestart met een **screening op vroege bacteriedodende activiteit**. Zonder bacteriedodende of –remmende activiteit (of wanneer niet verwacht wordt dat het middel in combinatie met een ander middel bacteriedodende of –remmende activiteit zal vertonen) zal een dergelijk middel niet verder *in vivo* worden onderzocht.

Voor alle (combinaties van) middelen wordt de **farmacokinetiek (PK)** en de **farmacodynamiek (PD)**, en de relatie hiertussen (**PK/PD**) bepaald.

Het ***in vivo* PK profiel** (de blootstelling, exposure) wordt voor verschillende doses bepaald na een eenmalige gift van de middelen (of indien strikt noodzakelijk na meerdere toedieningen) in het dijspier- en/of het longinfectiemodel. Het PK profiel wordt in geïnfecteerde dieren bepaald, omdat infectie het concentratiebeloop van middelen kan beïnvloeden. Wanneer het PK profiel in een niet-geïnfecteerd dier zou worden bepaald, kan geen goede exposure-respons relatie worden vastgesteld.

Ook wordt de exposure-response relatie over de tijd bepaald. Op basis van de resultaten van de *in vitro* assays en van het (te verwachten of aangetoonde) PK profiel in de muis worden doseringsschema's gekozen. Hierbij wordt de **effectiviteit van middelen als mono-behandeling** bepaald, en zal een **dosis-fractioneringsstudie** worden uitgevoerd, waarbij verschillende doseringsfrequenties van een middel of combinatie worden vergeleken.

De **farmacodynamische target** en de variatie daarin tussen bacteriestammen wordt vervolgens bepaald ter ondersteuning van de breekpunt bepaling.

In geval van combinaties wordt tot slot een ***in vivo* checkerboard assay** gedaan met verschillende doseringsschema's voor beide middelen, voor verschillende bacteriestammen.

Door de gefaseerde aanpak vallen (combinaties van) middelen zonder potentie om in de patiënt werkzaam te kunnen zijn, af in een vroege fase van het onderzoek, waardoor het aantal benodigde proefdieren beperkt kan worden, en komt waardevolle data over succesvolle (combinaties van) middelen beschikbaar. Niet alle (combinaties van) middelen zullen succesvol zijn.

We verwachten dat van de 10 middelen als mono-behandeling en 5 combinaties van middelen er 3 succesvol zullen zijn in onze dierproeven. Deze potentieel succesvolle (combinaties van) middelen kunnen vervolgens onderzocht worden in klinische studies.

Op basis van deze informatie kan besloten worden of de (combinatie van) middelen waardevol genoeg is om een zeer dure **klinische studie** te starten. Het is zeer belangrijk dat het infectiemodel in het dier (aspecten van) de humane infectie zo veel mogelijk reproduceert, voor de veiligheid van de proefpersonen/patiënten, om proefpersonen/patiënten niet onnodig te belasten met middelen die uiteindelijk niet voldoende nuttig blijken, en vanwege de zeer hoge kosten van klinische studies.

Fase 1: Aanpassen van de bestaande modellen

Indien nodig worden de bestaande modellen van dijspier- en longinfectie aangepast voor klinisch relevante bacteriestammen. Er zal bepaald worden welk inoculum leidt tot een reproduceerbare infectie.

GO: Wanneer een bacteriestam leidt tot een reproduceerbare infectie, zal verder gewerkt worden met deze stam.

In alle gevallen gelden onderstaande **entree criteria** voor fase 2 (nieuwe middelen) respectievelijk fase 3 (bestaande middelen):

- De geselecteerde bacteriespecies en antibioticum(combinatie) zijn relevant voor de verbetering van behandeling van klinisch relevante infecties die moeilijk behandelbaar zijn met de nu geregistreerde antibiotica in de toegepaste doseringsschema's.
- Uit *in vitro* onderzoek moet blijken dat het middel of het middel gecombineerd met een antibioticum activiteit vertoont tegen de geselecteerde bacterie, en
- Toxiciteits- en/of tolerantiegegevens moeten beschikbaar zijn.
- De uitkomst van deze studie moet richtinggevend zijn voor (latere) klinische vervolgstudies.

Fase 2: Screening op vroege bacteriedodende activiteit

Alleen voor geheel nieuwe middelen waarvan bij ons of bij partners nog geen informatie is over de aanwezigheid van *in vivo* activiteit/effectiviteit worden screeningsexperimenten uitgevoerd.

Van sommige middelen wordt niet verwacht dat ze zelf actief zijn tegen een bacteriële infectie, of slechts beperkt, zoals remmers van beta-lactamase enzymen. Het is wel belangrijk te weten of deze middelen vroege bacteriedodende activiteit hebben, om in vervolgstudies te kunnen kijken naar de synergie van zo'n middel met een bestaand middel.

GO: Als een nieuw middel:

1. vroege bacteriedodende of bacteriostatische activiteit vertoont, of
2. in combinatie met een ander middel waarschijnlijk bacteriedodende of bacteriostatische activiteit zal vertonen (bijvoorbeeld in geval van een antibioticum gecombineerd met remmers van beta-lactamase enzymen, waarvan de laatste meestal zelf geen activiteit hebben)

dan gaat dit middel door naar de volgende fase.

Door uitvoering van deze proef met een klein aantal dieren wordt een eerste indruk gekregen of het nieuwe middel *in vivo* werkzaam kan zijn. Als dit niet het geval is, hoeven geen uitgebreide PK en PD studies gedaan te worden. Dit voorkomt onnodig gebruik van proefdieren.

Fase 3: Exposure-respons relatie

In deze fase worden het *in vivo* PK profiel en de effectiviteit van middelen (met een vaste doseringsfrequentie of met verschillende doseringsfrequenties) bepaald en aan elkaar gerelateerd. De volgorde van deze experimenten is afhankelijk van de beschikbare informatie uit literatuur, eerder verkregen data en/of data beschikbaar van partners. Wanneer er bijvoorbeeld al concrete aanwijzingen zijn over het PK profiel van een middel, dan zal eerst naar de effectiviteit van het middel gekeken worden, en later alsnog naar het PK profiel (in hetzelfde proefdiermodel). Wanneer er al duidelijkheid is over de meest geschikte doseringsfrequentie van het middel, dan zal een dosis-fractioneringsstudie (met verschillende doseringsfrequenties van het middel) minder prioriteit hebben, en pas na bepaling van het PK profiel en de effectiviteit (met een vaste doseringsfrequentie van het middel) worden geconfirmeerd. Na elke studie volgt wel een GO/NO GO moment waarop bepaald wordt of het zinvol is om door te gaan met de andere studies in deze fase.

Studie A: Bepaling van het *in vivo* PK profiel

GO: Verdere studies met dit middel worden alleen uitgevoerd als de PK studie aantoont dat het middel werkzaam zou kunnen zijn, bijvoorbeeld wanneer middelen een veelbelovend concentratiebeloop laten

zien, zoals concentraties die lange tijd boven de minimaal remmende concentratie (MRC) blijven of een gunstige verhouding hebben tussen topspiegel en de MRC.

Op basis van de resultaten van de *in vitro* assays en van het (te verwachten of aangetoonde) PK profiel in het dier worden doseringsschema's gekozen voor studies naar de effectiviteit van middelen.

Studie B: Bepaling van de effectiviteit van middelen – en daarmee met behulp van het PK profiel expositie – als mono-behandeling

Deze studies worden uitgevoerd voor zowel antibiotica als non-antibiotica. Ook voor deze laatste groep zijn deze studies zinvol, zeker wanneer het gaat om middelen die niet geregistreerd zijn als antimicrobieel maar mogelijk wel een antibiotisch effect bezitten. Ook voor middelen die bijvoorbeeld resistentiemechanismen remmen zijn deze studies zinvol, want als zij op zichzelf toch enige bacteriedodende of bacteriostatische activiteit vertonen, moet hier rekening mee worden gehouden in combinatie-behandeling. Wanneer een non-antibioticum zelf een antimicrobieel effect heeft en dit wordt niet afzonderlijk getest, dan wordt het effect hiervan onterecht toebedeeld aan het combinatiemiddel. Om de goede verhouding tussen de twee middelen te kunnen bepalen is van belang te weten welk deel van de effectiviteit aan welk van de middelen toe te schrijven is. Wanneer een antibioticum wordt gecombineerd met een middel zonder op zichzelf staande antibacteriële activiteit, dan worden bijvoorbeeld vaste doseringsverhoudingen van de twee middelen gebruikt, of een vaste dosis van het antibioticum. Wanneer beide middelen antibacterieel werken, dan wordt de matrix complexer, doordat doseringen van beide middelen kunnen variëren. Met non-antibiotica waarvan bekend is dat ze geen antimicrobiële werking hebben, zullen geen mono-behandelingen worden gedaan.

GO: Als een middel:

1. bacteriedodende of bacteriostatische activiteit vertoont, of
2. in combinatie met een ander middel waarschijnlijk bacteriedodende of bacteriostatische activiteit zal vertonen (bijvoorbeeld in geval van een antibioticum gecombineerd met remmers van beta-lactamase enzymen, waarvan de laatste meestal zelf geen activiteit hebben)

dan wordt verder gewerkt met dit middel.

Studie C: Dosis-fractioneringsstudie

GO: Als een middel:

1. bacteriedodende of bacteriostatische activiteit vertoont, of
2. in combinatie met een ander middel waarschijnlijk bacteriedodende of bacteriostatische activiteit zal vertonen (bijvoorbeeld in geval van een antibioticum gecombineerd met remmers van beta-lactamase enzymen, waarvan de laatste meestal zelf geen activiteit hebben)

dan wordt verder gewerkt met dit middel.

Fase 4: Validatie van de PK/PD voor de bepaling van de farmacodynamische target en de variatie daarin tussen stammen ter ondersteuning van breekpunt bepaling

In deze fase worden de gegevens verkregen in eerdere fases gevalideerd met behulp van een meer uitgebreid panel aan bacteriestammen. Ook wordt gekeken naar de variatie tussen stammen. Het klinisch breekpunt is de grenswaarde van de MRC (Minimaal Remmende Concentratie) die medisch microbiologische laboratoria gebruiken om aan te geven of een bacterie gevoelig of resistent is voor een middel. De behandelende arts gebruikt dit om te beoordelen of een middel juist wel of juist niet aan een patiënt kan of moet worden voorgeschreven. Het is belangrijk dat de PD target van een middel daarom bepaald wordt op basis van studies met een voldoende uitgebreid panel aan relevante bacteriestammen voor dit middel, die het gehele klinische spectrum – van gevoelig naar ongevoelig/resistent, met of zonder resistentiemechanismen – vertegenwoordigen.

Fase 5: Effect van verschillende doseringsverhoudingen van twee middelen

Deze fase wordt alleen uitgevoerd voor combinaties van middelen.

3.4.2 Onderbouw de gekozen strategie.

Voordat gestart wordt met het bestuderen van de exposure-respons relatie van (combinaties van) middelen zal – indien gewerkt gaat worden met bacteriestammen waarmee onze onderzoeksgroep nog geen ervaring heeft – het dijspier- en/of het longmodel worden aangepast voor deze stammen. Er wordt een inoculum "getitreerd" dat leidt tot een reproduceerbare infectie. (Fase 1; Doel A.) Dit voorkomt dat muizen met een bacteriestam waarmee nog geen ervaring is, worden geïnfecteerd met een inoculum dat

te hoog of te laag is, en dus te veel of geen ziekte veroorzaakt (verfijning). Ook voorkomt het zo veel mogelijk dat geen conclusies uit experimenten getrokken kunnen worden omdat het inoculum en daarmee de infectiegraad niet juist is geweest (vermindering).

Vervolgens zullen deze (combinaties van) middelen volgens de gestandaardiseerde aanpak van het PK/PD onderzoek worden bestudeerd (Fase 2-5, Doel B). Deze aanpak staat omschreven in de aanbevelingen van het EMA en borgt dat deze studieresultaten in latere fases worden geaccepteerd door EMA voor het klinisch dossier.

Voor geheel nieuwe middelen waarover nog geen informatie bekend is *in vivo* en die in *in vitro* assays een antimicrobiële werking laten zien, wordt allereerst een screeningsexperiment uitgevoerd (fase 2). Van nieuwe antibiotica is meestal nog helemaal geen of uiterst beperkte *in vivo* data bekend met betrekking tot de werkzaamheid, maar vaak wel het toxiciteits- en/of tolerantieprofiel. Daarom wordt voor geheel nieuwe middelen (mits een toxiciteits- of tolerantieprofiel beschikbaar) eerst bestudeerd of het nieuwe middel voldoende *in vivo* activiteit heeft in deze fase en het dus verantwoord is om de verdere proeven met grotere aantallen doseringen en dieren uit te gaan voeren. Dit voorkomt dat uitgebreide studies naar PK en PD gedaan worden met middelen die later zullen afvallen. Voor middelen waarover al wel informatie bekend is, zal deze fase worden overgeslagen.

Alle middelen doorlopen de vervolgfases (3 en 4 voor mono-behandeling, 3-5 voor combinaties van middelen), zo lang als ze voldoen aan de GO/NO GO criteria.

In fase 3 worden 3 verschillende studies uitgevoerd. De volgorde van deze studies is afhankelijk van de beschikbare informatie uit literatuur, eerder verkregen data en/of data beschikbaar van partners.

Wanneer er bijvoorbeeld al concrete aanwijzingen zijn over het PK profiel van een middel, dan zal eerst naar de effectiviteit van het middel gekeken worden, en later alsnog naar het PK profiel (in hetzelfde proefdiermodel). Wanneer er al duidelijkheid is over de meest geschikte doseringsfrequentie van het middel, dan zal een dosis-fractioneringsstudie (met verschillende doseringsfrequenties van het middel) minder prioriteit hebben, en pas na bepaling van het PK profiel en de effectiviteit (met een vaste doseringsfrequentie van het middel) worden geconfirmeerd.

Ook als er bijvoorbeeld al data beschikbaar is over de doseringsfrequentie van een middel zal deze in onze modellen worden geconfirmeerd, maar is het niet nodig dit voor even veel bacteriestammen te doen als voor een middel waarvan nog geen aanwijzingen zijn over de doseringsfrequentie.

Wanneer op basis van de studies in fase 3 de PK/PD index is bepaald, is het belangrijk te valideren of dit ook geldt voor een uitgebreider bacterie-stammenpanel met verschillende gevoeligheden en verschillende resistentiemechanismen, die in de kliniek voorkomen (fase 4). Bovendien kan de PD target (de grootte van de PK/PD index) pas worden bepaald op een uitgebreider panel aan bacteriestammen. Voor combinaties van middelen zal tot slot een *in vivo* checkerboard studie worden uitgevoerd, waarbij de doseringsverhoudingen van de twee middelen verschillen. In de voorgaande fases wordt, in geval van combinaties van middelen, een vaste doseringsverhouding gebruikt. Echter, de effectiviteit van een combinatie van middelen kan vergroot worden wanneer de verhouding van de doseringen anders is. Dit wordt tot slot in fase 5 bestudeerd.

Wanneer deze fasen doorlopen zijn, kunnen de PK/PD index en target bepaald worden, die dienen als input voor klinische studies.

Om wetenschappelijke conclusies te kunnen verbinden aan het onderzoek naar nieuwe therapieën voor de behandeling van multiresistente en moeilijk behandelbare bacteriën is het noodzakelijk dat per studie een groep dieren (bijv. placebo-behandeling, behandeling met een lage dosering van een middel) een hoge bacteriële load in de dijspier of de longen krijgt, om een effectieve (bacteriedodende) dosering, dus met een lage bacteriële load, van een middel tegen af te kunnen zetten. Alleen op deze manier kan de dosering en de PK/PD index en target die nodig is voor bacteriostasis (geen bacteriegroei) en voor afdoding van de bacteriën bepaald worden. Deze groep dieren met een hoge bacteriële load kan (afhankelijk van de gebruikte bacteriestam, want niet alle bacteriestammen leiden tot een ernstige klinische infectie bij een hoge bacteriële load) leiden tot ernstig ongerief.

De duur van dit ernstig ongerief wordt zo veel als mogelijk bekort door het in acht nemen van de humane eindpunten, zoals beschreven in beide bijlagen (vraag E, humane eindpunten). Kortdurend ernstig ongerief is noodzakelijk om wetenschappelijke conclusies te kunnen trekken uit dit onderzoek.

3.4.3 Benoem de type dierproeven. Vul per type dierproef een bijlage Beschrijving dierproeven in.

Volgnummer	Titel bijlage Beschrijving dierproef
1	Dijspiermodel
2	Longmodel
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Bijlage

Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u in de 'Toelichting op de te gebruiken formulieren voor de aanvraag van een projectvergunning' op de website www.centralecommissiedierproeven.nl
- Of neem telefonisch contact op (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in. 5.1 lid2h
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in. 5.1 lid2h
- 1.3 Vul het volgnummer en de titel van de dierproef in.
- | Volgnummer | Titel dierproef |
|------------|-----------------|
| 1 | Dijspiermodel |

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.3 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

Middelen en combinaties van middelen zullen volgens de gestandaardiseerde aanpak van het PK/PD onderzoek worden bestudeerd, in het dijspier- en/of het longmodel. In deze modellen wordt gebruik gemaakt van neutropene muizen, zoals ook in de richtlijnen van het EMA beschreven. Deze bijlage beschrijft het dijspiermodel.

In de studies wordt met neutropene muizen gewerkt omdat de meeste pathogenen voor de mens – zoals *Pseudomonas aeruginosa* – niet pathogeen zijn voor de immuuncompetente muis. Het gebruik van een immuuncompetente muis geeft daarom een grote overschatting van het effect dat het middel bij de mens zou hebben. Daarnaast is ook de primaire vraag: wat is het effect van het middel zonder interferentie van een immuunsysteem?

Wanneer gewerkt gaat worden met nog niet eerder door de onderzoeksgroep gebruikte klinisch relevante bacteriestammen, zal het bestaande en in de literatuur uitgebreid beschreven dijspiermodel voor deze stammen worden aangepast. De onderzoeksgroep heeft veel ervaring met een ruim aantal species, waaronder *Escherichia coli* en *Klebsiella pneumoniae*. Voor deze species is bekend dat een standaard inoculum leidt tot een reproduceerbare infectie. Voor een aantal andere species, zoals *Pseudomonas aeruginosa* en *Acinetobacter baumannii*, is bekend dat het geschikte inoculum voor een reproduceerbare infectie stam-afhankelijk is.

Fase 1. Aanpassen van de bestaande modellen

Indien nodig wordt het bestaande dijspiermodel aangepast voor klinisch relevante bacteriestammen. Er zal bepaald worden welk inoculum leidt tot een reproduceerbare infectie.

Primaire uitkomstparameter: het ontstaan van een reproduceerbare infectie, waarbij de inter-individuele variatie beperkt is, waarbij de bacteriële load voldoende hoog is, maar die niet leidt tot ernstige sepsis.

GO: Wanneer een bacteriestam leidt tot een reproduceerbare infectie, zal verder gewerkt worden met deze stam.

Na deze aanpassing zal gestart worden met het daadwerkelijke PK/PD onderzoek.

Voor geheel nieuwe middelen zal gestart worden met fase 2. Voor alle andere middelen zal gestart worden met fase 3.

In alle gevallen gelden onderstaande entrée criteria voor fase 2 (nieuwe middelen) respectievelijk fase 3 (bestaande middelen):

- De geselecteerde bacteriespecies en antibioticum(combinatie) zijn relevant voor de verbetering van behandeling van klinisch relevante infecties die moeilijk behandelbaar zijn met de nu geregistreerde antibiotica in de toegepaste doseringsschema's.
- Uit *in vitro* onderzoek moet blijken dat het middel of het middel gecombineerd met een antibioticum activiteit vertoont tegen de geselecteerde bacterie, en
- Toxiciteits- en/of tolerantiegegevens moeten beschikbaar zijn.
- De uitkomst van deze studie moet richtinggevend zijn voor (latere) klinische vervolgstudies.

Fase 2. Screening op vroege bacteriedodende activiteit

Alleen voor geheel nieuwe middelen waarvan nog geen informatie is over de aanwezigheid van *in vivo* activiteit/effectiviteit worden screeningsexperimenten uitgevoerd naar de vroege bacteriedodende activiteit. Neutropene, geïnficeerde muizen worden behandeld met het middel, per os of parenteraal, de route die het meest passend is op basis van verwachtingen aan de hand van bijvoorbeeld de structuur of antibioticum-klasse (meestal SC, IM, IV, IP of soms per maagsonde). Daarbij wordt het maximaal toe te dienen volume voor die route in acht genomen (Principles of Laboratory Animal Science revised edition, Van Zutphen 2001, tabel 16-1).

Primaire uitkomstparameter: bacteriële load in de dijspier in behandelde vs onbehandelde muizen.

GO: Als een nieuw middel:

1. vroege bacteriedodende of bacteriostatische activiteit vertoont, of
2. in combinatie met een ander middel waarschijnlijk bacteriedodende of bacteriostatische activiteit zal vertonen (bijvoorbeeld in geval van een antibioticum gecombineerd met remmers van beta-lactamase enzymen, waarvan de laatste meestal zelf geen activiteit hebben)

dan gaat dit middel door naar de volgende fase.

Door uitvoering van deze proef met een klein aantal dieren wordt een eerste indruk gekregen of het nieuwe middel *in vivo* werkzaam kan zijn. Als dit niet het geval is, hoeven geen uitgebreide PK en PD studies gedaan te worden. Dit voorkomt onnodig gebruik van proefdieren.

Fase 3: Exposure-respons relatie

In deze fase worden het *in vivo* PK profiel en de effectiviteit van middelen (met een vaste doseringsfrequentie of met verschillende doseringsfrequenties) bepaald en aan elkaar gerelateerd. De volgorde van deze experimenten is afhankelijk van de beschikbare informatie uit literatuur, eerder verkregen data en/of data beschikbaar van partners. Wanneer er bijvoorbeeld al concrete aanwijzingen zijn over het PK profiel van een middel, dan zal eerst naar de effectiviteit van het middel gekeken worden, en later alsnog naar het PK profiel (in hetzelfde proefdiermodel). Wanneer er al duidelijkheid is over de meest geschikte doseringsfrequentie van het middel, dan zal een dosis-fractioneringsstudie (met verschillende doseringsfrequenties van het middel) minder prioriteit hebben, en pas na bepaling van het PK profiel en de effectiviteit (met een vaste doseringsfrequentie van het middel) worden geconfirmeerd.

Na elke studie binnen deze fase volgt een GO/NO GO moment waarop bepaald wordt of het zinvol is om door te gaan met de andere studies in deze fase, of naar de volgende fase. De GO/NO GO-criteria zijn onderstaand per studie vermeld.

Studie A: Bepaling van het *in vivo* PK profiel

Voor alle (combinaties van) middelen wordt het PK profiel (concentraties van het middel in de tijd bij verschillende doses) bepaald. Neutropene, geïnficeerde muizen worden éénmalig (of, in specifieke situaties, meerdere malen, maximaal 3 keer) behandeld, waarna op verschillende tijdstippen de muizen worden gedood om het concentratieverloop van het middel te bepalen.

Primaire uitkomstparameter: concentratie van het middel in de loop van de tijd.

GO: Verdere studies met dit middel worden alleen uitgevoerd als de PK studie aantoont dat het middel werkzaam zou kunnen zijn, bijvoorbeeld wanneer middelen een veelbelovend concentratiebeloop laten zien, zoals concentraties die lange tijd boven de minimaal remmende concentratie (MRC) blijven of een gunstige verhouding hebben tussen topspiegel en de MRC.

Op basis van de resultaten van de *in vitro* assays en van het (te verwachten of aangetoonde) PK profiel in het dier worden doseringsschema's gekozen voor studies naar de effectiviteit van middelen.

Studie B: Bepaling van de effectiviteit van middelen – en daarmee met behulp van het PK profiel expositie – als mono-behandeling

De exposure-respons relatie van de (combinatie van) middelen wordt bepaald. Hiervoor wordt de effectiviteit van de middelen als mono-behandeling bepaald. Neutropene, geïnfecteerde muizen worden behandeld met verschillende doseringsschema's met een vaste doseringsfrequentie.

Primaire uitkomstparameter: bacteriële load in de dijspier in behandelde vs onbehandelde muizen, en daarmee de bacteriostatische dosis (dosis waarbij geen uitgroei van de bacterie plaatsvindt) van het middel als mono-behandeling.

GO: Als een middel:

1. bacteriedodende of bacteriostatische activiteit vertoont, of
2. in combinatie met een ander middel waarschijnlijk bacteriedodende of bacteriostatische activiteit zal vertonen (bijvoorbeeld in geval van een antibioticum gecombineerd met remmers van beta-lactamase enzymen, waarvan de laatste meestal zelf geen activiteit hebben)

dan wordt verder gewerkt met dit middel.

Studie C: Dosis-fractioneringsstudie

De exposure-respons relatie van de (combinatie van) middelen wordt verder onderzocht. Hiervoor wordt een dosis-fractioneringsstudie uitgevoerd. Neutropene, geïnfecteerde muizen worden behandeld met verschillende doseringsschema's met verschillende doseringsfrequenties van een middel of combinatie van middelen.

Primaire uitkomstparameter: bacteriële load in de dijspier in behandelde vs onbehandelde muizen, en daarmee bepaling van de PK/PD index die de exposure-respons relatie het beste beschrijft.

GO: Als een middel:

1. bacteriedodende of bacteriostatische activiteit vertoont, of
2. in combinatie met een ander middel waarschijnlijk bacteriedodende of bacteriostatische activiteit zal vertonen (bijvoorbeeld in geval van een antibioticum gecombineerd met remmers van beta-lactamase enzymen, waarvan de laatste meestal zelf geen activiteit hebben)

dan wordt verder gewerkt met dit middel.

Fase 4: Validatie van de PK/PD voor de bepaling van de farmacodynamische target en de variatie daarin tussen stammen ter ondersteuning van breekpunt bepaling

Na deze fase 3-studies wordt de waarde van de PK/PD index gevalideerd voor een aantal andere bacteriestammen. Ook wordt in deze fase gekeken naar de variatie tussen stammen.

Het klinisch breekpunt is de grenswaarde van de MRC (Minimaal Remmende Concentratie) die medisch microbiologische laboratoria gebruiken om aan te geven of een bacterie gevoelig of resistent is voor een middel. De behandelende arts gebruikt dit om te beoordelen of een middel juist wel of juist niet aan een patiënt kan of moet worden voorgeschreven. Het is belangrijk dat de PD target van een middel daarom bepaald wordt op basis van studies met een voldoende uitgebreid panel aan relevante bacteriestammen voor dit middel, die het gehele klinische spectrum – van gevoelig naar ongevoelig/resistent, met of zonder resistentiemechanismen – vertegenwoordigen.

Primaire uitkomstparameter: bacteriële load in de dijspier in behandelde vs onbehandelde muizen, en daarmee validatie van de PK/PD index en bepaling van de PD target.

Fase 5: Effect van verschillende doseringsverhoudingen van twee middelen

Deze fase wordt alleen uitgevoerd voor combinaties van middelen. Er wordt een *in vivo* checkerboard experiment uitgevoerd. Neutropene, geïnfecteerde muizen worden behandeld met verschillende doseringsverhoudingen van twee middelen.

Primaire uitkomstparameter: bacteriële load in de dijspier in behandelde vs onbehandelde muizen, en daarmee het effect van verschillende doseringsverhoudingen van twee middelen.

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

Ongerief wordt zo veel mogelijk geminimaliseerd door gebruik van adequate analgetica. Alle dieren in alle experimenten zullen deze analgesie ontvangen. Euthanasie zal plaatsvinden onder adequate anesthesie. Ongerief wordt gedurende het experiment geregistreerd op een score sheet, waarbij de humane eindpunt criteria worden meegenomen. Hiervoor worden de muizen gewogen (dag -4, dag -1, na infectie wanneer daar aanleiding toe is) en temperatuur (infrarood thermometer) wordt gemeten (na infectie wanneer daar aanleiding toe is).

Gedurende alle studies worden de muizen nauwkeurig gemonitord, ten minste elke 8 uur. Wanneer het klinisch beeld daartoe aanleiding geeft zal deze frequentie worden verhoogd. Studies worden alleen uitgevoerd op werkdagen, zodat overdag monitoren eenvoudig is. Het moment van infectie wordt zodanig

gekozen dat de 'kritische periode' waarin muizen een klinisch beeld kunnen gaan vertonen zo veel mogelijk overdag (vroeg ochtend tot vroeg avond, waarbij onderzoekers aanwezig zijn) valt.

Muizen worden neutropeen gemaakt door voorbehandeling met cyclofosfamide (IP op dag -4 en dag -1 voor infectie).

Op dag 0 worden de muizen geïnfecteerd in beide dijspieren. In een aantal gevallen kunnen 2 verschillende bacteriestammen per muis gebruikt worden, 1 stam per dijspier. Dit gaat op voor stammen waarvan bekend is dat beide infecties geen invloed hebben op elkaars beloop. Alleen in die gevallen kan het benodigd aantal muizen gehalveerd worden, omdat per muis 2 bacteriestammen worden gebruikt.

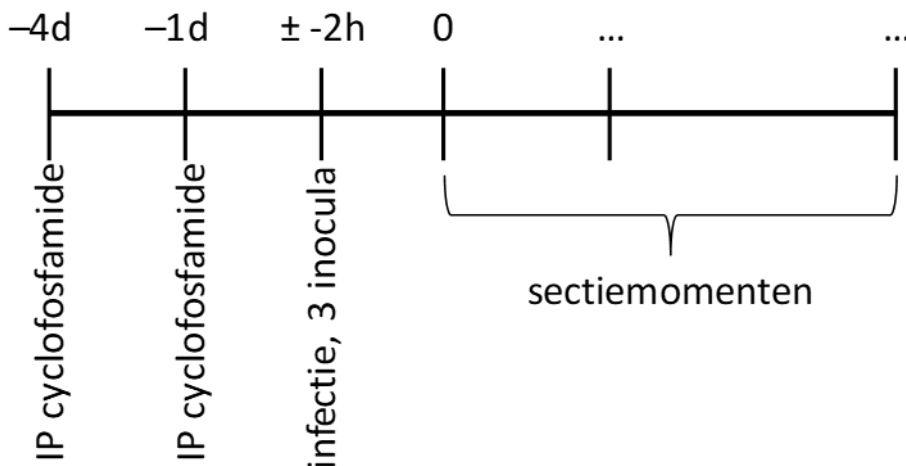
In geval het niet mogelijk is 2 verschillende bacteriestammen per muis te gebruiken, worden ook beide dijspieren geïnfecteerd, met dezelfde bacteriestam. Dit levert dan een duplo binnen een dier op, maar omdat de blootstelling aan het middel hetzelfde is in beide dijspieren (er wordt immers één muis behandeld), is dit geen onafhankelijke duplo. Dit levert daarmee geen vermindering van het aantal benodigde proefdieren op. Er wordt niet voor gekozen om in dit geval slechts 1 dijspier te infecteren. Een duplo binnen het dier levert – ondanks dat het geen onafhankelijke duplo is – meer informatie op uit 1 dier: het gemiddelde van de bacteriële load in de twee dijspieren kan gebruikt worden (in plaats van de load in een dijspier), wat de betrouwbaarheid van de data verhoogd.

Deze extra informatie weegt ons inziens op tegen het beperkte extra ongerief dat een muis ondervindt ten gevolge van infectie in beide dijspieren ten opzichte van infectie in een dijspier. Bij infectie met sommige bacteriestammen is sprake van ontsteking van de achterpoot of -poten, waardoor de muizen deze niet meer goed gebruiken. Ze lopen wel, maar gebruiken daarvoor de voorpoten. Dieren worden dan direct geëuthanaseerd (vraag E) waardoor dit niet leidt tot meer ongerief dan wanneer één dijspier geïnfecteerd zou zijn en minder bruikbaar zou zijn. Bij infectie met andere stammen is de klinische infectie beperkt en lopen en klimmen en bewegen de muizen – ook met twee geïnfecteerde dijspieren – normaal. Hiermee is het ongerief door infectie van een of twee dijspieren beperkt en vergelijkbaar. Door het in acht nemen van de humane eindpunten is ons inziens het ongerief na infectie van beide dijspieren versus infectie van één dijspier slechts kortdurend hoger bij gebruik van stammen die resulteren in ontstoken achterpoten, en gelijk bij gebruik van stammen die beperkte klinische infectie geven.

Fase 1: Aanpassen van de bestaande modellen

Op dag 0 worden de neutropene muizen geïnfecteerd in beide dijspieren met een van de drie bacteriële inocula. Op het moment dat normaliter behandeling wordt gestart (2 uur na infectie), op het moment dat normaliter behandeling wordt beëindigd (meestal 24 uur na start behandeling), en op een tussenliggend tijdstip (afhankelijk van de bacteriestam) worden groepen dieren gedood voor bepaling van de bacteriële load in de dijspier. Het inoculum dat leidt tot een reproduceerbare infectie wordt gekozen voor vervolgonderzoek.

Deze experimenten duren in het algemeen maximaal 26 uur (Figuur 1). In een beperkt aantal experimenten zal zo nodig ook na 48 en/of 72 uur een verificatie plaatsvinden. Dit kan bijvoorbeeld het geval zijn wanneer de bacteriestam minder snel dan verwacht blijkt te groeien.



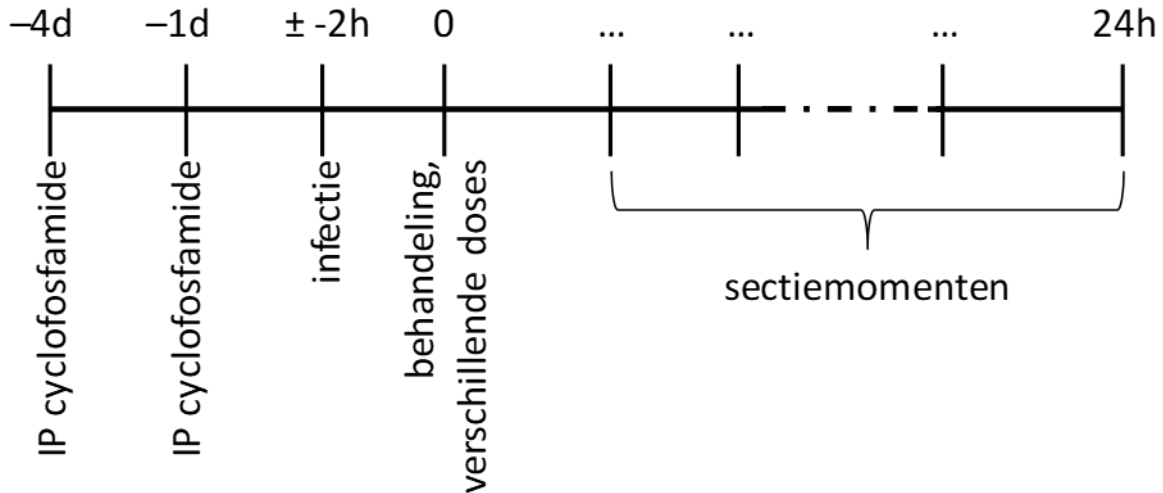
Figuur 1. Algemene opzet van 'Fase 1: Aanpassen van de bestaande modellen'.

Fase 2: Screening op vroege bacteriedodende activiteit

Neutropene, geïnfecteerde dieren worden éénmalig behandeld, dosisgroepen van enkele dieren met verschillende doses van het middel (maximaal 8). Behandeling met het middel is per os of parenteraal, de

route die het meest passend is (meestal SC, IM, IV, IP of soms per maagsonde). Daarbij wordt het maximaal toe te dienen volume voor die route in acht genomen (Principles of Laboratory Animal Science revised edition, Van Zutphen 2001, tabel 16-1). Enkele uren na deze toediening wordt op verschillende tijdstippen (maximaal 8) sectie verricht op de dieren om de vroege bacteriedodende activiteit te bepalen (Figuur 2).

Deze studies duren maximaal 26 uur (na start behandeling).



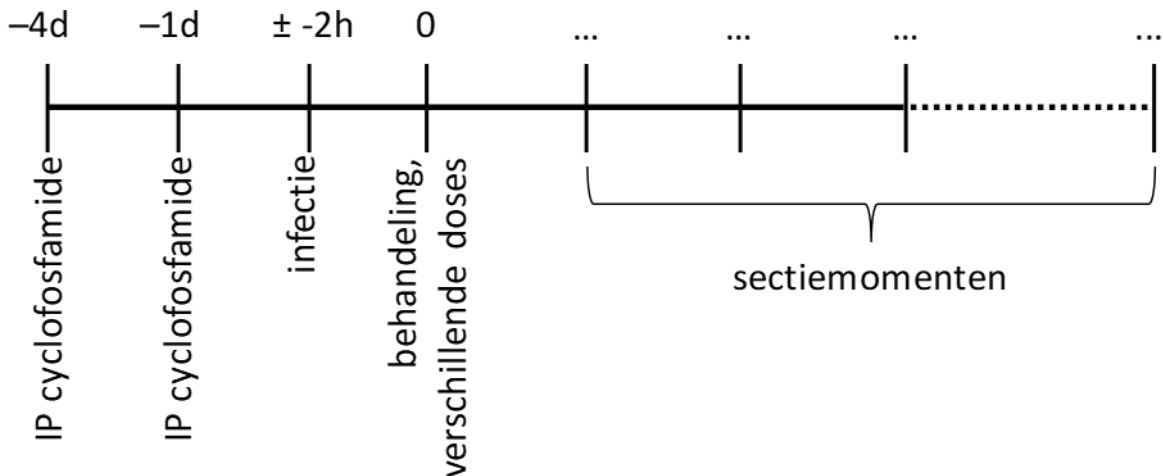
Figuur 2. Algemene opzet van 'Fase 2: Screening op vroege bacteriedodende activiteit'.

Fase 3: Exposure-respons relatie

Studie A: Bepaling van het *in vivo* PK profiel

Neutropene, geïnfecteerde dieren worden éénmalig (of, in specifieke situaties zoals zeer korte halfwaardetijd, meerdere malen, maximaal 3 keer) behandeld, verschillende dosisgroepen met verschillende doses van het middel (hoogste dosis niet hoger dan de drempelwaarde voor toxiciteit, maximaal 8 dosisgroepen). Op verschillende tijdstippen (maximaal 12) na de behandeling worden dieren gedood voor sectie om het concentratieverloop van het middel (PK profiel) in bloed en epithelial lining fluid (ELF) te bepalen (Figuur 3). Wanneer voor concentratie-bepaling van een middel kan worden volstaan met een kleine hoeveelheid plasma, dan wordt ook tijdens het experiment bloed afgenomen bij de muizen, waarbij het aantal sectie-momenten gereduceerd kan worden.

Deze studies duren over het algemeen niet langer dan 48 uur, maar in uitzonderlijke gevallen, bijvoorbeeld als de halfwaardetijd van het middel uitzonderlijk lang is, maximaal 7 dagen (na start behandeling).

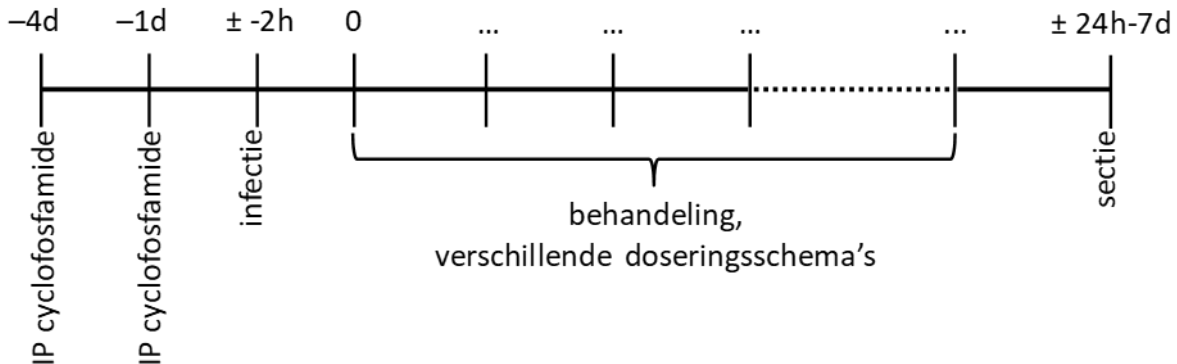


Figuur 3. Algemene opzet van 'Fase 3: Exposure-respons relatie. Studie A: Bepaling van het *in vivo* PK profiel'.

Studie B: Bepaling van de effectiviteit van middelen – en daarmee met behulp van het PK profiel expositie – als mono-behandeling

Neutropene, geïnfecteerde dieren (infectie door maximaal 8 bacteriestammen met verschillende gevoeligheden ofwel MRC's) worden behandeld met het middel als mono-behandeling gedurende 24 uur of maximaal 7 dagen. Er worden verschillende doses (maximaal 6) van het middel onderzocht (Figuur 4).

Deze studies duren meestal 24 uur en maximaal 7 dagen (na start behandeling). Het doseringsschema voor herhaalde toedieningen is mede afhankelijk van de verwachte halfwaardetijd van het middel en bedraagt maximaal 18 toedieningen per maximaal 7 dagen.

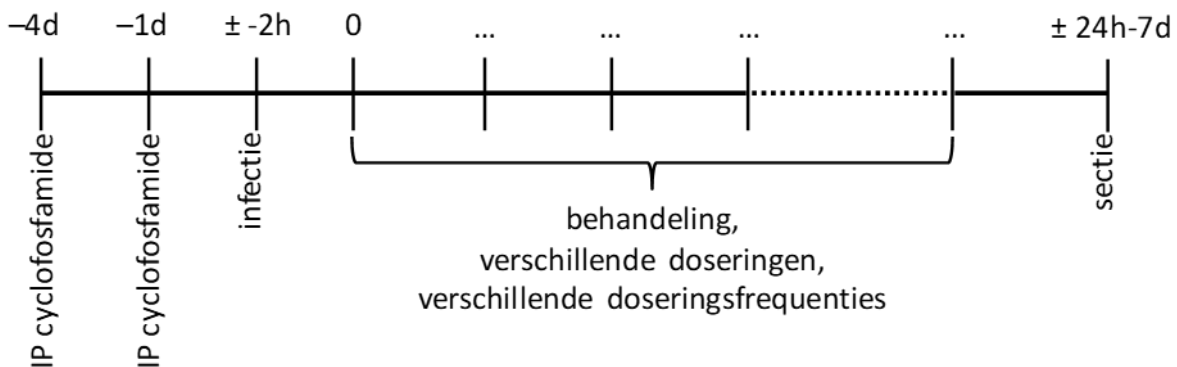


Figuur 4. Algemene opzet van 'Fase 3: Exposure-respons relatie. Studie B: Bepaling van de effectiviteit van middelen – en daarmee met behulp van het PK profiel expositie – als mono-behandeling'.

Studie C: Dosis-fractioneringsstudie

Neutropene, geïnfecteerde dieren (infectie door maximaal 4 verschillende bacteriestammen met verschillende gevoeligheden) worden behandeld met een (combinatie van) middelen waarbij de doseringsfrequentie varieert, maximaal 18 of 20 verschillende doseringsschema's, voor mono- respectievelijk combinatie-behandeling (Figuur 5).

Deze studies duren meestal 24 uur en maximaal 7 dagen (na start behandeling). Het doseringsschema voor herhaalde toedieningen is mede afhankelijk van de verwachte halfwaardetijd van het middel en bedraagt maximaal 18 toedieningen per maximaal 7 dagen.



Figuur 5. Algemene opzet van 'Fase 3: Exposure-respons relatie. Studie C: Dosis-fractioneringsstudie' en van 'Fase 4: Validatie van de PK/PD voor de bepaling van de farmacodynamische target en de variatie daarin tussen stammen ter ondersteuning van breekpunt bepaling'.

Fase 4: Validatie van de PK/PD voor de bepaling van de farmacodynamische target en de variatie daarin tussen stammen ter ondersteuning van breekpunt bepaling

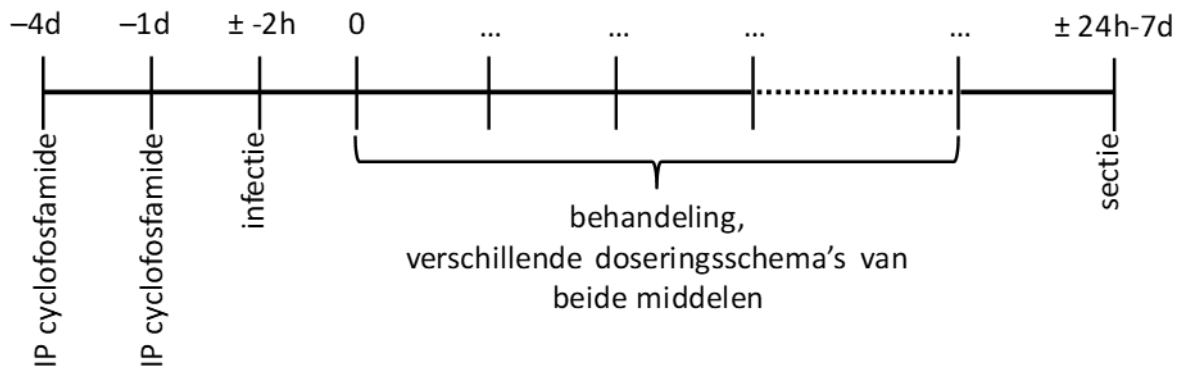
Deze proef is in opzet hetzelfde als studie C (fase 3), maar wordt gedaan met andere bacteriestammen (maximaal 6), om zo te verifiëren of de waarde van de PK/PD index gevonden in fase 2 ook geldig is bij andere bacteriestammen met andere gevoeligheden en andere resistentiemechanismen (Figuur 5). Er worden maximaal 12 verschillende doseringsschema's bestudeerd.

Deze studies duren meestal 24 uur en maximaal 7 dagen (na start behandeling). Het doseringsschema voor herhaalde toedieningen is mede afhankelijk van de verwachte halfwaardetijd van het middel en bedraagt maximaal 18 toedieningen per maximaal 7 dagen.

Fase 5: Effect van verschillende doseringsverhoudingen van twee middelen

In deze proef wordt een *in vivo* checkerboard assay gedaan, met verschillende doseringsschema's (maximaal 6) voor beide middelen (in totaal dus maximaal 6x6 doseringsschema's), voor verschillende bacteriestammen (maximaal 2). Verschil met de eerdere dosisfractioeringsstudies is dat in deze fase de doseringsschema's van beide middelen variëren, met juist hoge of lage concentraties van een van de middelen. Resultaten worden vergeleken met die van de *in vitro* checkerboard assays (Figuur 6).

Deze studies duren meestal 24 uur en maximaal 7 dagen (na start behandeling). Het doseringsschema voor herhaalde toedieningen is mede afhankelijk van de verwachte halfwaardetijd van de middelen en bedraagt maximaal 18 toedieningen per maximaal 7 dagen.



Figuur 6. Algemene opzet van 'Fase 5: Effect van verschillende doseringsverhoudingen van twee middelen'.

Geef aan welke overwegingen en statistische methoden worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken.

Voor het modelleren van het PK profiel zijn plasma- en ELF-concentraties nodig in de tijd. Uit jarenlange eigen ervaring en gepubliceerde literatuur is gebleken dat het PK profiel gemodelleerd kan worden op basis van minimaal 2-3 dieren per tijdstip. (Het precieze aantal dieren hangt af van de te verwachten inter-individuele variatie in de concentraties van de middelen.) Het aantal tijdstippen per dosis en de exacte tijdstippen wordt gebaseerd op het aantal vrijheidsgraden van de modelcurve en de te verwachten kinetiek van het middel en mogelijke te verwachten interacties. Dit zal per middel verschillen.

Voor het modelleren van de exposure-respons relatie wordt een E_{max} -model gebruikt met variabele helling (slope). Het benodigde aantal datapunten wordt gebaseerd op het aantal vrijheidsgraden (4 bij het E_{max} -model) en de te verwachten respons curve. Voor een goede curve fit zijn op basis hiervan minimaal 5 datapunten (dus 5 doseringsschema's) nodig (aantal vrijheidsgraden + 1): 1 datapunt op het maximale effect, 1 punt op het minimale effect en 3 punten voor het beschrijven van de helling. Echter, van tevoren is niet precies bekend bij welk doseringsschema het maximum of minimum effect optreedt. Er wordt daarom standaard bij 6 schema's gemeten. Dit is een balans tussen enerzijds te vaak een proef te moeten herhalen omdat er geen goede curvedescriptie kan worden bepaald (de punten op de effectcurve liggen te veel naar links of naar rechts ten opzichte van de EC50 en/of het bacteriostatische effect) en anderzijds standaard heel veel punten meten waarbij onnodig veel dieren worden gebruikt. Vanwege de biologische variatie in expositie en respons bij de individuele dieren moet elk datapunt in duplo of in triplo (afhankelijk van de te verwachten inter-individuele variatie) worden uitgevoerd. Daarnaast zijn per middel (of combinatie) infectiecontroles, groei-controles en comparator-antibioticum controles (behandeld met een middel waarvan het effect bekend is) nodig en single drug controles bij proeven met combinaties van middelen.

Voor de aanvang van de proef wordt de proefopzet in detail voorgelegd aan de IvD.

B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, levensstadia, geschatte aantallen per levensstadium, geslacht, genetische wijzigingen en, indien van belang voor het behalen van de doelstelling, de te gebruiken stam.

Volgnr.	Diersoort	Herkomst	Levensstadium	Aantal	Geslacht	Genetisch gewijzigd	Stam
---------	-----------	----------	---------------	--------	----------	---------------------	------

1	Mus Musculus	Dieren gefokt voor onderzoek	Jong volwassen	9010	vrouwelijk	NVT	Bij voorkeur worden CD-1 muizen gebruikt.
---	--------------	------------------------------	----------------	------	------------	-----	---

Onderbouw de bovengenoemde keuzes.

Diersoort	<p>Standaardisatie van het model is belangrijk om resultaten onderling te kunnen vergelijken. In het dijspiermodel dat in de literatuur beschreven is, wordt gebruik gemaakt van muizen. Er is een directe correlatie tussen de PK/PD indexen in muizen en mensen voor verschillende antibiotica.</p>
Herkomst	<p>Standaardisatie, ook van de microbiologische status van het gebruikte proefdier, is belangrijk om resultaten onderling te kunnen vergelijken. De normale flora van de muis kan invloed hebben op het beloop van de infectie. Door muizen te betrekken van een geregistreerde proefdierleverancier wordt deze flora zo veel mogelijk gestandaardiseerd.</p>
Levensstadia	<p>In het dijspiermodel dat in de literatuur beschreven is, wordt gebruik gemaakt van jong volwassen (5-10 weken) muizen. Deze standaardisatie is belangrijk om resultaten onderling te kunnen vergelijken.</p>
Aantal	<p>Fase 1-proeven moeten eenmalig worden uitgevoerd; als de modellen zijn aangepast dan kunnen (combinaties van) middelen getest worden in de fases 2-5.</p> <p>Het aantal te testen (combinaties van) middelen zal enerzijds afhangen van (combinaties van) middelen met potentie uit eigen <i>in vitro</i> onderzoek in het kader van wetenschappelijke onderzoeksprojecten en anderzijds van de interesse vanuit de farmaceutische industrie. Dit aantal is daarom niet geheel nauwkeurig in te schatten. Op basis van ervaring in de afgelopen jaren schatten we in dat we per 5 jaar maximaal 10 middelen als mono-behandeling en 5 combinaties van middelen gaan testen, waarvan een deel al in een vroeg stadium van het onderzoek zal afvallen ten gevolge van de GO/NO GO-criteria.</p> <p>Het totaal aantal dieren dat nodig zal zijn in 5 jaar hangt af van het succes van de (combinaties van) middelen. Wanneer een middel of combinatie in eerste proeven blijkt geen potentie te hebben om <i>in vivo</i> werkzaam te zijn, dan wordt dit middel niet verder <i>in vivo</i> onderzocht en wordt slechts een beperkt aantal dieren gebruikt. Wanneer een middel (of combinatie) wel succesvol is, dan worden alle proeven beschreven in fases 2-4 (voor mono-behandeling) of 2-5 (voor combinatie-behandeling) uitgevoerd. Dan zijn logischerwijs ook meer dieren nodig.</p> <p>In onderstaande berekeningen wordt uitgegaan van maximale aantallen. Wanneer de variatie binnen de groep naar verwachting kleiner is, dan kan worden volstaan met 2 dieren per groep, een kleiner aantal bacteriestammen en/of tijdstippen. Wanneer al enige informatie beschikbaar is over het doseringsschema (dosis en/of frequentie), dan kan in die gevallen eventueel worden volstaan met een beperkter aantal doseringsschema's. Voor de combinatie-behandelingen is uitgegaan van twee middelen die beide nog niet getest zijn als mono-behandeling. Uiteraard zullen er ook combinaties onderzocht worden van middelen waarvan we zelf (in eerder onderzoek of in het huidige project) het effect van mono-behandeling hebben onderzocht. In dat geval worden deze experimenten uiteraard niet herhaald, en wordt deze data gebruikt als input voor de experimenten met de combinatie. Er kan dan volstaan worden met een kleiner aantal groepen. Waar mogelijk zullen in het dijspiermodel 2 bacteriestammen per muis worden bestudeerd, wat leidt tot een halvering van het aantal benodigde proefdieren. In onderstaande berekeningen is niet van deze situatie uit gegaan, wat leidt tot maximale aantallen.</p> <p><u>Fase 1: Aanpassen van de bestaande modellen</u> In geval gewerkt gaat worden met bacteriestammen waarmee de onderzoeksgroep nog geen ervaring heeft, zal het bestaande model voor deze stam worden aangepast. Dit wordt</p>

gedaan voor maximaal 10 bacteriestammen. Muizen worden geïnfecteerd met 3 verschillende inocula. Op 3 verschillende momenten wordt sectie verricht op de muizen om te zien of er een reproduceerbare infectie ontstaat. In verband met biologische variatie zullen 3 muizen per groep worden gebruikt. Daarnaast zal ook vaak een groep van 3 muizen worden behandeld met een controle-antibioticum ("comparator-drug") waarvan bekend is dat dit effectief zal zijn *in vivo*, om aan te tonen dat de infectie behandelbaar is. Voor maximaal 10 bacteriestammen zal op 3 verschillende sectiemomenten bij 3 verschillende inocula de bacteriële load in de dijspier worden bepaald en onderling vergeleken. Het aantal bacteriestammen dat zal worden bestudeerd hangt af van het aantal stammen waarvoor het bestaande model geoptimaliseerd moet worden. De 3 inocula zijn het 'standaard' inoculum, en 2 inocula daar omheen. De 3 sectiemomenten zijn het moment dat normaliter behandeling wordt gestart (2 uur na infectie), op het moment dat normaliter behandeling wordt beëindigd (meestal 24 uur na start behandeling), en op een tussenliggend tijdstip.

Voor deze proef zijn 540 muizen nodig:

10 bacteriestammen x 3 inocula x 3 sectiemomenten x (3 onbehandelde muizen + 3 controle-antibioticum controles)

Voor (succesvolle) middelen zijn de volgende proeven noodzakelijk:

Fase 2: Screening op vroege bacteriedodende activiteit

Voor nieuwe middelen wordt op vroege bacteriedodende activiteit gescreend voor maximaal 4 relevante bacteriestammen met verschillende gevoeligheden (om de variatie tussen stammen te bestuderen, aantal afhankelijk van het onderzochte middel), bij maximaal 8 verschillende doses en/of sectiemomenten (keuze voor meerdere doses en/of meerdere sectiemomenten afhankelijk van verwachting over de effectieve dosis en killingsnelheid), voor elke dosis 2 muizen (1 muis in onvoldoende i.v.m. biologische variatie, meer dan 2 is onnodig omdat het hier een screening betreft) en 6 controles (2 infectiecontroles waarop sectie wordt verricht bij start behandeling, 2 placebo-behandelde groeiconroles en 2 muizen behandeld met een comparator-antibioticum). (Een comparator-antibioticum is vooral van belang om het effect van voornamelijk nieuwe middelen te vergelijken met dat van een bestaand antibioticum.)

Voor maximaal 4 bacteriestammen wordt bij maximaal 8 verschillende doses en/of sectiemomenten de bacteriële load in de dijspier in behandelde muizen vergeleken met onbehandelde muizen. Het aantal bacteriestammen hangt af van de breedte van de MRC-verdeling. Van nature is de spreiding tussen de MRC's van de ene bacteriesoort groter dan van de andere, voor een middel. Wanneer die spreiding groot is (zoals bij *E. coli* en cefuroxim; 0.008-8 mg/l; 11 diluatiestappen tussen de laagste en de hoogste MRC), dan zullen 4 bacteriestammen nodig zijn, terwijl bij een kleinere spreiding (zoals bij *E. coli* en meropenem; 0.008-0.06 mg/l; 4 diluatiestappen tussen de laagste en de hoogste MRC) kan soms worden volstaan met minder dan 4 bacteriestammen. De keuze voor doses en/of sectiemomenten hangt af van de verwachte effectieve dosis en killingsnelheid. Bij een verwachte grote killingsnelheid zullen bijvoorbeeld 4 doses en 2 sectiemomenten per dosis worden bestudeerd, bij verwachte lage killingsnelheid bijvoorbeeld 2 doses en 4 sectiemomenten per dosis.

Voor mono-behandeling zijn 88 muizen nodig:

4 bacteriestammen x 8 (doses en/of sectiemomenten) x 2 muizen per groep

+

4 bacteriestammen x (2 infectiecontroles + 2 groeiconroles + 2 comparator-antibioticum controles)

Voor 10 middelen als mono-behandeling zijn theoretisch $10 \times 88 = 880$ muizen nodig.

Voor combinatie-behandeling zijn 88 muizen nodig:

Nieuwe middelen worden in het algemeen gecombineerd met bestaande middelen. Voor het bestaande middel zijn deze screeningsexperimenten niet nodig, wel voor het nieuwe middel.

4 bacteriestammen x 8 (doses en/of sectiemomenten) x 2 muizen per groep
+
4 bacteriestammen x (2 infectiecontroles + 2 groeiconcontroles + 2 comparator-antibioticum controles)

Voor 5 combinaties van middelen zijn theoretisch $5 \times 88 = 440$ muizen nodig.

Fase 3: Exposure-respons relatie; Studie A: Bepaling van het *in vivo* PK profiel

Voor het modelleren van het PK profiel van een middel of combinatie van middelen zijn plasma- en ELF-concentraties van de middelen nodig op voldoende tijdstippen (maximaal 12 voor het maken van een volledige PK curve) bij voldoende verschillende doses (meestal 6-8, maximaal 8 voor het maken van een volledige PK curve) in triplo (1 sample is onvoldoende i.v.m. biologische variatie, 2 samples kan voldoende zijn wanneer de verwachte biologische variatie beperkt is, meer dan 3 is onnodig omdat een hele PK-curve wordt gecreëerd). Tijdstippen worden gekozen aan de hand van beschikbare data over PK en PD in literatuur en/of uit eigen eerdere studies, en/of aan de hand van data van vergelijkbare middelen (bijvoorbeeld dezelfde antibioticum-klasse). Dit wordt gedaan voor 1 bacteriestam (het gaat erom dat de muis geïnfecteerd is; de verwachte verschillen in PK profiel tussen muizen geïnfecteerd met verschillende stammen is minimaal). Het concentratie-verloop van het middel in de tijd wordt bepaald. Uit ervaring weten we dat 12 tijdstippen hiervoor voldoende zijn. Soms kan ook volstaan worden met minder tijdstippen, wanneer bijvoorbeeld bekend is dat een middel snel uit het lichaam geklaard wordt en de concentraties snel onder de detectielimiet zullen komen. Het concentratie-verloop van maximaal 8 verschillende doses wordt bepaald. Dit aantal en de hoogte van de doses hangt af van de (verwachte) klinisch haalbare concentraties van het middel.

Voor mono-behandeling zijn 294 muizen nodig:

(1 bacteriestam x 12 tijdstippen x 8 doses x maximaal 3 muizen per groep)
+
(1 bacteriestam x (3 infectiecontroles + 3 groeiconcontroles))

Voor 10 middelen als mono-behandeling zijn theoretisch $10 \times 294 = 2.940$ muizen nodig.

Voor combinatie-behandeling zijn 588 muizen nodig:

2 middelen x 294 muizen per middel

Voor 5 combinaties van middelen zijn theoretisch $5 \times 588 = 2.940$ muizen nodig.

Fase 3: Exposure-respons relatie; Studie B: Bepaling van de effectiviteit van middelen – en daarmee met behulp van het PK profiel expositie – als mono-behandeling

Dit wordt gedaan voor maximaal 8 bacteriestammen met verschillende gevoeligheden (2 bacteriespecies, 4 stammen per species met goede, slechte en gemiddelde gevoeligheid, om inzicht te krijgen in de variatie tussen en binnen species, aantal afhankelijk van het onderzochte middel), bij 6 verschillende doses (4 vrijheidsgraden, dus minimaal $4+1=5$ doses; om te voorkomen dat een experiment herhaald moet worden, worden 6 doses gekozen), voor elke dosis maximaal 3 muizen en 9 controles (3 infectiecontroles, 3 groeiconcontroles, 3 comparator-antibioticum controles).

Voor maximaal 8 bacteriestammen wordt bij 6 verschillende doses de bacteriële load in de dijspier in behandelde muizen vergeleken met onbehandelde muizen. Het aantal bacteriestammen hangt af van de breedte van de MRC-verdeling (zie uitleg bij fase 2). Het aantal doses hangt af van het aantal vrijheidsgraden (4 bij het E_{max} -model). De hoogte van

de doseringen zijn afhankelijk van het middel en het verwachte minimale en maximale effect.

Voor mono-behandeling zijn 216 muizen nodig:

(8 bacteriestammen x 6 doses x 3 muizen per groep)

+

(8 bacteriestammen x (3 infectiecontroles + 3 groeicontroles + 3 comparator-antibioticum controles))

Voor 10 middelen als mono-behandeling zijn theoretisch $10 \times 216 = 2.160$ muizen nodig.

Voor combinatie-behandeling zijn 432 muizen nodig:

2 middelen x 216 muizen per middel

Voor 5 combinaties van middelen zijn theoretisch $5 \times 432 = 2.160$ muizen nodig.

Fase 3: Exposure-respons relatie; Studie C: Dosis-fractioneringsstudie

Dit wordt gedaan voor 2 tot maximaal 4 (vaak andere dan in studie B gebruikte, aantal afhankelijk van het onderzochte middel) bacteriestammen met verschillende gevoeligheden (geeft inzicht in de variatie tussen stammen; eenzelfde hoeveelheid stammen als in studie B is niet nodig omdat de focus in dit experiment op de doseringsschema's ligt), in maximaal 18 (mono-behandeling) of 20 (combinatie-behandeling) verschillende doseringsschema's (verschillende doses in verschillende toedieningsfrequenties), voor elk schema maximaal 3 muizen en voor de hele proef maximaal 9 controles (3 infectiecontroles, 3 groeicontroles, 3 comparator-antibioticum controles). Bij combinatie-experimenten zijn bovendien maximaal 6 single-drug controles (3 single-drug controles van het ene en 3 van het andere middel) per combinatie van middelen.

Voor maximaal 4 bacteriestammen wordt bij maximaal 18 (mono-behandeling) of 20 (combinatie-behandeling) doseringsschema's de bacteriële load in de dijspier in behandelde muizen vergeleken met onbehandelde muizen. Het aantal bacteriestammen hangt af van de breedte van de MRC-verdeling (zie uitleg bij fase 2). Het aantal doseringsschema's bij mono-behandeling (maximaal 18; bijv. 6 doses in 3 frequenties) hangt af van de al beschikbare informatie en/of verwachting over effectieve dosis en toedieningsfrequentie. Bij combinatie-behandeling geldt hetzelfde, maar dan worden maximaal 20 doseringsschema's (bijv. 5 doses van middel A gecombineerd met middel B in 4 frequenties) bestudeerd. De hoogte van de doseringen zijn afhankelijk van het middel en het verwachte minimale en maximale effect.

Voor mono-behandeling zijn 504 muizen nodig:

(8 bacteriestammen x 18 doseringsschema's x 3 muizen per groep)

+

(8 bacteriestammen x (3 infectiecontroles + 3 groeicontroles + 3 comparator-antibioticum controles))

Voor 10 middelen als mono-behandeling zijn theoretisch $10 \times 504 = 5.040$ muizen nodig.

Voor combinatie-behandeling zijn 600 muizen nodig:

(8 bacteriestammen x 20 doseringsschema's x 3 muizen per groep)

+

(8 bacteriestammen x (3 infectiecontroles + 3 groeicontroles + 3 comparator-antibioticum controles))

+

(8 bacteriestammen x (3 single-drug controles middel 1 + 3 single-drug controles middel 2))

Voor 5 combinaties van middelen zijn theoretisch $5 \times 600 = 3.000$ muizen nodig.

Fase 4: Validatie van de PK/PD voor de bepaling van de farmacodynamische target en de variatie daarin tussen stammen ter ondersteuning van breekpunt bepaling

Dit wordt gedaan voor minimaal 4 tot maximaal 6 andere bacteriestammen dan de eerder gebruikte stammen (geeft, gecombineerd met data uit studies B en C, fase 2, een uitgebreid inzicht in de variatie tussen stammen, bij verschillende doseringsschema's; aantal afhankelijk van het onderzochte middel), in 12 verschillende doseringsschema's (bijv. 3 schema's voor het ene en 4 schema's voor het andere middel; gekozen wordt voor de meest belovende schema's uit studie B voor een uitgebreider stammenpanel), voor elk schema maximaal 3 muizen, 9 controles (3 infectiecontroles, 3 groeiconroles, 3 comparator-antibioticum controles) en voor combinaties van middelen bovendien maximaal 6 single-drug controles (3 single-drug controles van het ene en 3 van het andere middel). Voor maximaal 6 bacteriestammen wordt bij maximaal 12 doseringsschema's de bacteriële load in de dijspier in behandelde muizen vergeleken met onbehandelde muizen. Het aantal bacteriestammen hangt af van de breedte van de MRC-verdeling (zie uitleg bij fase 2). Het aantal doseringsschema's (maximaal 12, bijv. 4 doses in 3 frequenties) hangt af van de al beschikbare informatie en/of verwachting over effectieve dosis en toedieningsfrequentie. De hoogte van de doseringen zijn afhankelijk van het middel en het verwachte minimale en maximale effect.

Voor mono-behandeling zijn 270 muizen nodig:

(6 bacteriestammen x 12 doseringsschema's x 3 muizen per groep)

+

(6 bacteriestammen x (3 infectiecontroles + 3 groeiconroles + 3 comparator-antibioticum controles))

Voor 10 middelen als mono-behandeling zijn theoretisch $10 \times 270 = 2.700$ muizen nodig.

Voor combinatie-behandeling zijn 306 muizen nodig:

(6 bacteriestammen x 12 doseringsschema's x 3 muizen per groep)

+

(6 bacteriestammen x (3 infectiecontroles + 3 groeiconroles + 3 comparator-antibioticum controles))

+

(6 bacteriestammen x (3 single-drug controles middel 1 + 3 single-drug controles middel 2))

Voor 5 combinaties van middelen zijn theoretisch $5 \times 306 = 1.530$ muizen nodig.

Fase 5: Effect van verschillende doseringsverhoudingen van twee middelen

Dit wordt gedaan voor 2 verschillende bacteriestammen (geeft, gecombineerd met de resultaten van experimenten uit fases 3 en 4 een vrijwel volledig inzicht in de variatie tussen stammen bij verschillende doseringsschema's; aantal afhankelijk van het onderzochte middel), in 6 verschillende doseringsschema's per middel (dus maximaal 6 schema's voor het ene en 6 schema's voor het andere middel; 4 vrijheidsgraden, dus minimaal 5 schema's; om te voorkomen dat een experiment herhaald moet worden, worden 6 schema's gekozen), voor elk schema maximaal 3 muizen. (Dit is een *in vivo* checkerboard assay.) De focus in dit experiment ligt op de doseringsschema's die voor een klein stammenpanel worden bestudeerd. Daarnaast zijn maximaal 18 infectiecontroles, 18 groeiconroles en 18 comparator-antibioticum controles nodig voor de hele proef.

Voor 2 verschillende bacteriestammen wordt bij maximaal 36 verschillende doseringsschema's de bacteriële load in de dijspier in behandelde muizen vergeleken met onbehandelde muizen. Er wordt gekozen voor 2 verschillende bacteriestammen, waarmee aanvullend aan de resultaten van experimenten uit fases 3 en 4 een goed beeld van de variatie tussen stammen verkregen wordt. Het aantal doseringsschema's (maximaal 36;

bijv. 6 schema's voor het ene en 6 schema's van het andere middel) hangt af van de al beschikbare informatie en/of verwachting over effectieve dosis en toedieningsfrequentie. De hoogte van de doseringen zijn afhankelijk van het middel en het verwachte minimale en maximale effect.

Voor combinatie-behandeling zijn 324 muizen nodig:

(2 bacteriestammen x 36 doseringsschema's x 3 muizen per groep)

+

(2 bacteriestammen x (18 infectiecontroles + 18 groeiconroles + 18 comparator-antibioticum controles))

Voor 5 combinaties van middelen zijn theoretisch $5 \times 324 = 1.620$ muizen nodig.

Voor één succesvol middel als mono-behandeling zijn in totaal maximaal $88+294+216+504+270= 1.372$ muizen nodig.

Voor één succesvolle combinatie van middelen zijn in totaal maximaal $88+588+432+600+306+324= 2.338$ muizen nodig.

Voor 10 middelen als mono-behandeling zijn theoretisch $10 \times 1.372 = 13.720$ muizen nodig. Voor 5 combinaties van middelen zijn theoretisch $5 \times 2.338 = 11.690$ muizen nodig. Echter, niet alle (combinaties van) middelen zullen even succesvol zijn en deze zullen in verschillende stadia van het *in vivo* onderzoek afvallen ten gevolge van de GO/NO GO-criteria. Op basis van ervaring weten we dat waarschijnlijk ongeveer 1/3 deel van het theoretisch aantal benodigde muizen nodig is. $(13.720 + 11.690) : 3 = 8.470$ muizen.

We verwachten dat 2/3 deel van het theoretisch benodigde aantal muizen zal afvallen ten gevolge van de GO/NO GO-criteria en ook doordat er minder dan het maximaal aantal berekende dierproeven voor alle bacteriestammen, doseringsschema's en tijds punten nodig zullen zijn door bovenstaande overwegingen.

In totaal zijn hiermee maximaal 540 (fase 1) + 8.470 (fases 2-5) = 9.010 muizen nodig.

In dit totaal aantal van 9.010 muizen is al rekening gehouden met het feit dat middelen zullen afvallen (en dus niet alle fases doorlopen) ten gevolge van een NO GO-beslissing. Op basis van ervaring uit het verleden weten we dat ongeveer 1/3 deel van het theoretisch benodigde aantal dieren $(13.720 + 11.690 = 25.410)$ nodig zal zijn voor de PK/PD studies in fases 2-5, wat neerkomt op $(25.410 : 3 =) 8.470$. Het overige 2/3 deel zal afvallen.

Geslacht

Standaardisatie van het model is belangrijk om resultaten onderling te kunnen vergelijken. Er is meestal een directe correlatie tussen de PK/PD indexen in vrouwelijke proefdieren en mensen (vrouw én man) voor verschillende antibiotica. Wanneer studies worden uitgevoerd bij vrouwelijke muizen hoeven de resultaten daarom niet ook nog eens bij mannelijke muizen bevestigd te worden. Het gaat immers primair om de concentratie-effect relatie. (Nota bene, de doseringen om die concentraties te bereiken kunnen wel verschillend zijn tussen man en vrouw). In het in de literatuur beschreven dijspiermodel wordt gebruik gemaakt van vrouwelijke muizen. Door in dit project ook vrouwelijke muizen te gebruiken kunnen resultaten vergeleken worden met eerder verkregen resultaten (literatuur en eigen data). Door voor de bepaling van het PK profiel alleen vrouwelijke dieren te gebruiken wordt een zeer gestandaardiseerd PK profiel bepaald met weinig variatie. Alleen bij een PK profiel met weinig variatie is het mogelijk de groepsgroottes in de proeven voor bepaling van de exposure-respons relatief klein te houden. Daarnaast zijn mannelijke muizen vanwege hun agressievere gedrag moeilijker in groepen te huisvesten.

Genetisch gewijzigd	N.v.t.
Stam	Bij voorkeur worden CD-1 muizen gebruikt. Deze stam wordt ook in het dijspiermodel beschreven in de literatuur gebruikt.

C. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

Ja

Nee > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

D. Pijn en welzijnsaantasting

Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?

Nee >

Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

De mogelijke pijn die veroorzaakt wordt door lokale ontsteking en ziekte zal worden geminimaliseerd door gebruik van adequate analgetica waarvan gebleken is dat zij niet interfereren met de infectie. Pijnbestrijding zal worden toegepast bij alle dieren in alle experimenten voordat gestart wordt met behandeling met de verschillende middelen. In verband met standaardisatie ontvangen alle dieren analgesie. Omdat op voorhand niet bekend is welke therapie effectief is (dit is de vraagstelling van het onderzoek) kan er niet alleen aan de niet of slecht behandelde muizen pijnbestrijding gegeven worden. De eerste injectie zal zijn vlak voor de eerste behandeling. De dosis wordt zodanig gekozen dat deze 12 uur effectief is en pijn door ontsteking en ziekte voorkomt. Op dat moment wordt een volgende injectie gegeven, wat elke 12 uur herhaald wordt tot aan het einde van de proef. Bij experimenten die langer duren dan 48 uur (maximaal 7 dagen) wordt in de eerste 48 uur pijnbestrijding worden toegepast. Na 48 uur wordt in overleg met de IvD al dan niet pijnbestrijding toegepast. Bij dieren waarbij na 48 uur nog steeds sprake is van (ernstige) pijn zullen de nadelige verschijnselen van een langere opiaat-behandeling minder prominent optreden. Dit zal per gebruikte bacteriestam worden afgewogen. Bij bacteriestammen die infectie veroorzaken die naar verwachting meer pijn oplevert, zal de pijnbestrijding ook na 48 uur worden toegepast. Bij stammen die infectie veroorzaken die naar verwachting minder pijn oplevert, zal pijnbestrijding na 48 uur niet meer worden toegepast.

Uit eerdere experimenten binnen onze onderzoeksgroep en andere onderzoeksgroepen is gebleken dat toepassing van analgetica niet interfereert met het PK profiel van de tot nu toe onderzochte middelen. We verwachten dat dit ook voor andere middelen niet het geval zal zijn. Theoretisch zou wel een controlegroep meegenomen moeten worden zonder analgesie om dit uit te sluiten. Omdat er inmiddels vele middelen zijn bestudeerd waarbij gebruik wordt gemaakt van deze vorm van pijnstilling (door onszelf in eerder onderzoek en door andere onderzoeksgroepen) vinden wij het aannemelijk dat deze vorm van analgesie ook niet met het PK profiel van andere middelen zal interfereren. Het zou bovendien – als er al interferentie zou zijn – een systematische afwijking betreffen van het PK profiel. Ook de dieren waar het PK profiel bij is bepaald hebben immers deze pijnstilling gehad. Een extra controlegroep zou om extra dieren vragen zonder dat dit ook maar enige bijdrage levert aan de uitkomst van de experimenten.

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Wanneer de infectie onbehandeld blijft of wanneer de behandeling niet effectief is, dan zullen de achterpoten van het dier ontstoken raken. Hierdoor kunnen ze deze niet meer goed gebruiken en zullen ze zich vooral met de voorpoten voortbewegen. In sommige gevallen zal de infectie dissemineren en ontaarden in een sepsis. In beide gevallen worden de dieren direct geëuthanaseerd. Wel willen we benadrukken dat de

experimenten meestal maar 24 uur, soms 48 uur en maar bij uitzondering langer dan 48 uur (na start behandeling) duren. Deze klinische effecten komen in de meeste gevallen pas na 24 uur tot uiting.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Stress kan ontstaan door experimentele handelingen (hanteren, infecteren, injecties, euthanasie onder anesthesie). Ziekte kan ontstaan door de bacteriële infecties bij niet-effectieve doseringsschema's of bijwerkingen van de middelen.

Beschrijf welke maatregelen worden genomen om deze schadelijke effecten te voorkomen of waar mogelijk te minimaliseren.

Stress door experimentele handelingen kan niet worden voorkomen. Handelingen zullen alleen uitgevoerd worden door competente medewerkers die getraind zijn om met muizen te werken. Bij het bereiken van de humane eindpunten zal het dier worden geëuthanaseerd. Euthanasie vindt plaats onder anesthesie.

E. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

Nee > Ga verder met vraag F.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Dieren worden na infectie gemonitord, ten minste bij elke handeling, en indien nodig (wanneer de score zoals hieronder omschreven 5 of hoger is) wordt de frequentie verhoogd.

De dieren worden gescoord met 0, 1 of 2 op de volgende criteria:

criterium	0	1	3
Gewichtsverlies	Normaal	Licht afwijkend (-5% t.o.v. startgewicht)	Erg afwijkend (-10% t.o.v. startgewicht)
Temperatuurdaling	Normaal	Licht afwijkend (<35.5°C)	Erg afwijkend (<34°C)
Uitdroging	Niet aanwezig	Lichte uitdroging	Ernstige uitdroging
Donkere ogen	Niet aanwezig	Enigszins aanwezig	Zeer donkere ogen
Opstaande vacht	Niet aanwezig	Enigszins aanwezig	Zeer aanwezig

Deze scores worden per dag bij elkaar opgeteld. Per criterium wordt de hoogst gegeven score meegenomen in de optelsom. Voorbeeld: Een muis scoort op dag 1 één punt op 'gewichtsverlies'. Op dag 2 scoort dezelfde muis nul punten op dit criterium. In de optelsom op dag 2 zal dan toch één punt worden meegenomen.

Als deze totale score hoger dan 7 is, dan wordt het dier zonder uitstel geëuthanaseerd en bemonsterd. Wanneer een score van 7 (waarbij dus nog niet voldaan is aan 'hoger dan 7' voor euthanasie) meer dan 24 uur aanhoudt, wordt dit niet ook geaccepteerd, en wordt het dier uit proef gehaald.

Naast bovenstaand scoresysteem zijn er ook een aantal 'direct-uit-proef'-criteria:

- Gewichtsverlies groter dan 20% t.o.v. het startgewicht
- Gewichtsverlies groter dan 15% binnen 24 uur
- Rectale temperatuur lager dan 33°C
- Lethargie of hyperactiviteit door disseminatie van infectie naar de hersenen
- Tollen (bij infectie van de hersenen)
- Wanneer dieren de achterpoten niet meer goed gebruiken en voortbewegen met alleen de voorpoten

Om wetenschappelijke conclusies te kunnen verbinden aan dit onderzoek is het noodzakelijk dat per studie een groep dieren (bijv. placebo-behandeling, behandeling met een lage dosering van een middel) een hoge bacteriële load krijgt, om een effectieve (bacteriedodende) dosering, dus met een lage bacteriële load, van een middel tegen af te kunnen zetten. Alleen op deze manier kan de dosering en de PK/PD index en target die nodig is voor bacteriostasis (geen bacteriegroei) en voor afdoding van de bacteriën bepaald worden. Deze groep dieren met een hoge bacteriële load kan (afhankelijk van de gebruikte bacteriestam, want niet

alle bacteriestammen leiden tot een ernstige klinische infectie bij een hoge bacteriële load) leiden tot ernstig ongerief.

De duur van dit ernstig ongerief wordt zo veel als mogelijk bekort door het in acht nemen van de humane eindpunten. Kortdurend ernstig ongerief is noodzakelijk om wetenschappelijke conclusies te kunnen trekken uit dit onderzoek.

De humane eindpunten hebben daarom niet tot doel ernstig ongerief te voorkomen, maar om de duur en impact van het ernstig ongerief zo kortdurend mogelijk te houden. Afhankelijk van het klinisch beeld worden de muizen gemonitord, maar ten minste elke 8 uur, waardoor het ernstig ongerief nooit langer dan 8 uur duurt. Wanneer het klinisch beeld daartoe aanleiding geeft, dan zal de frequentie van monitoren worden verhoogd, om het ernstig ongerief zo kortdurend mogelijk te houden. Experimenten worden alleen uitgevoerd op werkdagen, zodat overdag monitoren eenvoudig is. Het tijdstip van infectie wordt zodanig gekozen dat de 'kritische periode' waarin muizen een klinisch beeld kunnen gaan vertonen zo veel mogelijk overdag (vroeg ochtend tot vroeg avond, waarbij onderzoekers aanwezig zijn) valt, om te realiseren dat het ongerief zo kortdurend mogelijk is.

In sommige gevallen is het dus noodzakelijk voor een experiment dat een groep dieren een relatief hoger (kortdurend ernstig) ongerief heeft. De humane eindpunt criteria worden hierbij wel altijd in acht genomen, maar hiermee is niet te voorkomen dat muizen in voorkomende gevallen toch ernstig ongerief ondervinden. Welke en hoeveel dieren dit zal betreffen, is van tevoren niet te voorspellen, omdat dit afhangt van de effectiviteit van een middel, hetgeen onderzocht wordt in het experiment. Dit zal voornamelijk gaan om dieren in experimenten waarbij de exposure-respons relatie wordt onderzocht, bij dieren die een lage dosis van het middel of een placebo-behandeling krijgen. Echter, bij niet-effectieve middelen zullen ook dieren die een hogere dosis van het middel krijgen hoger ongerief ondervinden.

Zoals in vraag F aangegeven, verwachten we dat in fase 1-studies 50% (n=270), in PK-proeven 5% (n=98) en in exposure-respons proeven 15% (n=976) van de dieren de humane eindpunten zal bereiken.

Het is belangrijk dat voorkomen wordt dat de eindpunt criteria al (te) scherp worden gedefinieerd, waardoor het wetenschappelijk eindpunt niet zou worden bereikt en het doel van de proef niet wordt gerealiseerd.

Bij termineren van de dieren voordat het ongerief hoog wordt kan de vraagstelling niet worden beantwoord. Voor de vraagstelling is het van groot belang dat het doseringsschema kan worden afgemaakt. Dit schema wordt opgesteld aan de hand van gegevens uit literatuur en op basis van resultaten van onze eigen *in vitro* experimenten. Het schema wordt niet langer gemaakt dat strikt noodzakelijk is. Als er doseringsschema's of tijdstippen missen doordat dieren voortijdig geëuthanaseerd worden, dan kan de exposure-response relatie (farmacodynamische index en farmacodynamische target) niet of minder nauwkeurig worden berekend. Daardoor zullen de proeven met een aangepast doseringsschema moeten worden herhaald en zijn ook opnieuw de bijbehorende controledieren nodig. Bij een groep dieren zal dit dus mogelijk leiden tot relatief hoger ongerief (kortdurend ernstig ongerief), maar het voorkomt wel dat proeven herhaald moeten worden.

Welk percentage van de dieren loopt per diersoort kans deze criteria te halen?

Ziekte komt in de meeste gevallen pas na 24 uur tot uiting. Bij proeven in fase 1 blijven dieren onbehandeld, en dieren waarbij het inoculum te hoog worden hebben een grotere kans het humane eindpunt te bereiken. Ingeschat is dat bij maximaal de helft van de dieren het humane eindpunt wordt bereikt.

Voor fase 1: maximaal 50%
Dit percentage is in vraag F verder toegelicht.

Proeven waarbij het PK profiel (fase 3, studie A) wordt bepaald duren over het algemeen niet langer dan 24 uur (na start behandeling) en voor het grootste aantal groepen korter, waardoor de kans op het bereiken van de humane eindpunten klein is.

Voor PK-proeven (fase 3, studie A): 5%
Dit percentage is in vraag F verder toegelicht.

Proeven waarbij de exposure-respons relatie wordt bepaald (fase 2, fase 3 studie B en C, fase 4, fase 5) duren meestal 24 uur (na start behandeling), maar in sommige gevallen langer dan 48 uur, maximaal 7 dagen na start therapie. In die gevallen kan het voorkomen – afhankelijk van de effectiviteit van de (combinatie van) middelen – dat de humane eindpunten bereikt worden.

Voor exposure-respons proeven (fase 2, fase 3 studie B en C, fase 4, fase 5): 15%
Dit percentage is in vraag F verder toegelicht.

F. Classificatie van ongerief

Benoem de experiment gebonden factoren die bijdragen aan het ongerief en geef voor elk van deze factoren aan hoe het ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig'. Geef per diersoort en behandelgroep het cumulatieve ongerief aan in percentages van het totale aantal dieren.

Het ongerief ten gevolge van de experimentele handelingen is voor alle dieren ingeschat op matig:

Dag -4 en -1: IP cyclofosfamide, wegen

T = ± -2h: IM infectie in beide dijspieren

T = 0: behandeling, meestal SC

T = ...: behandeling, meestal SC, frequentie afhankelijk van doseringsschema, maximaal 18 toedieningen per maximaal 7 dagen; bij aanleiding wegen en temperaturen (infrarood thermometer)

Daarnaast kan er ongerief zijn ten gevolge van de infectie. Bij (te) lage inocula, bij middelen die succesvol blijken, bij middelen zonder bijwerkingen en bij groepen waarbij sectie vroeg na start behandeling plaatsvindt zal het ongerief ten gevolge van infectie minder hoog zijn. Echter, bij welke inocula en middelen dit het geval is, is van tevoren niet te voorspellen; dit is de onderzoeksvraag.

Bij dieren die de humane eindpunten niet bereiken is het totale ongerief ingeschat op matig; bij dieren die de humane eindpunten wel bereiken is het totale ongerief nu ingeschat op ernstig. Naar verwachting ondervindt 50% van de dieren in fase 1-studies (Aanpassen van de bestaande modellen), 5% van de dieren in PK proeven (fase 3, studie A) en 15% van de dieren in exposure-respons proeven (fase 2, fase 3 studie B en C, fase 4, fase 5) ernstig ongerief, en bereikt de humane eindpunten. Het is belangrijk om zo veel mogelijk te voorkomen dat het doseringsschema niet kan worden afgemaakt, omdat de exposure-respons relatie dan niet of minder nauwkeurig kan worden berekend. Bij termineren van de dieren voordat het ongerief hoog wordt kan de vraagstelling niet worden beantwoord, zoals beargumenteerd in het antwoord op vraag E (Humane eindpunten).

In absolute aantallen geldt onderstaande beredeneerde schatting:

Fase 1: Aanpassen van de bestaande modellen

Bij deze proeven zal maximaal 50% van de muizen (n=270) de humane eindpunten bereiken ten gevolge van te hoge inocula. Bij deze muizen is het totale ongerief ingeschat op ernstig. Bij de overige 50% (=270 muizen) zal het inoculum te laag of goed zijn; bij deze muizen is het totale ongerief ingeschat op maximaal matig.

Het percentage van 50% van de muizen dat (kortdurend) ernstig ongerief zal ondervinden is gebaseerd op de inschatting dat het inoculum óf te hoog is (50% van de gevallen, leidend tot ernstig ongerief) óf laag of goed (50% van de gevallen, leidend tot matig ongerief.) Met deze proeven is nog geen eerdere ervaring opgedaan. Deze inschatting is daarom aan de voorzichtige kant, waarbij 50% ernstig ongerief wellicht een overschatting is: het inoculum dat als eerst wordt gebruikt is een redelijk en beredeneerd inoculum, waarvan we verwachten dat dit het juiste inoculum zou kunnen zijn, en dat dus niet leidt tot ernstig ongerief.

PK-proeven (fase 3, studie A):

5% van de dieren in PK-experimenten ondervindt ernstig ongerief (inschatting o.b.v. ervaringen in het verleden met dergelijke experimenten). In deze experimenten worden per middel maximaal 294 muizen gebruikt (voor een combinatie komt dit dus neer op $2 \times 294 = 588$ muizen). Voor 10 succesvolle mono-behandelingen en 5 combinatie-behandelingen zouden dit $10 \times 294 + 5 \times 588 = 5.880$ muizen zijn. 1/3 van het totaal aantal muizen is nodig i.v.m. uitval ten gevolge van de GO/NO GO criteria: $5.880 : 3 = 1.960$ muizen. 5% hiervan zal ernstig ongerief ondervinden: $1.960 \times 0,05 = 98$ muizen die ernstig ongerief ondervinden. De overige dieren ($1.960 - 98 = 1.862$ muizen) ondervinden matig ongerief.

Het percentage van 5% van de muizen dat (kortdurend) ernstig ongerief zal ondervinden is gebaseerd op ervaringen in het verleden met dit soort studies. (Een inschatting op basis van retrospectieve beoordeling van de voorgaande vergunning is ons inziens niet realistisch. De gebruikte (combinaties van) middelen en hun te onderzoeken effectiviteit bepalen hoeveel muizen een klinisch beeld ontwikkelen en hoeveel muizen de humane eindpunten bereiken en dus kortdurend ernstig ongerief ondervinden. In het huidige project worden andere, effectievere en/of minder succesvolle (combinaties van) middelen gebruikt dan in het voorgaande

project, waardoor een inschatting op basis van de voorgaande vergunning een over- of onderschatting kan geven.)

De meeste studies duren maximaal 24 uur, maar op het grootste deel van de muizen zal sectie worden verricht al vroeg na infectie. Dit is het meest interessante stuk van de concentratie-tijd curve (PK curve), en daarom worden in dit stuk de meeste data verzameld. Door sectie te verrichten al vroeg na infectie ontwikkelen de meeste dieren geen klinisch beeld en bereiken ze de humane eindpunten niet.

Bij middelen met een lange halfwaardetijd duren de studies langer dan 24 uur en is het eerste deel van de PK curve wat meer uitgesmeerd. De kans dat hier dieren een klinisch beeld en eventueel ernstig ongerief ontwikkelen is iets groter dan bij 24-uurs studies, maar nog steeds zal dit een kleine groep dieren zijn; die dieren waarop relatief laat na infectie sectie plaatsvindt.

Exposure-respons proeven (fase 2, fase 3 studie B en C, fase 4, fase 5):

15% van de dieren in PK/PD-experimenten ondervindt ernstig ongerief (inschatting o.b.v. ervaringen in het verleden met dergelijke experimenten). In deze experimenten worden per mono-behandeling maximaal 88 (fase 2) + 216 (fase 3 studie B) + 504 (fase 3 studie C) + 270 (fase 4) = 1.078 muizen gebruikt; per combinatie-behandeling maximaal 88 (fase 2) + 432 (fase 3 studie B) + 600 (fase 3 studie C) + 306 (fase 4) + 324 (fase 5) = 1.750 muizen. Voor 10 succesvolle mono-behandelingen en 5 combinatie-behandelingen zouden dit $10 \times 1.078 + 5 \times 1.750 = 19.530$ muizen zijn. $1/3$ van het totaal aantal muizen is nodig i.v.m. uitval ten gevolge van de GO/NO GO criteria: $19.530 : 3 = 6.510$ muizen. 15% hiervan zal ernstig ongerief ondervinden: $6.510 \times 0,15 = 976$ muizen die ernstig ongerief ondervinden. De overige dieren ($6.510 - 976 = 5.534$ muizen) ondervinden matig ongerief.

Het percentage van 15% van de muizen dat (kortdurend) ernstig ongerief zal ondervinden is gebaseerd op ervaringen in het verleden met dit soort studies. (Een inschatting op basis van retrospectieve beoordeling van de voorgaande vergunning is ons inziens niet realistisch. De gebruikte (combinaties van) middelen en hun te onderzoeken effectiviteit bepalen hoeveel muizen een klinisch beeld ontwikkelen en hoeveel muizen de humane eindpunten bereiken en dus kortdurend ernstig ongerief ondervinden. In het huidige project worden andere, effectievere en/of minder succesvolle (combinaties van) middelen gebruikt dan in het voorgaande project, waardoor een inschatting op basis van de voorgaande vergunning een over- of onderschatting kan geven.)

De meeste studies duren 24 uur na start behandeling. Dieren die met placebo behandeld zijn, of met een lage dosering van een middel, of met een middel dat helemaal niet *in vivo* effectief is tegen de bacteriële verwekker, kunnen een klinisch beeld ontwikkelen en de humane eindpunten bereiken. Dit is niet altijd het geval, want sommige bacteriestammen leiden tot een heel gematigd klinisch beeld waarbij de humane eindpunten niet bereikt worden, ook niet in de placebo-behandelde groepen. (Deze dieren hebben dan wel een hoge bacteriële load zoals benodigd om wetenschappelijke conclusies te trekken, waardoor de vraagstelling wél beantwoord kan worden.)

De inschatting is dat ongeveer de helft van de studies zal worden uitgevoerd met stammen die altijd een gematigd klinisch beeld geven (muizen ondervinden matig ongerief), en de andere helft met stammen die in de placebo-behandelde en in de laag-gedoseerde muizen een ernstig klinisch beeld geven (muizen ondervinden kortdurend ernstig ongerief). Van deze laatste groep verwachten we dat ongeveer 30% van de muizen ernstig ongerief zal ondervinden (placebogroep en de laagst gedoseerde muizen). In totaal zal dus 15% van de muizen ernstig ongerief ondervinden.

Totaal:

Matig ongerief: 270 (fase 1) + 1.862 (PK-proeven) + 5.534 (exposure-respons proeven) = 7.666 muizen

Ernstig ongerief: 270 (fase 1) + 98 (PK-proeven) + 976 (exposure-respons proeven) = 1.344 muizen

Totaal: $7.666 + 1.344 = 9.010$ muizen

G. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welke keuzes daarbij zijn gemaakt.

Vervanging	Voordat middelen in dieren getest worden, zijn ze reeds <i>in vitro</i> getest. Alleen de (combinaties van) middelen met potentie om <i>in vivo</i> werkzaam te kunnen zijn, zullen in dieren onderzocht worden.
------------	--

	<p>Op basis van de data die wordt verkregen uit het <i>in vivo</i> en het <i>in vitro</i> onderzoek kan de stap naar klinische studies worden gemaakt, omdat de exposure-respons relaties in dit model goed overeenkomen met de verwachte respons bij patiënten. Ook voor het opstellen of herzien van de productinformatie van middelen is deze data nodig. De European Medicines Agency (EMA) heeft het voornemen om de productinformatie van bestaande antibiotica de komende jaren te herzien onder andere aan de hand van informatie gegenereerd in diermodellen die relevant zijn voor de latere indicatie. Voor colistine is dit inmiddels gebeurd. Vervangen van deze dierproeven is daarom niet mogelijk.</p>
Vermindering	<p>Door de gestandaardiseerde opzet van de proeven kunnen de resultaten verkregen voor een middel (of combinatie) goed vergeleken worden met die voor een ander middel (of combinatie), verkregen in dit project, eerdere projecten, of beschreven in de literatuur. Ook is door de gekozen gestandaardiseerde opzet slechts een beperkt aantal onbehandelde controledieren nodig.</p> <p>Voor het bepalen van een standaard exposure-respons curve wordt het minimale aantal dieren gebruikt waarvan verwacht mag worden dat daarmee het effect kan worden beschreven, zonder de noodzaak tot veelvuldig herhalen van de proef. Dit laatste zou bovendien extra controledieren vragen.</p> <p>Door het hanteren van heldere GO/NO GO-criteria worden middelen die al in een vroeg stadium van het onderzoek blijken geen potentie te hebben om <i>in vivo</i> werkzaam te zijn niet verder onderzocht en wordt onnodig proefdiergebruik voorkomen. Experimentele middelen worden vaak voor 1 bacteriespecies ontwikkeld. Bij screening op vroege bacteriedodende activiteit (fase 2) worden dan niet meteen 4 bacteriestammen gebruikt voor infectie, maar eerst 1 stam. Als het middel dan geen activiteit vertoont, is dit een NO GO. Deze experimenten worden met kleine groepen (n=2) uitgevoerd, dit is voldoende om eventueel aanwezige vroege bacteriedodende activiteit te zien.</p> <p>Alle andere experimenten worden uitgevoerd met minimaal 2 en maximaal 3 muizen per groep. Het definitieve aantal dieren per groep wordt bepaald aan de hand van de te verwachten inter-individuele variatie. Bij kleine inter-individuele variatie kan volstaan worden met 2 muizen per groep; bij grotere variatie (ondanks de standaardisatie van het model) zijn 3 muizen per groep noodzakelijk. Wanneer 2 muizen per groep nodig zijn, dan zijn uiteraard ook in totaal per middel of per combinatie minder dieren nodig; de berekeningen zijn gemaakt op basis van 3 dieren per groep.</p> <p>Wanneer voor concentratie-bepaling van middelen kan volstaan met een kleine hoeveelheid plasma, dan wordt ook tijdens het experiment bloed afgenomen bij de muizen. Dit leidt tot een reductie van het aantal sectie-momenten, en dus tot reductie van het benodigd aantal proefdieren.</p> <p>In geval van nieuwe antibiotica is een comparator-antibioticum nodig als controle om het effect van het nieuwe antibioticum mee te vergelijken. De noodzaak voor deze controlegroep is er bij bestaande antibiotica niet altijd. Daarom kan deze groep in voorkomende gevallen vervallen, wat leidt tot een vermindering van het benodigd aantal dieren.</p> <p>In een aantal gevallen kunnen 2 verschillende bacteriestammen per muis gebruikt worden, 1 stam per dijspier. Dit gaat op voor stammen waarvan bekend is dat beide infecties geen invloed hebben op elkaars beloop. Alleen in die gevallen kan het benodigd aantal muizen gehalveerd worden, omdat per muis 2 bacteriestammen worden gebruikt.</p>

	<p>In geval het niet mogelijk is 2 verschillende bacteriestammen per muis te gebruiken, worden ook beide dijspieren geïnfecteerd, met dezelfde bacteriestam. Dit levert dan een duplo binnen een dier op, maar omdat de blootstelling aan het middel hetzelfde is in beide dijspieren (er wordt immers één muis behandeld), is dit geen onafhankelijke duplo. Dit levert daarmee geen vermindering van het aantal benodigde proefdieren op. Er wordt niet voor gekozen om in dit geval slechts 1 dijspier te infecteren. Een duplo binnen het dier levert – ondanks dat het geen onafhankelijke duplo is – meer informatie op uit 1 dier: het gemiddelde van de bacteriële load in de twee dijspieren kan gebruikt worden (in plaats van de load in een dijspier), wat de betrouwbaarheid van de data verhoogd.</p> <p>Deze extra informatie weegt ons inziens op tegen het beperkte extra ongerief dat een muis ondervindt ten gevolge van infectie in beide dijspieren ten opzichte van infectie in een dijspier. Bij infectie met sommige bacteriestammen is sprake van ontsteking van de achterpoot of –poten, waardoor de muizen deze niet meer goed gebruiken. Ze lopen wel, maar gebruiken daarvoor de voorpoten. Dieren worden dan direct geëuthanaseerd (vraag E) waardoor dit niet leidt tot meer ongerief dan wanneer één dijspier geïnfecteerd zou zijn en minder bruikbaar zou zijn. Bij infectie met andere stammen is de klinische infectie beperkt en lopen en klimmen en bewegen de muizen – ook met twee geïnfecteerde dijspieren – normaal. Hiermee is het ongerief door infectie van een of twee dijspieren beperkt en vergelijkbaar. Door het in acht nemen van de humane eindpunten is ons inziens het ongerief na infectie van beide dijspieren versus infectie van één dijspier slechts kortdurend hoger bij gebruik van stammen die resulteren in ontstoken achterpoten, en gelijk bij gebruik van stammen die beperkte klinische infectie geven.</p> <p>De proefopzet van de proeven wordt voorgelegd aan de IvD. Hierbij wordt het aantal dieren gedetailleerd verantwoord.</p> <p>Door het gebruik van computermodellen voor bepaling van het PK profiel en de exposure-respons relatie, zijn – op basis van jarenlange eigen ervaring en gepubliceerde literatuur – minimaal 2 dieren en maximaal 3 dieren per groep voldoende om met voldoende power de parameters te bepalen. (De uiteindelijke groepsgrootte hangt af van de verwachte inter-individuele variatie.) Vermindering van deze aantallen of vermindering van het aantal datapunten zou leiden tot onvoldoende power.</p>
Verfijning	<p>Voor de <i>in vivo</i> doseringen wordt rekening gehouden met hetgeen bekend is over toxiciteit en/of tolerantie van de middelen, de minimaal toxische dosis of de maximaal getolereerde dosis is de hoogste dosis die <i>in vivo</i> wordt getest voor het bepalen van exposure-response relaties.</p> <p>De geïntroduceerde infectie zal bij de hogere doseringen niet leiden tot een uitgebreide infectie.</p> <p>Dosering van cyclofosfamide via de intraperitoneale route is zo geoptimaliseerd dat ziekte door neutropenie zo minimaal mogelijk is.</p> <p>De ernst van de welzijnsaantasting wordt verder zoveel mogelijk beperkt door het in acht nemen van de humane eindpunten.</p> <p>Door dieren in groepen te huisvesten met gepaste kooiverrijking wordt de proef verder verfijnd.</p> <p>Zo veel als mogelijk is zal het werken met bacteriestammen die ernstig ongerief kunnen veroorzaken vermeden worden. Echter, soms is dit niet mogelijk vanwege de klinische relevantie van deze stammen.</p> <p>In geval het niet mogelijk is 2 verschillende bacteriestammen per muis te gebruiken, worden ook beide dijspieren geïnfecteerd, met dezelfde bacteriestam. Dit levert dan</p>

een duplo binnen een dier op. Er wordt niet gekozen voor het gebruik van extra dieren die dan ieder individueel minder ongerief hebben, door slechts 1 dijspier te infecteren. Een duplo binnen het dier levert meer datapunten op, die waardevolle informatie oplevert.

Proeven waarin het PK profiel wordt bepaald zijn slechts van relatief korte duur, waardoor de ziekte nog niet veel progressie heeft gemaakt.

Voor nieuwe antibiotica, non-antibiotica en voor sommige oude antibiotica geldt dat onbekend is bij welk doseringsschema ze antibacterieel effectief zijn.

Doseringsschema's die niet effectief blijken te zijn, zullen relatief meer ongerief kunnen veroorzaken dan succesvolle schema's. Omdat dit de vraagstelling van het onderzoek is, kan in de keuze van middelen en doseringsschema's, die gemaakt worden op basis van literatuur en verwachtingen, geen verdere verfijning plaatsvinden.

Alles wordt in het werk gesteld om de periode van ernstig ongerief zo kort mogelijk te houden, zoals beschreven in vraag E (humane eindpunten).

Ongerief wordt zo veel mogelijk geminimaliseerd door gebruik van adequate analgetica.

Hoewel we ons realiseren dat een doseringsschema met relatief korte intervallen tussen de dosering ongerief veroorzaakt, is er momenteel geen alternatief. Het gebruik van automatische pompjes (zoals ALZET pompjes) is niet mogelijk vanwege de instabiliteit van de meeste middelen. Daarnaast is dit voor combinaties van middelen – waarbij de doseringsfrequentie van het ene middel wel en het andere middel niet wordt gevarieerd – niet mogelijk. Middelen worden indien mogelijk wel gemengd in de spuit, zodat per dosismoment maar een keer toegediend hoeft te worden.

Zijn er nadelige milieueffecten te verwachten?

Nee

Ja > Benoem de te verwachten milieueffecten en geef aan welke maatregelen zijn genomen om deze tot een minimum te beperken.

H. Hergebruik

Worden er dieren ingezet die eerder in een andere dierproef zijn gebruikt?

Nee, ga verder met vraag I.

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico op) ernstig ongerief?

Nee

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

I. Herhaling

Geef voor wettelijk vereist onderzoek aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing, geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

N.v.t., dit betreft geen wettelijk vereist onderzoek.

J. Plaats waar de dierproef wordt uitgevoerd

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder Wod valt?

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

K. Bestemming van de dieren bij einde experiment

Worden de dieren gedood?

Nee > Beschrijf de bestemming van de dieren.

Ja > Geef aan waarom de dieren worden gedood.

Aan het eind van de proef worden de dieren geëuthanaseerd voor het verzamelen van bloed, dijspieren en relevante organen en het verrichten van BAL. Uit deze materialen wordt het optimale bacterieel inoculum en de PK/PD relatie bepaald.

Indien dieren worden gedood, wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van Richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja > Betreft het een dodingsmethode die alleen onder specifieke voorwaarden mag worden toegepast?

Nee > Beschrijf de dodingsmethode

Cervicale dislocatie (onder isofluraan-anesthesie) of CO₂ verstikking.

De onderzoeksgroep is zeer ervaren met deze methode van doden. Het is een snelle methode met kortdurend lijden voor het proefdier. Na nekbreek kan BAL worden uitgevoerd en kunnen dijspieren en relevante organen worden verzameld.

Ja > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Indien dieren worden gedood, maar niet in het kader van de proef, geef aan of herplaatsing is overwogen en waarom hiervan is afgezien.

De dieren worden alleen in het kader van de proeven gedood of om welzijnsproblemen te voorkomen door gebruik van humane eindpunten.



Bijlage

Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u in de 'Toelichting op de te gebruiken formulieren voor de aanvraag van een projectvergunning' op de website www.centralecommissiedierproeven.nl
- Of neem telefonisch contact op (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in. 5.1 lid2h
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in. 5.1 lid2h
- 1.3 Vul het volgnummer en de titel van de dierproef in.
- | Volgnummer | Titel dierproef |
|------------|-----------------|
| 2 | Longmodel |

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.3 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

Middelen en combinaties van middelen zullen volgens de gestandaardiseerde aanpak van het PK/PD onderzoek worden bestudeerd, in het dijspier- en/of het longmodel. In deze modellen wordt gebruik gemaakt van neutropene muizen, zoals ook in de richtlijnen van het EMA beschreven. Deze bijlage beschrijft het longmodel.

In de studies wordt met neutropene muizen gewerkt omdat de meeste pathogenen voor de mens – zoals *Pseudomonas aeruginosa* – niet pathogeen zijn voor de immuuncompetente muis. Het gebruik van een immuuncompetente muis geeft daarom een grote overschatting van het effect dat het middel bij de mens zou hebben. Daarnaast is ook de primaire vraag: wat is het effect van het middel zonder interferentie van een immuunsysteem?

Wanneer gewerkt gaat worden met nog niet eerder door de onderzoeksgroep gebruikte klinisch relevante bacteriestammen, zal het bestaande en in de literatuur uitgebreid beschreven longmodel voor deze stammen worden aangepast. De onderzoeksgroep heeft veel ervaring met een ruim aantal species, waaronder *Escherichia coli* en *Klebsiella pneumoniae*. Voor deze species is bekend dat een standaard inoculum leidt tot een reproduceerbare infectie. Voor een aantal andere species, zoals *Pseudomonas aeruginosa* en *Acinetobacter baumannii*, is bekend dat het geschikte inoculum voor een reproduceerbare infectie stam-afhankelijk is.

Fase 1. Aanpassen van de bestaande modellen

Indien nodig wordt het bestaande longmodel aangepast voor klinisch relevante bacteriestammen. Er zal bepaald worden welk inoculum leidt tot een reproduceerbare infectie.

Primaire uitkomstparameter: het ontstaan van een reproduceerbare infectie, waarbij de inter-individuele variatie beperkt is, waarbij de bacteriële load voldoende hoog is, maar die niet leidt tot ernstige sepsis.

GO: Wanneer een bacteriestam leidt tot een reproduceerbare infectie, zal verder gewerkt worden met deze stam.

Na deze aanpassing zal gestart worden met het daadwerkelijke PK/PD onderzoek.

Voor geheel nieuwe middelen zal gestart worden met fase 2. Voor alle andere middelen zal gestart worden met fase 3.

In alle gevallen gelden onderstaande entrée criteria voor fase 2 (nieuwe middelen) respectievelijk fase 3 (bestaande middelen):

- De geselecteerde bacteriespecies en antibioticum(combina ie) zijn relevant voor de verbetering van behandeling van klinisch relevante infecties die moeilijk behandelbaar zijn met de nu geregistreerde antibiotica in de toegepaste doseringsschema's.
- Uit *in vitro* onderzoek moet blijken dat het middel of het middel gecombineerd met een antibioticum activiteit vertoont tegen de geselecteerde bacterie, en
- Toxiciteits- en/of tolerantiegegevens moeten beschikbaar zijn.
- De uitkomst van deze studie moet richtinggevend zijn voor (latere) klinische vervolgstudies.

Fase 2. Screening op vroege bacteriedodende activiteit

Alleen voor geheel nieuwe middelen waarvan nog geen informatie is over de aanwezigheid van *in vivo* activiteit/effectiviteit worden screeningsexperimenten uitgevoerd naar de vroege bacteriedodende activiteit. Neutropene, geïnfecteerde muizen worden behandeld met het middel, per os of parenteraal, de route die het meest passend is op basis van verwachtingen aan de hand van bijvoorbeeld de structuur of antibioticum-klasse (meestal SC, IM, IV, IP of soms per maagsonde). Daarbij wordt het maximaal toe te dienen volume voor die route in acht genomen (Principles of Laboratory Animal Science revised edition, Van Zutphen 2001, tabel 16-1).

Primaire uitkomstparameter: bacteriële load in de longen in behandelde vs onbehandelde muizen.

GO: Als een nieuw middel:

1. vroege bacteriedodende of bacteriostatische activiteit vertoont, of
2. in combinatie met een ander middel waarschijnlijk bacteriedodende of bacteriostatische activiteit zal vertonen (bijvoorbeeld in geval van een antibioticum gecombineerd met remmers van beta-lactamase enzymen, waarvan de laatste meestal zelf geen activiteit hebben)

dan gaat dit middel door naar de volgende fase.

Door uitvoering van deze proef met een klein aantal dieren wordt een eerste indruk gekregen of het nieuwe middel *in vivo* werkzaam kan zijn. Als dit niet het geval is, hoeven geen uitgebreide PK en PD studies gedaan te worden. Dit voorkomt onnodig gebruik van proefdieren.

Fase 3: Exposure-respons relatie

In deze fase worden het *in vivo* PK profiel en de effectiviteit van middelen (met een vaste doseringsfrequentie of met verschillende doseringsfrequenties) bepaald en aan elkaar gerelateerd. De volgorde van deze experimenten is afhankelijk van de beschikbare informatie uit literatuur, eerder verkregen data en/of data beschikbaar van partners. Wanneer er bijvoorbeeld al concrete aanwijzingen zijn over het PK profiel van een middel, dan zal eerst naar de effectiviteit van het middel gekeken worden, en later alsnog naar het PK profiel (in hetzelfde proefdiermodel). Wanneer er al duidelijkheid is over de meest geschikte doseringsfrequentie van het middel, dan zal een dosis-fractioneringsstudie (met verschillende doseringsfrequenties van het middel) minder prioriteit hebben, en pas na bepaling van het PK profiel en de effectiviteit (met een vaste doseringsfrequentie van het middel) worden geconfirmeerd.

Na elke studie binnen deze fase volgt een GO/NO GO moment waarop bepaald wordt of het zinvol is om door te gaan met de andere studies in deze fase, of naar de volgende fase. De GO/NO GO-criteria zijn onderstaand per studie vermeld.

Studie A: Bepaling van het *in vivo* PK profiel

Voor alle (combinaties van) middelen wordt het PK profiel (concentraties van het middel in de tijd bij verschillende doses) bepaald. Neutropene, geïnfecteerde muizen worden  enmalig (of, in specifieke situaties, meerdere malen, maximaal 3 keer) behandeld, waarna op verschillende tijdstippen de muizen worden gedood om het concentratieverloop van het middel te bepalen.

Primaire uitkomstparameter: concentratie van het middel in de loop van de tijd.

GO: Verdere studies met dit middel worden alleen uitgevoerd als de PK studie aantoont dat het middel werkzaam zou kunnen zijn, bijvoorbeeld wanneer middelen een veelbelovend concentratiebeloop laten zien, zoals concentraties die lange tijd boven de minimaal remmende concentratie (MRC) blijven of een gunstige verhouding hebben tussen topspiegel en de MRC.

Op basis van de resultaten van de *in vitro* assays en van het (te verwachten of aangetoonde) PK profiel in het dier worden doseringsschema's gekozen voor studies naar de effectiviteit van middelen.

Studie B: Bepaling van de effectiviteit van middelen – en daarmee met behulp van het PK profiel expositie – als mono-behandeling

De exposure-respons relatie van de (combinatie van) middelen wordt bepaald. Hiervoor wordt de effectiviteit van de middelen als mono-behandeling bepaald. Neutropene, geïnfecteerde muizen worden behandeld met verschillende doseringsschema's met een vaste doseringsfrequentie.

Primaire uitkomstparameter: bacteriële load in de longen in behandelde vs onbehandelde muizen, en daarmee de bacteriostatische dosis (dosis waarbij geen uitgroei van de bacterie plaatsvindt) van het middel als mono-behandeling.

GO: Als een middel:

1. bacteriedodende of bacteriostatische activiteit vertoont, of
2. in combinatie met een ander middel waarschijnlijk bacteriedodende of bacteriostatische activiteit zal vertonen (bijvoorbeeld in geval van een antibioticum gecombineerd met remmers van beta-lactamase enzymen, waarvan de laatste meestal zelf geen activiteit hebben)

dan wordt verder gewerkt met dit middel.

Studie C: Dosis-fractioneringsstudie

De exposure-respons relatie van de (combinatie van) middelen wordt verder onderzocht. Hiervoor wordt een dosis-fractioneringsstudie uitgevoerd. Neutropene, geïnfecteerde muizen worden behandeld met verschillende doseringsschema's met verschillende doseringsfrequenties van een middel of combinatie van middelen.

Primaire uitkomstparameter: bacteriële load in de longen in behandelde vs onbehandelde muizen, en daarmee bepaling van de PK/PD index die de exposure-respons relatie het beste beschrijft.

GO: Als een middel:

1. bacteriedodende of bacteriostatische activiteit vertoont, of
2. in combinatie met een ander middel waarschijnlijk bacteriedodende of bacteriostatische activiteit zal vertonen (bijvoorbeeld in geval van een antibioticum gecombineerd met remmers van beta-lactamase enzymen, waarvan de laatste meestal zelf geen activiteit hebben)

dan wordt verder gewerkt met dit middel.

Fase 4: Validatie van de PK/PD voor de bepaling van de farmacodynamische target en de variatie daarin tussen stammen ter ondersteuning van breekpunt bepaling

Na deze fase 3-studies wordt de waarde van de PK/PD index gevalideerd voor een aantal andere bacteriestammen. Ook wordt in deze fase gekeken naar de variatie tussen stammen.

Het klinisch breekpunt is de grenswaarde van de MRC (Minimaal Remmende Concentratie) die medisch microbiologische laboratoria gebruiken om aan te geven of een bacterie gevoelig of resistent is voor een middel. De behandelende arts gebruikt dit om te beoordelen of een middel juist wel of juist niet aan een patiënt kan of moet worden voorgeschreven. Het is belangrijk dat de PD target van een middel daarom bepaald wordt op basis van studies met een voldoende uitgebreid panel aan relevante bacteriestammen voor dit middel, die het gehele klinische spectrum – van gevoelig naar ongevoelig/resistent, met of zonder resistentiemechanismen – vertegenwoordigen.

Primaire uitkomstparameter: bacteriële load in de longen in behandelde vs onbehandelde muizen, en daarmee validatie van de PK/PD index en bepaling van de PD target.

Fase 5: Effect van verschillende doseringsverhoudingen van twee middelen

Deze fase wordt alleen uitgevoerd voor combinaties van middelen. Er wordt een *in vivo* checkerboard experiment uitgevoerd. Neutropene, geïnfecteerde muizen worden behandeld met verschillende doseringsverhoudingen van twee middelen.

Primaire uitkomstparameter: bacteriële load in de longen in behandelde vs onbehandelde muizen, en daarmee het effect van verschillende doseringsverhoudingen van twee middelen.

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

In alle proeven zal infectie worden aangebracht onder adequate anesthesie. Ongerief wordt zo veel mogelijk geminimaliseerd door gebruik van adequate analgetica. Alle dieren in alle experimenten zullen deze analgesie ontvangen. Euthanasie zal plaatsvinden onder adequate anesthesie. Ongerief wordt gedurende het experiment geregistreerd op een score sheet, waarbij de humane eindpunt criteria worden meegenomen. Hiervoor worden de muizen gewogen (dag -4, dag -1, na infectie wanneer daar aanleiding toe is) en temperatuur (infrarood thermometer) wordt gemeten (na infectie wanneer daar aanleiding toe is). Gedurende alle studies worden de muizen nauwkeurig gemonitord, ten minste elke 8 uur. Wanneer het klinisch beeld daartoe aanleiding geeft zal deze frequentie worden verhoogd. Studies worden alleen uitgevoerd op werkdagen, zodat overdag monitoren eenvoudig is. Het moment van infectie wordt zodanig

gekozen dat de 'kritische periode' waarin muizen een klinisch beeld kunnen gaan vertonen zo veel mogelijk overdag (vroeg ochtend tot vroeg avond, waarbij onderzoekers aanwezig zijn) valt.

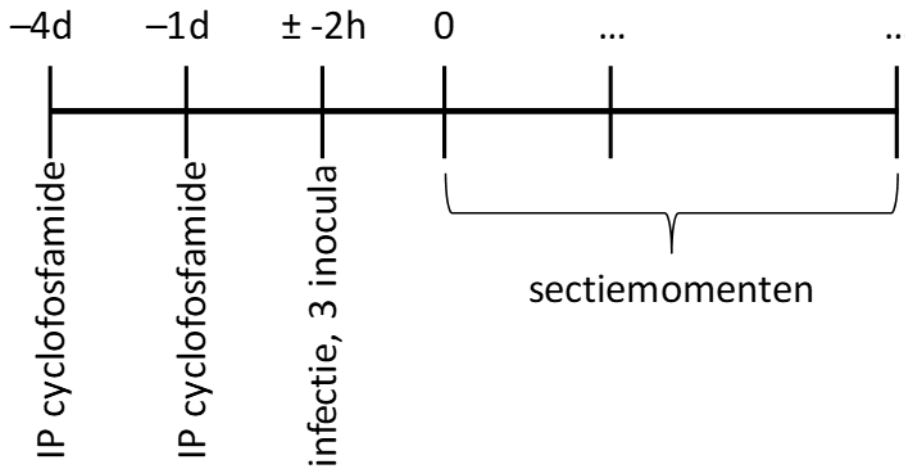
Muizen worden neutropeen gemaakt door voorbehandeling met cyclofosfamide (IP op dag -4 en dag -1 voor infectie).

Op dag 0 worden de muizen IN geïnfecteerd in de longen, 1 bacteriestam per muis.

Fase 1: Aanpassen van de bestaande modellen

Op dag 0 worden de neutropene muizen onder narcose geïnfecteerd in de longen met een van de drie bacteriële inocula. Op het moment dat normaliter behandeling wordt gestart (2 uur na infectie), op het moment dat normaliter behandeling wordt beëindigd (meestal 24 uur na start behandeling), en op een tussenliggend tijdstip (afhankelijk van de bacteriestam) worden groepen dieren gedood voor bepaling van de bacteriële load in de longen. Het inoculum dat leidt tot een reproduceerbare infectie wordt gekozen voor vervolgonderzoek.

Deze experimenten duren in het algemeen maximaal 26 uur (Figuur 1). In een beperkt aantal experimenten zal zo nodig ook na 48 en/of 72 uur een verificatie plaatsvinden. Dit kan bijvoorbeeld het geval zijn wanneer de bacteriestam minder snel dan verwacht blijkt te groeien.



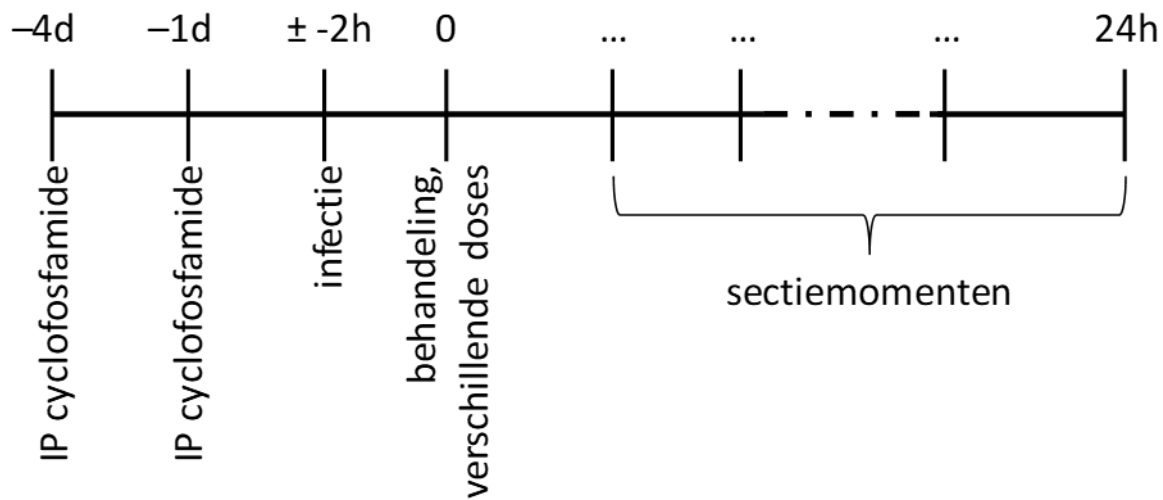
Figuur 1. Algemene opzet van 'Fase 1: Aanpassen van de bestaande modellen'.

Fase 2: Screening op vroege bacteriedodende activiteit

Neutropene, geïnfecteerde dieren worden éénmalig behandeld, dosisgroepen van enkele dieren met verschillende doses van het middel (maximaal 8). Behandeling met het middel is per os of parenteraal, de route die het meest passend is (meestal SC, IM, IV, IP of soms per maagsonde). Daarbij wordt het maximaal toe te dienen volume voor die route in acht genomen (Principles of Laboratory Animal Science revised edition, Van Zutphen 2001, tabel 16-1).

Enkele uren na deze toediening wordt op verschillende tijdstippen (maximaal 8) sectie verricht op de dieren om de vroege bacteriedodende activiteit te bepalen (Figuur 2).

Deze studies duren maximaal 26 uur (na start behandeling).



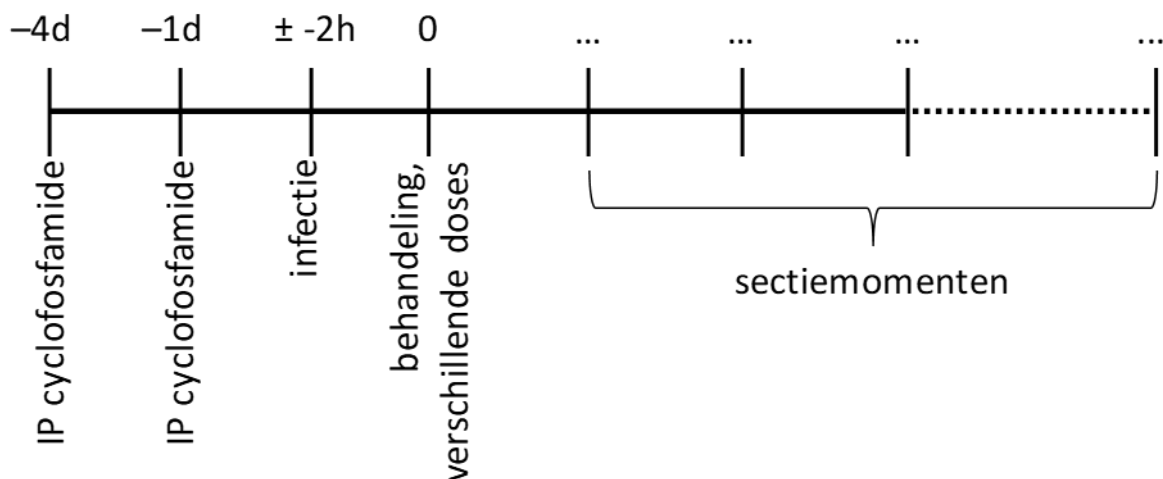
Figuur 2. Algemene opzet van 'Fase 2: Screening op vroege bacteriedodende activiteit'.

Fase 3: Exposure-respons relatie

Studie A: Bepaling van het *in vivo* PK profiel

Neutropene, geïnfecteerde dieren worden éénmalig (of, in specifieke situaties zoals zeer korte halfwaardetijd, meerdere malen, maximaal 3 keer) behandeld, verschillende dosisgroepen met verschillende doses van het middel (hoogste dosis niet hoger dan de drempelwaarde voor toxiciteit, maximaal 8 dosisgroepen). Op verschillende tijdstippen (maximaal 12) na de behandeling worden dieren gedood voor sectie om het concentratieverloop van het middel (PK profiel) in bloed en epithelial lining fluid (ELF) te bepalen (Figuur 3). Wanneer voor concentratie-bepaling van een middel kan worden volstaan met een kleine hoeveelheid plasma, dan wordt ook tijdens het experiment bloed afgenomen bij de muizen, waarbij het aantal sectie-momenten gereduceerd kan worden.

Deze studies duren over het algemeen niet langer dan 48 uur, maar in uitzonderlijke gevallen, bijvoorbeeld als de halfwaardetijd van het middel uitzonderlijk lang is, maximaal 7 dagen (na start behandeling).

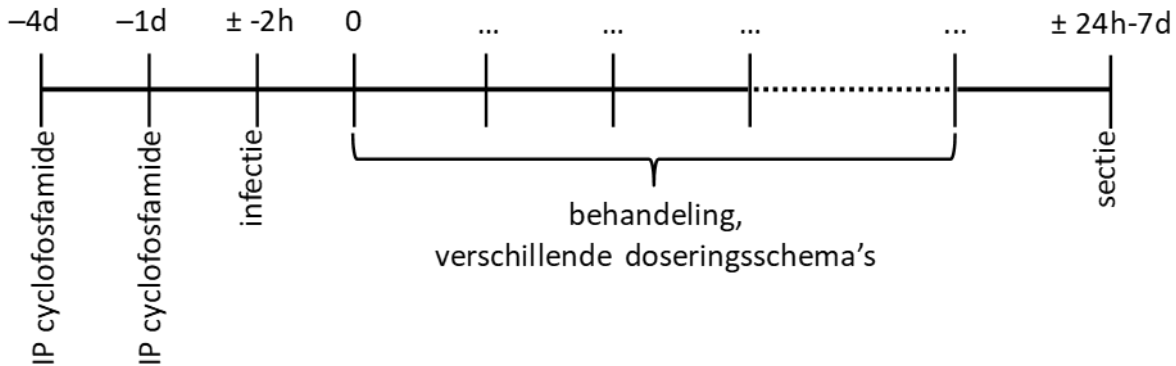


Figuur 3. Algemene opzet van 'Fase 3: Exposure-respons relatie. Studie A: Bepaling van het *in vivo* PK profiel'.

Studie B: Bepaling van de effectiviteit van middelen – en daarmee met behulp van het PK profiel expositie – als mono-behandeling

Neutropene, geïnfecteerde dieren (infectie door maximaal 8 bacteriestammen met verschillende gevoeligheden ofwel MRC's) worden behandeld met het middel als mono-behandeling gedurende 24 uur of maximaal 7 dagen. Er worden verschillende doses (maximaal 6) van het middel onderzocht (Figuur 4).

Deze studies duren meestal 24 uur en maximaal 7 dagen (na start behandeling). Het doseringsschema voor herhaalde toedieningen is mede afhankelijk van de verwachte halfwaardetijd van het middel en bedraagt maximaal 18 toedieningen per maximaal 7 dagen.

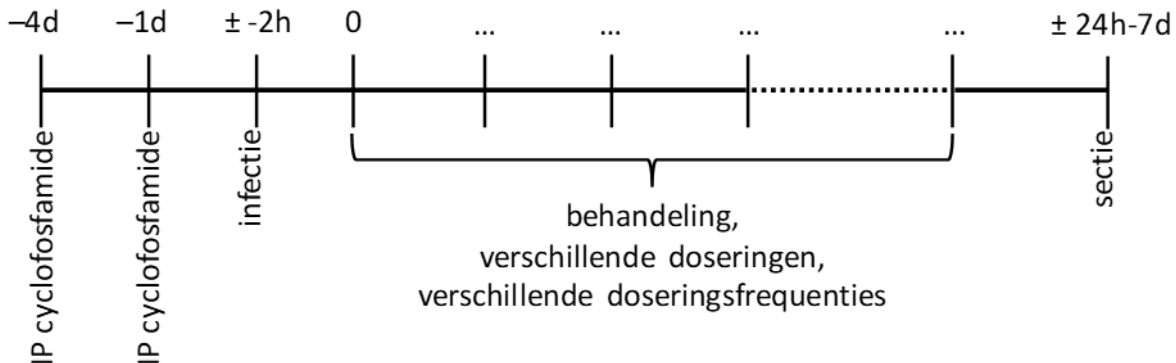


Figuur 4. Algemene opzet van 'Fase 3: Exposure-respons relatie. Studie B: Bepaling van de effectiviteit van middelen – en daarmee met behulp van het PK profiel expositie – als mono-behandeling'.

Studie C: Dosis-fractioneringsstudie

Neutropene, geïnfecteerde dieren (infectie door maximaal 4 verschillende bacteriestammen met verschillende gevoeligheden) worden behandeld met een (combinatie van) middelen waarbij de doseringsfrequentie varieert, maximaal 18 of 20 verschillende doseringsschema's, voor mono-respectievelijk combinatie-behandeling (Figuur 5).

Deze studies duren meestal 24 uur en maximaal 7 dagen (na start behandeling). Het doseringsschema voor herhaalde toedieningen is mede afhankelijk van de verwachte halfwaardetijd van het middel en bedraagt maximaal 18 toedieningen per maximaal 7 dagen.



Figuur 5. Algemene opzet van 'Fase 3: Exposure-respons relatie. Studie C: Dosis-fractioneringsstudie' en van 'Fase 4: Validatie van de PK/PD voor de bepaling van de farmacodynamische target en de variatie daarin tussen stammen ter ondersteuning van breekpunt bepaling'.

Fase 4: Validatie van de PK/PD voor de bepaling van de farmacodynamische target en de variatie daarin tussen stammen ter ondersteuning van breekpunt bepaling

Deze proef is in opzet hetzelfde als studie C (fase 3), maar wordt gedaan met andere bacteriestammen (maximaal 6), om zo te verifiëren of de waarde van de PK/PD index gevonden in fase 2 ook geldig is bij andere bacteriestammen met andere gevoeligheden en andere resistentiemechanismen (Figuur 5). Er worden maximaal 12 verschillende doseringsschema's bestudeerd.

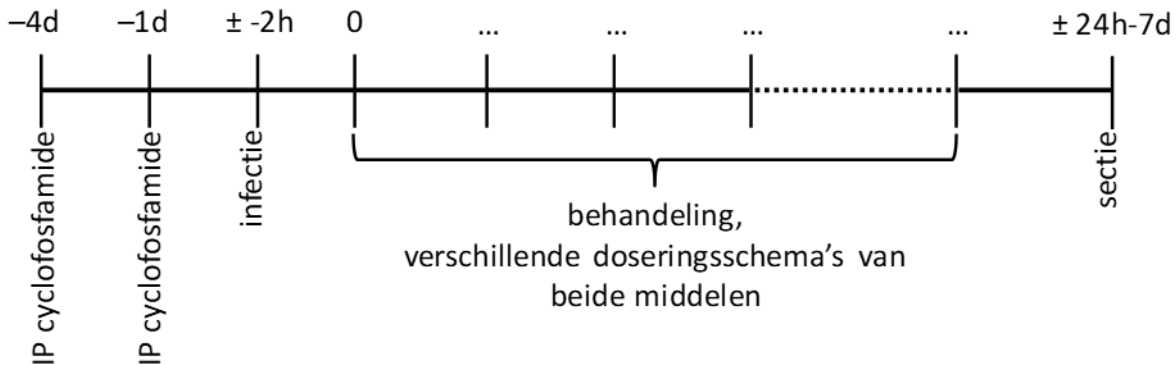
Deze studies duren meestal 24 uur en maximaal 7 dagen (na start behandeling). Het doseringsschema voor herhaalde toedieningen is mede afhankelijk van de verwachte halfwaardetijd van het middel en bedraagt maximaal 18 toedieningen per maximaal 7 dagen.

Fase 5: Effect van verschillende doseringsverhoudingen van twee middelen

In deze proef wordt een *in vivo* checkerboard assay gedaan, met verschillende doseringsschema's (maximaal 6) voor beide middelen (in totaal dus maximaal 6x6 doseringsschema's), voor verschillende bacteriestammen (maximaal 2). Verschil met de eerdere dosisfractioneringsstudies is dat in deze fase de

doseringschema's van beide middelen variëren, met juist hoge of lage concentraties van een van de middelen. Resultaten worden vergeleken met die van de *in vitro* checkerboard assays (Figuur 6).

Deze studies duren meestal 24 uur en maximaal 7 dagen (na start behandeling). Het doseringschema voor herhaalde toedieningen is mede afhankelijk van de verwachte halfwaardetijd van de middelen en bedraagt maximaal 18 toedieningen per maximaal 7 dagen.



Figuur 6. Algemene opzet van 'Fase 5: Effect van verschillende doseringsverhoudingen van twee middelen'.

Geef aan welke overwegingen en statistische methoden worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken.

Voor het modelleren van het PK profiel zijn plasma- en ELF-concentraties nodig in de tijd. Uit jarenlange eigen ervaring en gepubliceerde literatuur is gebleken dat het PK profiel gemodelleerd kan worden op basis van minimaal 2-3 dieren per tijdstip. (Het precieze aantal dieren hangt af van de te verwachten inter-individuele variatie in de concentraties van de middelen.) Het aantal tijdstipen per dosis en de exacte tijdstipen wordt gebaseerd op het aantal vrijheidsgraden van de modelcurve en de te verwachten kinetiek van het middel en mogelijke te verwachten interacties. Dit zal per middel verschillen.

Voor het modelleren van de exposure-respons relatie wordt een E_{max} -model gebruikt met variabele helling (slope). Het benodigde aantal datapunten wordt gebaseerd op het aantal vrijheidsgraden (4 bij het E_{max} -model) en de te verwachten respons curve. Voor een goede curve fit zijn op basis hiervan minimaal 5 datapunten (dus 5 doseringsschema's) nodig (aantal vrijheidsgraden + 1): 1 datapunt op het maximale effect, 1 punt op het minimale effect en 3 punten voor het beschrijven van de helling. Echter, van tevoren is niet precies bekend bij welk doseringsschema het maximum of minimum effect optreedt. Er wordt daarom standaard bij 6 schema's gemeten. Dit is een balans tussen enerzijds te vaak een proef te moeten herhalen omdat er geen goede curvedescriptie kan worden bepaald (de punten op de effectcurve liggen te veel naar links of naar rechts ten opzichte van de EC50 en/of het bacteriostatische effect) en anderzijds standaard heel veel punten meten waarbij onnodig veel dieren worden gebruikt. Vanwege de biologische variatie in expositie en respons bij de individuele dieren moet elk datapunt in duplo of in triplo (afhankelijk van de te verwachten inter-individuele variatie) worden uitgevoerd. Daarnaast zijn per middel (of combinatie) infectiecontroles, groei-controles en comparator-antibioticum controles (behandeld met een middel waarvan het effect bekend is) nodig en single drug controles bij proeven met combinaties van middelen.

Voor de aanvang van de proef wordt de proefopzet in detail voorgelegd aan de IvD.

B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, levensstadia, geschatte aantallen per levensstadium, geslacht, genetische wijzigingen en, indien van belang voor het behalen van de doelstelling, de te gebruiken stam.

Volgnr.	Diersoort	Herkomst	Levensstadium	Aantal	Geslacht	Genetisch gewijzigd	Stam
1	Mus Musculus	Dieren gefokt voor onderzoek	Jong volwassen	9010	vrouwelijk	NVT	Bij voorkeur worden CD-1

							muizen gebruikt.
Onderbouw de bovengenoemde keuzes.							
Diersoort	<p>Standaardisatie van het model is belangrijk om resultaten onderling te kunnen vergelijken. In het longmodel dat in de literatuur beschreven is, wordt gebruik gemaakt van muizen. Er is een directe correlatie tussen de PK/PD indexen in muizen en mensen voor verschillende antibiotica.</p>						
Herkomst	<p>Standaardisatie, ook van de microbiologische status van het gebruikte proefdier, is belangrijk om resultaten onderling te kunnen vergelijken. De normale flora van de muis kan invloed hebben op het beloop van de infectie. Door muizen te betrekken van een geregistreerde proefdierleverancier wordt deze flora zo veel mogelijk gestandaardiseerd.</p>						
Levensstadia	<p>In het longmodel dat in de literatuur beschreven is, wordt gebruik gemaakt van jong volwassen (5-10 weken) muizen. Deze standaardisatie is belangrijk om resultaten onderling te kunnen vergelijken.</p>						
Aantal	<p>Fase 1-proeven moeten eenmalig worden uitgevoerd; als de modellen zijn aangepast dan kunnen (combinaties van) middelen getest worden in de fases 2-5.</p> <p>Het aantal te testen (combinaties van) middelen zal enerzijds afhangen van (combinaties van) middelen met potentie uit eigen <i>in vitro</i> onderzoek in het kader van wetenschappelijke onderzoeksprojecten en anderzijds van de interesse vanuit de farmaceutische industrie. Dit aantal is daarom niet geheel nauwkeurig in te schatten. Op basis van ervaring in de afgelopen jaren schatten we in dat we per 5 jaar maximaal 10 middelen als mono-behandeling en 5 combinaties van middelen gaan testen, waarvan een deel al in een vroeg stadium van het onderzoek zal afvallen ten gevolge van de GO/NO GO-criteria.</p> <p>Het totaal aantal dieren dat nodig zal zijn in 5 jaar hangt af van het succes van de (combinaties van) middelen. Wanneer een middel of combinatie in eerste proeven blijkt geen potentie te hebben om <i>in vivo</i> werkzaam te zijn, dan wordt dit middel niet verder <i>in vivo</i> onderzocht en wordt slechts een beperkt aantal dieren gebruikt. Wanneer een middel (of combinatie) wel succesvol is, dan worden alle proeven beschreven in fases 2-4 (voor mono-behandeling) of 2-5 (voor combinatie-behandeling) uitgevoerd. Dan zijn logischerwijs ook meer dieren nodig.</p> <p>In onderstaande berekeningen wordt uitgegaan van maximale aantallen. Wanneer de variatie binnen de groep naar verwachting kleiner is, dan kan worden volstaan met 2 dieren per groep, een kleiner aantal bacteriestammen en/of tijdstippen. Wanneer al enige informatie beschikbaar is over het doseringsschema (dosis en/of frequentie), dan kan in die gevallen eventueel worden volstaan met een beperkter aantal doseringsschema's. Voor de combinatie-behandelingen is uitgegaan van twee middelen die beide nog niet getest zijn als mono-behandeling. Uiteraard zullen er ook combinaties onderzocht worden van middelen waarvan we zelf (in eerder onderzoek of in het huidige project) het effect van mono-behandeling hebben onderzocht. In dat geval worden deze experimenten uiteraard niet herhaald, en wordt deze data gebruikt als input voor de experimenten met de combinatie. Er kan dan volstaan worden met een kleiner aantal groepen.</p> <p><u>Fase 1: Aanpassen van de bestaande modellen</u></p> <p>In geval gewerkt gaat worden met bacteriestammen waarmee de onderzoeksgroep nog geen ervaring heeft, zal het bestaande model voor deze stam worden aangepast. Dit wordt gedaan voor maximaal 10 bacteriestammen. Muizen worden geïnfecteerd met 3 verschillende inocula. Op 3 verschillende momenten wordt sectie verricht op de muizen om te zien of er een reproduceerbare infectie ontstaat. In verband met biologische variatie zullen 3 muizen per groep worden gebruikt. Daarnaast zal ook vaak een groep van 3 muizen worden behandeld met een controle-antibioticum ("comparator-drug") waarvan bekend is dat dit effectief zal zijn <i>in vivo</i>, om aan te tonen dat de infectie behandelbaar is. Voor maximaal 10 bacteriestammen zal op 3 verschillende sectiemomenten bij 3 verschillende inocula de bacteriële load in de longen worden bepaald en onderling vergeleken. Het aantal bacteriestammen dat zal worden bestudeerd hangt af van het aantal stammen waarvoor het bestaande model geoptimaliseerd moet worden. De 3 inocula zijn het 'standaard' inoculum, en 2 inocula daar omheen. De 3 sectiemomenten zijn</p>						

het moment dat normaliter behandeling wordt gestart (2 uur na infectie), op het moment dat normaliter behandeling wordt beëindigd (meestal 24 uur na start behandeling), en op een tussenliggend tijdstip.

Voor deze proef zijn 540 muizen nodig:

10 bacteriestammen x 3 inocula x 3 sectiemomenten x (3 onbehandelde muizen + 3 controle-antibioticum controles)

Voor (succesvolle) middelen zijn de volgende proeven noodzakelijk:

Fase 2: Screening op vroege bacteriedodende activiteit

Voor nieuwe middelen wordt op vroege bacteriedodende activiteit gescreend voor maximaal 4 relevante bacteriestammen met verschillende gevoeligheden (om de variatie tussen stammen te bestuderen, aantal afhankelijk van het onderzochte middel), bij maximaal 8 verschillende doses en/of sectiemomenten (keuze voor meerdere doses en/of meerdere sectiemomenten afhankelijk van verwachting over de effectieve dosis en killingsnelheid), voor elke dosis 2 muizen (1 muis in onvoldoende i.v.m. biologische variatie, meer dan 2 is onnodig omdat het hier een screening betreft) en 6 controles (2 infectiecontroles waarop sectie wordt verricht bij start behandeling, 2 placebo-behandelde groeiconroles en 2 muizen behandeld met een comparator-antibioticum). (Een comparator-antibioticum is vooral van belang om het effect van voornamelijk nieuwe middelen te vergelijken met dat van een bestaand antibioticum.)

Voor maximaal 4 bacteriestammen wordt bij maximaal 8 verschillende doses en/of sectiemomenten de bacteriële load in de longen in behandelde muizen vergeleken met onbehandelde muizen. Het aantal bacteriestammen hangt af van de breedte van de MRC-verdeling. Van nature is de spreiding tussen de MRC's van de ene bacteriesoort groter dan van de andere, voor een middel. Wanneer die spreiding groot is (zoals bij *E. coli* en cefuroxim; 0.008-8 mg/l; 11 dilutiestappen tussen de laagste en de hoogste MRC), dan zullen 4 bacteriestammen nodig zijn, terwijl bij een kleinere spreiding (zoals bij *E. coli* en meropenem; 0.008-0.06 mg/l; 4 dilutiestappen tussen de laagste en de hoogste MRC) kan soms worden volstaan met minder dan 4 bacteriestammen. De keuze voor doses en/of sectiemomenten hangt af van de verwachte effectieve dosis en killingsnelheid. Bij een verwachte grote killingsnelheid zullen bijvoorbeeld 4 doses en 2 sectiemomenten per dosis worden bestudeerd, bij verwachte lage killingsnelheid bijvoorbeeld 2 doses en 4 sectiemomenten per dosis.

Voor mono-behandeling zijn 88 muizen nodig:

4 bacteriestammen x 8 (doses en/of sectiemomenten) x 2 muizen per groep
+
4 bacteriestammen x (2 infectiecontroles + 2 groeiconroles + 2 comparator-antibioticum controles)

Voor 10 middelen als mono-behandeling zijn theoretisch $10 \times 88 = 880$ muizen nodig.

Voor combinatie-behandeling zijn 88 muizen nodig:

Nieuwe middelen worden in het algemeen gecombineerd met bestaande middelen. Voor het bestaande middel zijn deze screeningsexperimenten niet nodig, wel voor het nieuwe middel.

4 bacteriestammen x 8 (doses en/of sectiemomenten) x 2 muizen per groep
+
4 bacteriestammen x (2 infectiecontroles + 2 groeiconroles + 2 comparator-antibioticum controles)

Voor 5 combinaties van middelen zijn theoretisch $5 \times 88 = 440$ muizen nodig.

Fase 3: Exposure-respons relatie; Studie A: Bepaling van het *in vivo* PK profiel

Voor het modelleren van het PK profiel van een middel of combinatie van middelen zijn plasma- en ELF-concentraties van de middelen nodig op voldoende tijdstippen (maximaal 12 voor het maken van een volledige PK curve) bij voldoende verschillende doses (meestal

6-8, maximaal 8 voor het maken van een volledige PK curve) in triplo (1 sample is onvoldoende i.v.m. biologische variatie, 2 samples kan voldoende zijn wanneer de verwachte biologische variatie beperkt is, meer dan 3 is onnodig omdat een hele PK-curve wordt gecreëerd). Tijdstpunten worden gekozen aan de hand van beschikbare data over PK en PD in literatuur en/of uit eigen eerdere studies, en/of aan de hand van data van vergelijkbare middelen (bijvoorbeeld dezelfde antibioticum-klasse). Dit wordt gedaan voor 1 bacteriestam (het gaat erom dat de muis geïnfecteerd is; de verwachte verschillen in PK profiel tussen muizen geïnfecteerd met verschillende stammen is minimaal). Het concentratie-verloop van het middel in de tijd wordt bepaald. Uit ervaring weten we dat 12 tijdstpunten hiervoor voldoende zijn. Soms kan ook volstaan worden met minder tijdstpunten, wanneer bijvoorbeeld bekend is dat een middel snel uit het lichaam geklaard wordt en de concentraties snel onder de detectielimiet zullen komen. Het concentratie-verloop van maximaal 8 verschillende doses wordt bepaald. Dit aantal en de hoogte van de doses hangt af van de (verwachte) klinisch haalbare concentraties van het middel.

Voor mono-behandeling zijn 294 muizen nodig:

(1 bacteriestam x 12 tijdstpunten x 8 doses x maximaal 3 muizen per groep)
+
(1 bacteriestam x (3 infectiecontroles + 3 groeiconroles))

Voor 10 middelen als mono-behandeling zijn theoretisch $10 \times 294 = 2.940$ muizen nodig.

Voor combinatie-behandeling zijn 588 muizen nodig:

2 middelen x 294 muizen per middel

Voor 5 combinaties van middelen zijn theoretisch $5 \times 588 = 2.940$ muizen nodig.

Fase 3: Exposure-respons relatie; Studie B: Bepaling van de effectiviteit van middelen – en daarmee met behulp van het PK profiel expositie – als mono-behandeling

Dit wordt gedaan voor maximaal 8 bacteriestammen met verschillende gevoeligheden (2 bacteriespecies, 4 stammen per species met goede, slechte en gemiddelde gevoeligheid, om inzicht te krijgen in de variatie tussen en binnen species, aantal afhankelijk van het onderzochte middel), bij 6 verschillende doses (4 vrijheidsgraden, dus minimaal $4+1=5$ doses; om te voorkomen dat een experiment herhaald moet worden, worden 6 doses gekozen), voor elke dosis maximaal 3 muizen en 9 controles (3 infectiecontroles, 3 groeiconroles, 3 comparator-antibioticum controles).

Voor maximaal 8 bacteriestammen wordt bij 6 verschillende doses de bacteriële load in de longen in behandelde muizen vergeleken met onbehandelde muizen. Het aantal bacteriestammen hangt af van de breedte van de MRC-verdeling (zie uitleg bij fase 2). Het aantal doses hangt af van het aantal vrijheidsgraden (4 bij het E_{max} -model). De hoogte van de doseringen zijn afhankelijk van het middel en het verwachte minimale en maximale effect.

Voor mono-behandeling zijn 216 muizen nodig:

(8 bacteriestammen x 6 doses x 3 muizen per groep)
+
(8 bacteriestammen x (3 infectiecontroles + 3 groeiconroles + 3 comparator-antibioticum controles))

Voor 10 middelen als mono-behandeling zijn theoretisch $10 \times 216 = 2.160$ muizen nodig.

Voor combinatie-behandeling zijn 432 muizen nodig:

2 middelen x 216 muizen per middel

Voor 5 combinaties van middelen zijn theoretisch $5 \times 432 = 2.160$ muizen nodig.

Fase 3: Exposure-respons relatie; Studie C: Dosis-fractioneringsstudie

Dit wordt gedaan voor 2 tot maximaal 4 (vaak andere dan in studie B gebruikte, aantal afhankelijk van het onderzochte middel) bacteriestammen met verschillende gevoeligheden (geeft inzicht in de variatie tussen stammen; eenzelfde hoeveelheid stammen als in studie B is niet nodig omdat de focus in dit experiment op de doseringsschema's ligt), in maximaal 18 (mono-behandeling) of 20 (combinatie-behandeling) verschillende doseringsschema's (verschillende doses in verschillende toedieningsfrequenties), voor elk schema maximaal 3 muizen en voor de hele proef maximaal 9 controles (3 infectiecontroles, 3 groei-controles, 3 comparator-antibioticum controles). Bij combinatie-experimenten zijn bovendien maximaal 6 single-drug controles (3 single-drug controles van het ene en 3 van het andere middel) per combinatie van middelen. Voor maximaal 4 bacteriestammen wordt bij maximaal 18 (mono-behandeling) of 20 (combinatie-behandeling) doseringsschema's de bacteriële load in de longen in behandelde muizen vergeleken met onbehandelde muizen. Het aantal bacteriestammen hangt af van de breedte van de MRC-verdeling (zie uitleg bij fase 2). Het aantal doseringsschema's bij mono-behandeling (maximaal 18; bijv. 6 doses in 3 frequenties) hangt af van de al beschikbare informatie en/of verwachting over effectieve dosis en toedieningsfrequentie. Bij combinatie-behandeling geldt hetzelfde, maar dan worden maximaal 20 doseringsschema's (bijv. 5 doses van middel A gecombineerd met middel B in 4 frequenties) bestudeerd. De hoogte van de doseringen zijn afhankelijk van het middel en het verwachte minimale en maximale effect.

Voor mono-behandeling zijn 504 muizen nodig:

(8 bacteriestammen x 18 doseringsschema's x 3 muizen per groep)
+
(8 bacteriestammen x (3 infectiecontroles + 3 groei-controles + 3 comparator-antibioticum controles))

Voor 10 middelen als mono-behandeling zijn theoretisch $10 \times 504 = 5.040$ muizen nodig.

Voor combinatie-behandeling zijn 600 muizen nodig:

(8 bacteriestammen x 20 doseringsschema's x 3 muizen per groep)
+
(8 bacteriestammen x (3 infectiecontroles + 3 groei-controles + 3 comparator-antibioticum controles))
+
(8 bacteriestammen x (3 single-drug controles middel 1 + 3 single-drug controles middel 2))

Voor 5 combinaties van middelen zijn theoretisch $5 \times 600 = 3.000$ muizen nodig.

Fase 4: Validatie van de PK/PD voor de bepaling van de farmacodynamische target en de variatie daarin tussen stammen ter ondersteuning van breekpunt bepaling

Dit wordt gedaan voor minimaal 4 tot maximaal 6 andere bacteriestammen dan de eerder gebruikte stammen (geeft, gecombineerd met data uit studies B en C, fase 2, een uitgebreid inzicht in de variatie tussen stammen, bij verschillende doseringsschema's; aantal afhankelijk van het onderzochte middel), in 12 verschillende doseringsschema's (bijv. 3 schema's voor het ene en 4 schema's voor het andere middel; gekozen wordt voor de meest belovende schema's uit studie B voor een uitgebreid stammenpanel), voor elk schema maximaal 3 muizen, 9 controles (3 infectiecontroles, 3 groei-controles, 3 comparator-antibioticum controles) en voor combinaties van middelen bovendien maximaal 6 single-drug controles (3 single-drug controles van het ene en 3 van het andere middel). Voor maximaal 6 bacteriestammen wordt bij maximaal 12 doseringsschema's de bacteriële load in de longen in behandelde muizen vergeleken met onbehandelde muizen. Het aantal bacteriestammen hangt af van de breedte van de MRC-verdeling (zie uitleg bij fase 2). Het aantal doseringsschema's (maximaal 12, bijv. 4 doses in 3 frequenties) hangt af van de al beschikbare informatie en/of verwachting over effectieve dosis en toedieningsfrequentie. De hoogte van de doseringen zijn afhankelijk van het middel en het verwachte minimale en maximale effect.

Voor mono-behandeling zijn 270 muizen nodig:

(6 bacteriestammen x 12 doseringsschema's x 3 muizen per groep)
+
(6 bacteriestammen x (3 infectiecontroles + 3 groeicontroles + 3 comparator-antibioticum controles))

Voor 10 middelen als mono-behandeling zijn theoretisch $10 \times 270 = 2.700$ muizen nodig.

Voor combinatie-behandeling zijn 306 muizen nodig:

(6 bacteriestammen x 12 doseringsschema's x 3 muizen per groep)
+
(6 bacteriestammen x (3 infectiecontroles + 3 groeicontroles + 3 comparator-antibioticum controles))
+
(6 bacteriestammen x (3 single-drug controles middel 1 + 3 single-drug controles middel 2))

Voor 5 combinaties van middelen zijn theoretisch $5 \times 306 = 1.530$ muizen nodig.

Fase 5: Effect van verschillende doseringsverhoudingen van twee middelen

Dit wordt gedaan voor 2 verschillende bacteriestammen (geeft, gecombineerd met de resultaten van experimenten uit fases 3 en 4 een vrijwel volledig inzicht in de variatie tussen stammen bij verschillende doseringsschema's; aantal afhankelijk van het onderzochte middel), in 6 verschillende doseringsschema's per middel (dus maximaal 6 schema's voor het ene en 6 schema's voor het andere middel; 4 vrijheidsgraden, dus minimaal 5 schema's; om te voorkomen dat een experiment herhaald moet worden, worden 6 schema's gekozen), voor elk schema maximaal 3 muizen. (Dit is een *in vivo* checkerboard assay.) De focus in dit experiment ligt op de doseringsschema's die voor een klein stammenpanel worden bestudeerd. Daarnaast zijn maximaal 18 infectiecontroles, 18 groeicontroles en 18 comparator-antibioticum controles nodig voor de hele proef. Voor 2 verschillende bacteriestammen wordt bij maximaal 36 verschillende doseringsschema's de bacteriële load in de longen in behandelde muizen vergeleken met onbehandelde muizen. Er wordt gekozen voor 2 verschillende bacteriestammen, waarmee aanvullend aan de resultaten van experimenten uit fases 3 en 4 een goed beeld van de variatie tussen stammen verkregen wordt. Het aantal doseringsschema's (maximaal 36; bijv. 6 schema's voor het ene en 6 schema's van het andere middel) hangt af van de al beschikbare informatie en/of verwachting over effectieve dosis en toedieningsfrequentie. De hoogte van de doseringen zijn afhankelijk van het middel en het verwachte minimale en maximale effect.

Voor combinatie-behandeling zijn 324 muizen nodig:

(2 bacteriestammen x 36 doseringsschema's x 3 muizen per groep)
+
(2 bacteriestammen x (18 infectiecontroles + 18 groeicontroles + 18 comparator-antibioticum controles))

Voor 5 combinaties van middelen zijn theoretisch $5 \times 324 = 1.620$ muizen nodig.

Voor één succesvol middel als mono-behandeling zijn in totaal maximaal $88+294+216+504+270= 1.372$ muizen nodig.

Voor één succesvolle combinatie van middelen zijn in totaal maximaal $88+588+432+600+306+324= 2.338$ muizen nodig.

Voor 10 middelen als mono-behandeling zijn theoretisch $10 \times 1.372 = 13.720$ muizen nodig. Voor 5 combinaties van middelen zijn theoretisch $5 \times 2.338 = 11.690$ muizen nodig. Echter, niet alle (combinaties van) middelen zullen even succesvol zijn en deze zullen in verschillende stadia van het *in vivo* onderzoek afvallen ten gevolge van de GO/NO GO-criteria. Op basis van ervaring weten we dat waarschijnlijk ongeveer 1/3 deel van het theoretisch aantal benodigde muizen nodig is. $(13.720 + 11.690) : 3 = 8.470$ muizen.

	<p>We verwachten dat 2/3 deel van het theoretisch benodigde aantal muizen zal afvallen ten gevolge van de GO/NO GO-criteria en ook doordat er minder dan het maximaal aantal berekende dierproeven voor alle bacteriestammen, doseringsschema's en tijdstippen nodig zullen zijn door bovenstaande overwegingen.</p> <p>In totaal zijn hiermee maximaal 540 (fase 1) + 8.470 (fases 2-5) = 9.010 muizen nodig.</p> <p>In dit totaal aantal van 9.010 muizen is al rekening gehouden met het feit dat middelen zullen afvallen (en dus niet alle fases doorlopen) ten gevolge van een NO GO-beslissing. Op basis van ervaring uit het verleden weten we dat ongeveer 1/3 deel van het theoretisch benodigde aantal dieren (13.720 + 11.690 = 25.410) nodig zal zijn voor de PK/PD studies in fases 2-5, wat neerkomt op (25.410 : 3 =) 8.470. Het overige 2/3 deel zal afvallen.</p>
Geslacht	<p>Standaardisatie van het model is belangrijk om resultaten onderling te kunnen vergelijken. Er is meestal een directe correlatie tussen de PK/PD indexen in vrouwelijke proefdieren en mensen (vrouw én man) voor verschillende antibiotica. Wanneer studies worden uitgevoerd bij vrouwelijke muizen hoeven de resultaten daarom niet ook nog eens bij mannelijke muizen bevestigd te worden. Het gaat immers primair om de concentratie-effect relatie. (Nota bene, de doseringen om die concentraties te bereiken kunnen wel verschillend zijn tussen man en vrouw).</p> <p>In het in de literatuur beschreven longmodel wordt gebruik gemaakt van vrouwelijke muizen. Door in dit project ook vrouwelijke muizen te gebruiken kunnen resultaten vergeleken worden met eerder verkregen resultaten (literatuur en eigen data).</p> <p>Door voor de bepaling van het PK profiel alleen vrouwelijke dieren te gebruiken wordt een zeer gestandaardiseerd PK profiel bepaald met weinig variatie. Alleen bij een PK profiel met weinig variatie is het mogelijk de groeps groottes in de proeven voor bepaling van de exposure-respons relatief klein te houden.</p> <p>Daarnaast zijn mannelijke muizen vanwege hun agressievere gedrag moeilijker in groepen te huisvesten.</p>
Genetisch gewijzigd	N.v.t.
Stam	Bij voorkeur worden CD-1 muizen gebruikt. Deze stam wordt ook in het longmodel beschreven in de literatuur gebruikt.

C. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

Ja

Nee > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

D. Pijn en welzijnsaantasting

Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?

Nee >

Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

De mogelijke pijn die veroorzaakt wordt door lokale ontsteking en ziekte zal worden geminimaliseerd door gebruik van adequate analgetica waarvan gebleken is dat zij niet interfereren met de infectie. Pijnbestrijding zal worden toegepast bij alle dieren in alle experimenten voordat gestart wordt met behandeling met de verschillende middelen. In verband met standaardisatie ontvangen alle dieren analgesie. Omdat op voorhand niet bekend is welke therapie effectief is (dit is de vraagstelling van het onderzoek) kan er niet alleen aan de niet of slecht behandelde muizen pijnbestrijding gegeven worden. De eerste injectie zal zijn vlak voor de eerste behandeling. De dosis wordt zodanig gekozen dat deze 12 uur effectief is en pijn door ontsteking en ziekte voorkomt. Op dat moment wordt een volgende injectie gegeven, wat elke 12 uur herhaald wordt tot aan het einde van de proef. Bij experimenten die langer duren dan 48 uur (maximaal 7 dagen) wordt in de eerste 48 uur pijnbestrijding worden toegepast. Na 48 uur wordt in overleg met de IvD al dan niet pijnbestrijding toegepast. Bij dieren waarbij na 48 uur nog steeds sprake is van (ernstige) pijn zullen de nadelige verschijnselen van een langere opiaat-behandeling minder prominent optreden. Dit zal per gebruikte bacteriestam worden afgewogen. Bij bacteriestammen die infectie veroorzaken die naar verwachting meer pijn oplevert, zal de pijnbestrijding ook na 48 uur worden toegepast. Bij stammen die infectie veroorzaken die naar verwachting minder pijn oplevert, zal pijnbestrijding na 48 uur niet meer worden toegepast.

Uit eerdere experimenten binnen onze onderzoeksgroep en andere onderzoeksgroepen is gebleken dat toepassing van analgetica niet interfereert met het PK profiel van de tot nu toe onderzochte middelen. We verwachten dat dit ook voor andere middelen niet het geval zal zijn. Theoretisch zou wel een controlegroep meegenomen moeten worden zonder analgesie om dit uit te sluiten. Omdat er inmiddels vele middelen zijn bestudeerd waarbij gebruik wordt gemaakt van deze vorm van pijnstilling (door onszelf in eerder onderzoek en door andere onderzoeksgroepen) vinden wij het aannemelijk dat deze vorm van analgesie ook niet met het PK profiel van andere middelen zal interfereren. Het zou bovendien – als er al interferentie zou zijn – een systematische afwijking betreffen van het PK profiel. Ook de dieren waar het PK profiel bij is bepaald hebben immers deze pijnstilling gehad. Een extra controlegroep zou om extra dieren vragen zonder dat dit ook maar enige bijdrage levert aan de uitkomst van de experimenten.

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Wanneer de infectie onbehandeld blijft of wanneer de behandeling niet effectief is, dan zullen de dieren benauwd worden en/of blauw gaan zien. Dit is in de afgelopen 5 jaar echter niet vastgesteld. In sommige gevallen zal de infectie dissemineren en ontaarden in een sepsis. In beide gevallen worden de dieren direct geëuthanaseerd. Wel willen we benadrukken dat de experimenten meestal maar 24 uur, soms 48 uur en maar bij uitzondering langer dan 48 uur (na start behandeling) duren. Deze klinische effecten komen in de meeste gevallen pas na 24 uur tot uiting.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Stress kan ontstaan door experimentele handelingen (hanteren, infecteren, injecties, euthanasie onder anesthesie). Ziekte kan ontstaan door de bacteriële infecties bij niet-effectieve doseringsschema's of bijwerkingen van de middelen.

Beschrijf welke maatregelen worden genomen om deze schadelijke effecten te voorkomen of waar mogelijk te minimaliseren.

Stress door experimentele handelingen kan niet worden voorkomen. Handelingen zullen alleen uitgevoerd worden door competente medewerkers die getraind zijn om met muizen te werken. Bij het bereiken van de humane eindpunten zal het dier worden geëuthanaseerd. Euthanasie vindt plaats onder anesthesie.

E. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

Nee > Ga verder met vraag F.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Dieren worden na infectie gemonitord, ten minste bij elke handeling, en indien nodig (wanneer de score zoals hieronder omschreven 5 of hoger is) wordt de frequentie verhoogd.

De dieren worden gescoord met 0, 1 of 2 op de volgende criteria:

criterium	0	1	3
Gewichtsverlies	Normaal	Licht afwijkend (-5% t.o.v. startgewicht)	Erg afwijkend (-10% t.o.v. startgewicht)

Temperatuurdaling	Normaal	Licht afwijkend (<35.5°C)	Erg afwijkend (<34°C)
Uitdroging	Niet aanwezig	Lichte uitdroging	Ernstige uitdroging
Donkere ogen	Niet aanwezig	Enigszins aanwezig	Zeer donkere ogen
Opstaande vacht	Niet aanwezig	Enigszins aanwezig	Zeer aanwezig

Deze scores worden per dag bij elkaar opgeteld. Per criterium wordt de hoogst gegeven score meegenomen in de optelsom. Voorbeeld: Een muis scoort op dag 1 één punt op 'gewichtsverlies'. Op dag 2 scoort dezelfde muis nul punten op dit criterium. In de optelsom op dag 2 zal dan toch één punt worden meegenomen.

Als deze totale score hoger dan 7 is, dan wordt het dier zonder uitstel geëuthanaseerd en bemonsterd. Wanneer een score van 7 (waarbij dus nog niet voldaan is aan 'hoger dan 7' voor euthanasie) meer dan 24 uur aanhoudt, wordt dit niet ook geaccepteerd, en wordt het dier uit proef gehaald.

Naast bovenstaand scoresysteem zijn er ook een aantal 'direct-uit-proef'-criteria:

- Gewichtsverlies groter dan 20% t.o.v. het startgewicht
- Gewichtsverlies groter dan 15% binnen 24 uur
- Rectale temperatuur lager dan 33°C
- Lethargie of hyperactiviteit door disseminatie van infectie naar de hersenen
- Tollen (bij infectie van de hersenen)

Benauwdheid zou in een longmodel een logisch criterium zijn om op te nemen. Echter, in onze ervaring uit benauwdheid in dit model zich niet zodanig dat dit zichtbaar is: muizen happen niet naar adem, er is geen afwijkende ademhaling en ook geen cyanose. Daarom is dit criterium niet in de lijst opgenomen.

Om wetenschappelijke conclusies te kunnen verbinden aan dit onderzoek is het noodzakelijk dat per studie een groep dieren (bijv. placebo-behandeling, behandeling met een lage dosering van een middel) een hoge bacteriële load krijgt, om een effectieve (bacteriedodende) dosering, dus met een lage bacteriële load, van een middel tegen af te kunnen zetten. Alleen op deze manier kan de dosering en de PK/PD index en target die nodig is voor bacteriostasis (geen bacteriegroei) en voor afdoding van de bacteriën bepaald worden. Deze groep dieren met een hoge bacteriële load kan (afhankelijk van de gebruikte bacteriestam, want niet alle bacteriestammen leiden tot een ernstige klinische infectie bij een hoge bacteriële load) leiden tot ernstig ongerief.

De duur van dit ernstig ongerief wordt zo veel als mogelijk bekort door het in acht nemen van de humane eindpunten. Kortdurend ernstig ongerief is noodzakelijk om wetenschappelijke conclusies te kunnen trekken uit dit onderzoek.

De humane eindpunten hebben daarom niet tot doel ernstig ongerief te voorkomen, maar om de duur en impact van het ernstig ongerief zo kortdurend mogelijk te houden. Afhankelijk van het klinisch beeld worden de muizen gemonitord, maar ten minste elke 8 uur, waardoor het ernstig ongerief nooit langer dan 8 uur duurt. Wanneer het klinisch beeld daartoe aanleiding geeft, dan zal de frequentie van monitoren worden verhoogd, om het ernstig ongerief zo kortdurend mogelijk te houden. Experimenten worden alleen uitgevoerd op werkdagen, zodat overdag monitoren eenvoudig is. Het tijdstip van infectie wordt zodanig gekozen dat de 'kritische periode' waarin muizen een klinisch beeld kunnen gaan vertonen zo veel mogelijk overdag (vroeg ochtend tot vroeg avond, waarbij onderzoekers aanwezig zijn) valt, om te realiseren dat het ongerief zo kortdurend mogelijk is.

In sommige gevallen is het dus noodzakelijk voor een experiment dat een groep dieren een relatief hoger (kortdurend ernstig) ongerief heeft. De humane eindpunt criteria worden hierbij wel altijd in acht genomen, maar hiermee is niet te voorkomen dat muizen in voorkomende gevallen toch ernstig ongerief ondervinden. Welke en hoeveel dieren dit zal betreffen, is van tevoren niet te voorspellen, omdat dit afhangt van de effectiviteit van een middel, hetgeen onderzocht wordt in het experiment. Dit zal voornamelijk gaan om dieren in experimenten waarbij de exposure-respons relatie wordt onderzocht, bij dieren die een lage dosis van het middel of een placebo-behandeling krijgen. Echter, bij niet-effectieve middelen zullen ook dieren die een hogere dosis van het middel krijgen hoger ongerief ondervinden.

Zoals in vraag F aangegeven, verwachten we dat in fase 1-studies 50% (n=270), in PK-proeven 5% (n=98) en in exposure-respons proeven 15% (n=976) van de dieren de humane eindpunten zal bereiken.

Het is belangrijk dat voorkomen wordt dat de eindpunt criteria al (te) scherp worden gedefinieerd, waardoor het wetenschappelijk eindpunt niet zou worden bereikt en het doel van de proef niet wordt gerealiseerd.

Bij termineren van de dieren voordat het ongerief hoog wordt kan de vraagstelling niet worden beantwoord. Voor de vraagstelling is het van groot belang dat het doseringsschema kan worden afgemaakt. Dit schema wordt opgesteld aan de hand van gegevens uit literatuur en op basis van resultaten van onze eigen *in vitro* experimenten. Het schema wordt niet langer gemaakt dat strikt noodzakelijk is. Als er doseringsschema's of tijdstippen missen doordat dieren voortijdig geëuthanaseerd worden, dan kan de exposure-response relatie (farmacodynamische index en farmacodynamische target) niet of minder nauwkeurig worden berekend. Daardoor zullen de proeven met een aangepast doseringsschema moeten worden herhaald en zijn ook opnieuw de bijbehorende controledieren nodig. Bij een groep dieren zal dit dus mogelijk leiden tot relatief hoger ongerief (kortdurend ernstig ongerief), maar het voorkomt wel dat proeven herhaald moeten worden.

Welk percentage van de dieren loopt per diersoort kans deze criteria te halen?

Ziekte komt in de meeste gevallen pas na 24 uur tot uiting. Bij proeven in fase 1 blijven dieren onbehandeld, en dieren waarbij het inoculum te hoog worden hebben een grotere kans het humane eindpunt te bereiken. Ingeschat is dat bij maximaal de helft van de dieren het humane eindpunt wordt bereikt.

Voor fase 1: maximaal 50%
Dit percentage is in vraag F verder toegelicht.

Proeven waarbij het PK profiel (fase 3, studie A) wordt bepaald duren over het algemeen niet langer dan 24 uur (na start behandeling) en voor het grootste aantal groepen korter, waardoor de kans op het bereiken van de humane eindpunten klein is.

Voor PK-proeven (fase 3, studie A): 5%
Dit percentage is in vraag F verder toegelicht.

Proeven waarbij de exposure-respons relatie wordt bepaald (fase 2, fase 3 studie B en C, fase 4, fase 5) duren meestal 24 uur (na start behandeling), maar in sommige gevallen langer dan 48 uur, maximaal 7 dagen na start therapie. In die gevallen kan het voorkomen – afhankelijk van de effectiviteit van de (combinatie van) middelen – dat de humane eindpunten bereikt worden.

Voor exposure-respons proeven (fase 2, fase 3 studie B en C, fase 4, fase 5): 15%
Dit percentage is in vraag F verder toegelicht.

F. Classificatie van ongerief

Benoem de experiment gebonden factoren die bijdragen aan het ongerief en geef voor elk van deze factoren aan hoe het ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig'. Geef per diersoort en behandelgroep het cumulatieve ongerief aan in percentages van het totale aantal dieren.

Het ongerief ten gevolge van de experimentele handelingen is voor alle dieren ingeschat op matig:

Dag -4 en -1: IP cyclofosfamide, wegen

T = ± -2h: IN infectie in de longen onder isofluraan anesthesie

T = 0: behandeling, meestal SC

T = ...: behandeling, meestal SC, frequentie afhankelijk van doseringsschema, maximaal 18 toedieningen per maximaal 7 dagen; bij aanleiding wegen en temperaturen (infrarood thermometer)

Daarnaast kan er ongerief zijn ten gevolge van de infectie. Bij (te) lage inocula, bij middelen die succesvol blijken, bij middelen zonder bijwerkingen en bij groepen waarbij sectie vroeg na start behandeling plaatsvindt zal het ongerief ten gevolge van infectie minder hoog zijn. Echter, bij welke inocula en middelen dit het geval is, is van tevoren niet te voorspellen; dit is de onderzoeksvraag.

Bij dieren die de humane eindpunten niet bereiken is het totale ongerief ingeschat op matig; bij dieren die de humane eindpunten wel bereiken is het totale ongerief nu ingeschat op ernstig. Naar verwachting ondervindt 50% van de dieren in fase 1-studies (Aanpassen van de bestaande modellen), 5% van de dieren in PK proeven (fase 3, studie A) en 15% van de dieren in exposure-respons proeven (fase 2, fase 3 studie B en C, fase 4, fase 5) ernstig ongerief, en bereikt de humane eindpunten. Het is belangrijk om zo veel mogelijk te voorkomen dat het doseringsschema niet kan worden afgemaakt, omdat de exposure-respons relatie dan niet of minder nauwkeurig kan worden berekend. Bij termineren van de dieren

voordat het ongerief hoog wordt kan de vraagstelling niet worden beantwoord, zoals beargumenteerd in het antwoord op vraag E (Humane eindpunten).

In absolute aantallen geldt onderstaande beredeneerde schatting:

Fase 1: Aanpassen van de bestaande modellen

Bij deze proeven zal maximaal 50% van de muizen (n=270) de humane eindpunten bereiken ten gevolge van te hoge inocula. Bij deze muizen is het totale ongerief ingeschat op ernstig. Bij de overige 50% (=270 muizen) zal het inoculum te laag of goed zijn; bij deze muizen is het totale ongerief ingeschat op maximaal matig.

Het percentage van 50% van de muizen dat (kortdurend) ernstig ongerief zal ondervinden is gebaseerd op de inschatting dat het inoculum óf te hoog is (50% van de gevallen, leidend tot ernstig ongerief) óf laag of goed (50% van de gevallen, leidend tot matig ongerief.) Met deze proeven is nog geen eerdere ervaring opgedaan. Deze inschatting is daarom aan de voorzichtige kant, waarbij 50% ernstig ongerief wellicht een overschatting is: het inoculum dat als eerst wordt gebruikt is een redelijk en beredeneerd inoculum, waarvan we verwachten dat dit het juiste inoculum zou kunnen zijn, en dat dus niet leidt tot ernstig ongerief.

PK-proeven (fase 3, studie A):

5% van de dieren in PK-experimenten ondervindt ernstig ongerief (inschatting o.b.v. ervaringen in het verleden met dergelijke experimenten). In deze experimenten worden per middel maximaal 294 muizen gebruikt (voor een combinatie komt dit dus neer op $2 \times 294 = 588$ muizen). Voor 10 succesvolle mono-behandelingen en 5 combinatie-behandelingen zouden dit $10 \times 294 + 5 \times 588 = 5.880$ muizen zijn. $1/3$ van het totaal aantal muizen is nodig i.v.m. uitval ten gevolge van de GO/NO GO criteria: $5.880 : 3 = 1.960$ muizen. 5% hiervan zal ernstig ongerief ondervinden: $1.960 \times 0,05 = 98$ muizen die ernstig ongerief ondervinden. De overige dieren ($1.960 - 98 = 1.862$ muizen) ondervinden matig ongerief.

Het percentage van 5% van de muizen dat (kortdurend) ernstig ongerief zal ondervinden is gebaseerd op ervaringen in het verleden met dit soort studies. (Een inschatting op basis van retrospectieve beoordeling van de voorgaande vergunning is ons inziens niet realistisch. De gebruikte (combinaties van) middelen en hun te onderzoeken effectiviteit bepalen hoeveel muizen een klinisch beeld ontwikkelen en hoeveel muizen de humane eindpunten bereiken en dus kortdurend ernstig ongerief ondervinden. In het huidige project worden andere, effectievere en/of minder succesvolle (combinaties van) middelen gebruikt dan in het voorgaande project, waardoor een inschatting op basis van de voorgaande vergunning een over- of onderschatting kan geven.)

De meeste studies duren maximaal 24 uur, maar op het grootste deel van de muizen zal sectie worden verricht al vroeg na infectie. Dit is het meest interessante stuk van de concentratie-tijd curve (PK curve), en daarom worden in dit stuk de meeste data verzameld. Door sectie te verrichten al vroeg na infectie ontwikkelen de meeste dieren geen klinisch beeld en bereiken ze de humane eindpunten niet.

Bij middelen met een lange halfwaardetijd duren de studies langer dan 24 uur en is het eerste deel van de PK curve wat meer uitgesmeerd. De kans dat hier dieren een klinisch beeld en eventueel ernstig ongerief ontwikkelen is iets groter dan bij 24-uurs studies, maar nog steeds zal dit een kleine groep dieren zijn; die dieren waarop relatief laat na infectie sectie plaatsvindt.

Exposure-respons proeven (fase 2, fase 3 studie B en C, fase 4, fase 5):

15% van de dieren in PK/PD-experimenten ondervindt ernstig ongerief (inschatting o.b.v. ervaringen in het verleden met dergelijke experimenten). In deze experimenten worden per mono-behandeling maximaal 88 (fase 2) + 216 (fase 3 studie B) + 504 (fase 3 studie C) + 270 (fase 4) = 1.078 muizen gebruikt; per combinatie-behandeling maximaal 88 (fase 2) + 432 (fase 3 studie B) + 600 (fase 3 studie C) + 306 (fase 4) + 324 (fase 5) = 1.750 muizen. Voor 10 succesvolle mono-behandelingen en 5 combinatie-behandelingen zouden dit $10 \times 1.078 + 5 \times 1.750 = 19.530$ muizen zijn. $1/3$ van het totaal aantal muizen is nodig i.v.m. uitval ten gevolge van de GO/NO GO criteria: $19.530 : 3 = 6.510$ muizen. 15% hiervan zal ernstig ongerief ondervinden: $6.510 \times 0,15 = 976$ muizen die ernstig ongerief ondervinden. De overige dieren ($6.510 - 976 = 5.534$ muizen) ondervinden matig ongerief.

Het percentage van 15% van de muizen dat (kortdurend) ernstig ongerief zal ondervinden is gebaseerd op ervaringen in het verleden met dit soort studies. (Een inschatting op basis van retrospectieve beoordeling van de voorgaande vergunning is ons inziens niet realistisch. De gebruikte (combinaties van) middelen en hun te onderzoeken effectiviteit bepalen hoeveel muizen een klinisch beeld ontwikkelen en hoeveel muizen de humane eindpunten bereiken en dus kortdurend ernstig ongerief ondervinden. In het huidige project worden andere, effectievere en/of minder succesvolle (combinaties van) middelen gebruikt dan in het voorgaande project, waardoor een inschatting op basis van de voorgaande vergunning een over- of onderschatting kan geven.)

De meeste studies duren 24 uur na start behandeling. Dieren die met placebo behandeld zijn, of met een lage dosering van een middel, of met een middel dat helemaal niet *in vivo* effectief is tegen de bacteriële verwekker, kunnen een klinisch beeld ontwikkelen en de humane eindpunten bereiken. Dit is niet altijd het geval, want sommige bacteriestammen leiden tot een heel gematigd klinisch beeld waarbij de humane eindpunten niet bereikt worden, ook niet in de placebo-behandelde groepen. (Deze dieren hebben dan wel een hoge bacteriële load zoals benodigd om wetenschappelijke conclusies te trekken, waardoor de vraagstelling wél beantwoord kan worden.)

De inschatting is dat ongeveer de helft van de studies zal worden uitgevoerd met stammen die altijd een gematigd klinisch beeld geven (muizen ondervinden matig ongerief), en de andere helft met stammen die in de placebo-behandelde en in de laag-gedoseerde muizen een ernstig klinisch beeld geven (muizen ondervinden kortdurend ernstig ongerief). Van deze laatste groep verwachten we dat ongeveer 30% van de muizen ernstig ongerief zal ondervinden (placebogroep en de laagst gedoseerde muizen). In totaal zal dus 15% van de muizen ernstig ongerief ondervinden.

Totaal:

Matig ongerief: 270 (fase 1) + 1.862 (PK-proeven) + 5.534 (exposure-respons proeven) = 7.666 muizen
 Ernstig ongerief: 270 (fase 1) + 98 (PK-proeven) + 976 (exposure-respons proeven) = 1.344 muizen

Totaal: 7.666 + 1.344 = 9.010 muizen

G. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welke keuzes daarbij zijn gemaakt.

<p>Vervanging</p>	<p>Voordat middelen in dieren getest worden, zijn ze reeds <i>in vitro</i> getest. Alleen de (combinaties van) middelen met potentie om <i>in vivo</i> werkzaam te kunnen zijn, zullen in dieren onderzocht worden.</p> <p>Op basis van de data die wordt verkregen uit het <i>in vivo</i> en het <i>in vitro</i> onderzoek kan de stap naar klinische studies worden gemaakt, omdat de exposure-respons relaties in dit model goed overeenkomen met de verwachte respons bij patiënten. Ook voor het opstellen of herzien van de productinformatie van middelen is deze data nodig. De European Medicines Agency (EMA) heeft het voornemen om de productinformatie van bestaande antibiotica de komende jaren te herzien onder andere aan de hand van informatie gegenereerd in diermodellen die relevant zijn voor de latere indicatie. Voor colistine is dit inmiddels gebeurd. Vervangen van deze dierproeven is daarom niet mogelijk.</p>
<p>Vermindering</p>	<p>Door de gestandaardiseerde opzet van de proeven kunnen de resultaten verkregen voor een middel (of combinatie) goed vergeleken worden met die voor een ander middel (of combinatie), verkregen in dit project, eerdere projecten, of beschreven in de literatuur. Ook is door de gekozen gestandaardiseerde opzet slechts een beperkt aantal onbehandelde controledieren nodig.</p> <p>Voor het bepalen van een standaard exposure-respons curve wordt het minimale aantal dieren gebruikt waarvan verwacht mag worden dat daarmee het effect kan worden beschreven, zonder de noodzaak tot veelvuldig herhalen van de proef. Dit laatste zou bovendien extra controledieren vragen.</p> <p>Door het hanteren van heldere GO/NO GO-criteria worden middelen die al in een vroeg stadium van het onderzoek blijken geen potentie te hebben om <i>in vivo</i> werkzaam te zijn niet verder onderzocht en wordt onnodig proefdiergebruik voorkomen. Experimentele middelen worden vaak voor 1 bacteriespecies ontwikkeld. Bij screening op vroege bacteriedodende activiteit (fase 2) worden dan niet meteen 4 bacteriestammen gebruikt voor infectie, maar eerst 1 stam. Als het middel dan geen activiteit vertoont, is dit een NO GO. Deze experimenten worden met kleine groepen</p>

	<p>(n=2) uitgevoerd, dit is voldoende om eventueel aanwezige vroege bacteriedodende activiteit te zien.</p> <p>Alle andere experimenten worden uitgevoerd met minimaal 2 en maximaal 3 muizen per groep. Het definitieve aantal dieren per groep wordt bepaald aan de hand van de te verwachten inter-individuele variatie. Bij kleine inter-individuele variatie kan volstaan worden met 2 muizen per groep; bij grotere variatie (ondanks de standaardisatie van het model) zijn 3 muizen per groep noodzakelijk. Wanneer 2 muizen per groep nodig zijn, dan zijn uiteraard ook in totaal per middel of per combinatie minder dieren nodig; de berekeningen zijn gemaakt op basis van 3 dieren per groep.</p> <p>Wanneer voor concentratie-bepaling van middelen kan volstaan met een kleine hoeveelheid plasma, dan wordt ook tijdens het experiment bloed afgenomen bij de muizen. Dit leidt tot een reductie van het aantal sectie-momenten, en dus tot reductie van het benodigd aantal proefdieren.</p> <p>In geval van nieuwe antibiotica is een comparator-antibioticum nodig als controle om het effect van het nieuwe antibioticum mee te vergelijken. De noodzaak voor deze controlegroep is er bij bestaande antibiotica niet altijd. Daarom kan deze groep in voorkomende gevallen vervallen, wat leidt tot een vermindering van het benodigd aantal dieren.</p> <p>De proefopzet van de proeven wordt voorgelegd aan de IvD. Hierbij wordt het aantal dieren gedetailleerd verantwoord.</p> <p>Door het gebruik van computermodellen voor bepaling van het PK profiel en de exposure-respons relatie, zijn – op basis van jarenlange eigen ervaring en gepubliceerde literatuur – minimaal 2 dieren en maximaal 3 dieren per groep voldoende om met voldoende power de parameters te bepalen. (De uiteindelijke groepsgrootte hangt af van de verwachte inter-individuele variatie.) Vermindering van deze aantallen of vermindering van het aantal datapunten zou leiden tot onvoldoende power.</p>
Verfijning	<p>Voor de <i>in vivo</i> doseringen wordt rekening gehouden met hetgeen bekend is over toxiciteit en/of tolerantie van de middelen, de minimaal toxische dosis of de maximaal getolereerde dosis is de hoogste dosis die <i>in vivo</i> wordt getest voor het bepalen van exposure-response relaties.</p> <p>De geïntroduceerde infectie zal bij de hogere doseringen niet leiden tot een uitgebreide infectie.</p> <p>Dosering van cyclofosfamide via de intraperitoneale route is zo geoptimaliseerd dat ziekte door neutropenie zo minimaal mogelijk is.</p> <p>De ernst van de welzijnsaantasting wordt verder zoveel mogelijk beperkt door het in acht nemen van de humane eindpunten.</p> <p>Door dieren in groepen te huisvesten met gepaste kooiverrijking wordt de proef verder verfijnd.</p> <p>Zo veel als mogelijk is zal het werken met bacteriestammen die ernstig ongerief kunnen veroorzaken vermeden worden. Echter, soms is dit niet mogelijk vanwege de klinische relevantie van deze stammen.</p> <p>Proeven waarin het PK profiel wordt bepaald zijn slechts van relatief korte duur, waardoor de ziekte nog niet veel progressie heeft gemaakt.</p> <p>Voor nieuwe antibiotica, non-antibiotica en voor sommige oude antibiotica geldt dat onbekend is bij welk doseringsschema ze antibacterieel effectief zijn. Doseringsschema's die niet effectief blijken te zijn, zullen relatief meer ongerief kunnen veroorzaken dan succesvolle schema's. Omdat dit de vraagstelling van het onderzoek is, kan in de keuze van middelen en doseringsschema's, die gemaakt</p>

	<p>worden op basis van literatuur en verwachtingen, geen verdere verfijning plaatsvinden.</p> <p>Alles wordt in het werk gesteld om de periode van ernstig ongerief zo kort mogelijk te houden, zoals beschreven in vraag E (humane eindpunten).</p> <p>Ongerief wordt zo veel mogelijk geminimaliseerd door gebruik van adequate analgetica.</p> <p>Hoewel we ons realiseren dat een doseringsschema met relatief korte intervallen tussen de dosering ongerief veroorzaakt, is er momenteel geen alternatief. Het gebruik van automatische pompjes (zoals ALZET pompjes) is niet mogelijk vanwege de instabiliteit van de meeste middelen. Daarnaast is dit voor combinaties van middelen – waarbij de doseringsfrequentie van het ene middel wel en het andere middel niet wordt gevarieerd – niet mogelijk. Middelen worden indien mogelijk wel gemengd in de spuit, zodat per dosismoment maar een keer toegediend hoeft te worden.</p>
--	--

Zijn er nadelige milieueffecten te verwachten?

Nee

Ja > Benoem de te verwachten milieueffecten en geef aan welke maatregelen zijn genomen om deze tot een minimum te beperken.

H. Hergebruik

Worden er dieren ingezet die eerder in een andere dierproef zijn gebruikt?

Nee, ga verder met vraag I.

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico op) ernstig ongerief?

Nee

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

I. Herhaling

Geef voor wettelijk vereist onderzoek aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing, geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

N.v.t., dit betreft geen wettelijk vereist onderzoek.

J. Plaats waar de dierproef wordt uitgevoerd

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder Wod valt?

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

K. Bestemming van de dieren bij einde experiment

Worden de dieren gedood?

Nee > Beschrijf de bestemming van de dieren.

Ja > Geef aan waarom de dieren worden gedood.

Aan het eind van de proef worden de dieren geëuthanaseerd voor het verzamelen van bloed, longen en andere relevante organen en het verrichten van BAL. Uit deze materialen wordt het optimale bacterieel inoculum en de PK/PD relatie bepaald.

Indien dieren worden gedood, wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van Richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja > Betreft het een dodingsmethode die alleen onder specifieke voorwaarden mag worden toegepast?

Nee > Beschrijf de dodingsmethode

Cervicale dislocatie (onder isofluraan-anesthesie) of CO₂ verstikking.

De onderzoeksgroep is zeer ervaren met deze methode van doden. Het is een snelle methode met kortdurend lijden voor het proefdier. Na nekbreek kan BAL worden uitgevoerd en kunnen longen en relevante organen worden verzameld.

Ja > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Indien dieren worden gedood, maar niet in het kader van de proef, geef aan of herplaatsing is overwogen en waarom hiervan is afgezien.

De dieren worden alleen in het kader van de proeven gedood of om welzijnsproblemen te voorkomen door gebruik van humane eindpunten.

Naam van het project	Nieuwe (combinatie)therapiën tegen infecties door multiresistente en moeilijk behandelbare bacteriën 2
NTS-identificatiecode	NTS-NL-041848 v.1
Nationale identificatiecode van de NTS <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Land	Nederland
Taal	nl
Indiening bij EU <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	ja
Duur van het project, uitgedrukt in maanden.	60
Trefwoorden	bacterie infectie resistentie antibioticum optimale dosering
Doel(en) van het project	Omzettinggericht en toegepast onderzoek: Besmettelijke ziekten van de mens

DOELSTELLINGEN EN VERWACHTE VOORDELEN VAN HET PROJECT

<p>Beschrijf de doelstellingen van het project (bijvoorbeeld het aanpakken van bepaalde wetenschappelijke onduidelijkheden, of wetenschappelijke of klinische behoeften).</p>	<p>Wereldwijd neemt het aantal infecties veroorzaakt door multiresistente en andere moeilijk behandelbare bacteriën toe. Optimale behandeling van deze patiënten met antibiotica is daardoor vaak niet meer goed mogelijk, met soms zelfs overlijden tot gevolg. Er moet daarom gezocht worden naar alternatieve behandelingen. Van oude antibiotica is vaak maar weinig bekend over de meest optimale dosering zoals met name de frequentie van toediening en de wijze van toediening, en over de indicaties (infecties) waarbij het middel gebruikt kan worden. Daarnaast is van een aantal niet-antibiotica ook werkzaamheid tegen bacteriële infecties beschreven, die vaak niet uitgebreid onderzocht is. Ook zijn er niet-antibiotica die bijvoorbeeld resistentie-veroorzakende enzymen remmen, waardoor antibiotica die anders onwerkzaam zijn wel bruikbaar blijven. Daarom onderzoeken we in dit project of oude antibiotica, niet-antibiotica en ook nieuwe antibiotica, en combinaties hiervan, werkzaam zijn in de behandeling van infecties veroorzaakt door multiresistente en moeilijk behandelbare bacteriën. Hiermee komt informatie beschikbaar over de blootstelling aan deze middelen in vivo en over hun effectiviteit. Met deze informatie kunnen de potentieel succesvolle (combinaties van) middelen in klinische studies worden onderzocht, waardoor geen onnodige klinische studies hoeven worden uitgevoerd.</p> <p>Om nieuwe behandelingen te ontwikkelen zijn modellen voor bacteriële infecties nodig. In vitro modellen worden gebruikt voor een eerste screening van middelen op mogelijke effectiviteit. Daarna worden, in dit project, 10 potente middelen en 5 combinaties in vivo onderzocht in twee veelgebruikte modellen in muizen. We bepalen de concentraties van de middelen in het lichaam van de dieren en het effect van de blootstelling aan deze middelen op het aantal bacteriën. De resultaten worden vervolgens vertaald naar optimale doseringen van deze middelen bij de mens.</p>
<p>Welke potentiële voordelen kan dit project opleveren? Leg uit hoe de wetenschap vooruit kan worden geholpen of mensen, dieren of het milieu uiteindelijk voordeel kunnen hebben bij het project. Maak, waar van toepassing, een onderscheid tussen voordelen op korte</p>	<p>In dit project zullen de beschreven proefdiermodellen van weefsel- en longinfectie aangepast worden voor een aantal klinisch relevante bacteriestammen, om de effectiviteit van middelen bij deze stammen te onderzoeken. Verder zal uit dit project blijken welke van de 10 middelen en 5 combinaties van middelen potentie hebben om in de patiënt werkzaam te zijn. We verwachten dat er hiervan 3 succesvol zullen zijn in onze dierproeven. Deze potentieel succesvolle (combinaties van) middelen kunnen vervolgens onderzocht worden in klinische studies. Op basis van de resultaten van deze dierproeven kunnen de beste doseringsschema's (hoeveel en hoe vaak doseren) bepaald worden die later in studies in patiënten gebruikt kunnen worden. Hiermee kunnen antibiotica</p>

termijn (binnen de looptijd van het project) en voordelen op lange termijn (die mogelijk pas worden bereikt nadat het project is afgerond).

mogelijk beter gedoseerd worden, waardoor de huidige antibiotica behouden kunnen blijven, met betere effectiviteit, minder ontstaan van resistentie, en minder toxiciteit.

VOORSPELDE SCHADE

<p>In welke procedures worden de dieren gewoonlijk gebruikt (bijvoorbeeld injecties, chirurgische procedures)? Vermeld het aantal en de duur van deze procedures.</p>	<p>Er wordt gewerkt met muizen met verminderde afweer. Hiervoor worden de muizen voorafgaand aan de infectie twee keer intraperitoneaal geïnjecteerd met cyclofosfamide. De dieren zullen geïnfecteerd worden met bacteriën, intranasaal voor longinfectie, intramusculair voor weefselinfectie. Tijdens de infectie worden de dieren behandeld met antibiotica, niet-antibiotica of combinaties daarvan. Aan het eind van het experiment worden de relevante organen gekweekt om de aantallen bacteriën te bepalen, of wordt bloed en longspoeling afgenomen om concentraties van de middelen te bepalen. Longinfectie en het doden vinden plaats onder narcose. Alle dieren ontvangen pijnstilling.</p>																
<p>Wat zijn de verwachte gevolgen/nadelige effecten voor de dieren, bijvoorbeeld pijn, gewichtsverlies, inactiviteit/verminderde mobiliteit, stress, abnormaal gedrag, en wat is de duur van die effecten?</p>	<p>Het is noodzaak de dieren te infecteren met bacteriën om de meest geschikte doseringsschema's van middelen in behandeling van infecties te kunnen onderzoeken. Dit kan ongerief met zich meebrengen wanneer een middel of combinatie van middelen niet effectief blijkt tegen de bacterie waarmee het dier geïnfecteerd is.</p> <p>Bij proeven waarin concentraties van middelen gemeten worden is er een risico op koorts of ondertemperatuur. De kans op het ontwikkelen van een infectie in bloed en organen is klein, omdat de proeven over het algemeen beëindigd zijn voordat de infectie kans heeft gehad zich op een dergelijke wijze te manifesteren.</p> <p>Bij proeven waarin gekeken wordt naar het effect van de blootstelling aan middelen op het aantal bacteriën kunnen de dieren een infectie in bloed en organen ontwikkelen, waarbij de ernst van de infectie afhangt van de effectiviteit van de middelen die getest worden. Dieren kunnen hierdoor koorts of ondertemperatuur krijgen, gewicht verliezen, meer/minder actief worden (meer/minder voortbewegen) en minder alert worden (reageren minder op prikkels). De klinische verschijnselen worden gescoord en als de totaalscore de drempelwaarde overschrijdt, dan worden dieren voortijdig uit het experiment gehaald om langduriger ongerief te voorkomen. Naast de gevolgen van de infectie zal het welzijn van de dieren worden beïnvloed door eventuele bijwerkingen van de toegediende middelen, toediening van middelen die de werking van het immuunsysteem remmen, de toediening van bacteriën en het (herhaaldelijk) toedienen van de te testen middelen.</p>																
<p>Welke soorten en aantallen dieren zullen naar verwachting worden gebruikt? Wat zijn de verwachte ernstgraden en de aantallen dieren in elke ernstcategorie (per soort)?</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Soort:</th> <th rowspan="2">Totaal aantal</th> <th colspan="4">Geraamde aantallen naar ernstgraad</th> </tr> <tr> <th>Terminaal</th> <th>Licht</th> <th>Matig</th> <th>Ernstig</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Muizen (<i>Mus musculus</i>)</td> <td>18020</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>15332</td> <td>2688</td> </tr> </tbody> </table>	Soort:	Totaal aantal	Geraamde aantallen naar ernstgraad				Terminaal	Licht	Matig	Ernstig	Muizen (<i>Mus musculus</i>)	18020	0	0	15332	2688
Soort:	Totaal aantal			Geraamde aantallen naar ernstgraad													
		Terminaal	Licht	Matig	Ernstig												
Muizen (<i>Mus musculus</i>)	18020	0	0	15332	2688												
<p>Wat gebeurt er met de dieren die aan het einde van de procedure in leven worden gehouden?</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Soort:</th> <th colspan="3">Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren</th> </tr> <tr> <th>Hergebruikt</th> <th>Teruggeplaatst</th> <th>Geadopteerd</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Soort:	Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren			Hergebruikt	Teruggeplaatst	Geadopteerd									
Soort:	Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren																
	Hergebruikt	Teruggeplaatst	Geadopteerd														
<p>Geef de redenen voor het geplande lot van de dieren na de procedure.</p>	<p>Aan het eind van de proef worden de dieren op humane wijze gedood, teneinde bloed en weefsels voor verdere wetenschappelijke analyse te kunnen verkrijgen. Het doden van de dieren aan het eind van de proef is ook noodzakelijk vanwege biologische veiligheidsvoorschriften (werk met multiresistente en moeilijk behandelbare bacteriën).</p>																

TOEPASSING VAN DE DRIE V'S

<p>1. Vervanging Beschrijf welke diervrije alternatieven op dit gebied voorhanden zijn en waarom zij niet voor het project kunnen worden gebruikt.</p>	<p>Voordat gestart wordt met dierproeven worden middelen altijd uitgebreid in vitro getest, bijvoorbeeld ter vaststelling van de Minimaal Remmende Concentratie (MRC) voor verschillende soorten bacteriën en de killingsnelheid. Alleen wanneer middelen in deze experimenten potentie laten zien zullen ze in dierproeven onderzocht worden. Een diemodel is essentieel vanwege de complexe interacties tussen middelen en bacteriën in vivo, inclusief het menselijk lichaam. In vitro modellen kunnen deze interacties niet reproduceren en voorspellen weinig over de beste manier van toedienen van de middelen.</p>
<p>2. Vermindering Leg uit hoe de aantallen dieren voor dit project zijn bepaald. Beschrijf de stappen die zijn genomen om het aantal te gebruiken dieren te verminderen en de beginselen die zijn gebruikt bij het opzetten van de studies. Beschrijf, waar van toepassing, de praktijken die gedurende het hele project zullen worden toegepast om het aantal dieren die in overeenstemming met de wetenschappelijke doelstellingen werden gebruikt, tot een minimum te beperken. Deze praktijken kunnen bijvoorbeeld bestaan uit proefprojecten, computermodellen, het delen van weefsel en hergebruik.</p>	<p>Voorafgaand aan een studie wordt de proefopzet met de benodigde groepsgroottes voorgelegd aan de IvD. Door gebruik te maken van gestandaardiseerde dieren (vrij van specifieke ziekteverwekkers, zoals vooraf getest) en van bepaalde leeftijd, gewicht en geslacht wordt de benodigde groepsgrootte verder beperkt. De te bestuderen middelen zullen eerst in detail worden bestudeerd in vitro. Alleen (combinaties van) middelen die potentie hebben om in vivo werkzaam te kunnen zijn, worden in dieren bestudeerd. Wanneer in een vroege fase van het in vivo onderzoek blijkt dat een middel geen gewenst concentratieverloop heeft of dat het niet effectief is, dan worden niet alle dierexperimenten voor dit middel uitgevoerd en valt het middel al in een vroege fase af. Door de gestandaardiseerde opzet van de proeven kunnen resultaten van verschillende studies onderling goed vergeleken worden, ook met data uit de literatuur, waardoor onnodig gebruik van dieren wordt voorkomen.</p> <p>Verder is in de berekeningen van de benodigde aantallen dieren gerekend met maximale aantallen. Wanneer bijvoorbeeld de verwachte variatie tussen de dieren beperkt is, dan kunnen kleinere groepen gebruikt worden, waardoor het totaal aantal benodigde aantal dieren verminderd kan worden. Dit is afhankelijk van de middelen die gebruikt zullen worden in het onderzoek.</p>
<p>3. Verfijning Geef voorbeelden van de specifieke maatregelen (bv. verscherpte monitoring, postoperatieve behandeling, pijnbestrijding, training van dieren) die in verband met de procedures moeten worden genomen om de welzijnskosten (schade) voor de dieren tot een minimum te beperken. Beschrijf de mechanismen om gedurende de looptijd van het project nieuwe verfijningstechnieken in gebruik te nemen.</p>	<p>De modellen van weefsel- en longinfectie in de muis worden wereldwijd gebruikt. Van het model van weefselinfectie is aangetoond dat de resultaten verkregen in dit model goed overeenkomen met de verwachte respons bij patiënten. Antibiotica werken niet altijd op alle infectielocaties, dit geldt met name voor de long. Daarom is het belangrijk om de te testen middelen ook te onderzoeken in een model van longinfectie.</p> <p>Met de standaard opzet van de experimenten, ook beschreven door de European Medicines Agency, voor optimalisatie van doseringsschema's van middelen is ruime ervaring binnen de onderzoeksgroep.</p> <p>De dierproeven worden uitgevoerd door deskundig personeel. De infectie van de longen en het uiteindelijke doden vinden plaats onder narcose om het ongerief zo veel mogelijk te beperken. Verder wordt pijnstilling toegepast om het ongerief zo veel mogelijk te minimaliseren. De dierproeven waarbij concentraties van de middelen worden bepaald worden relatief kort gehouden, waardoor de infectie zich nog niet zo ver kan ontwikkelen en het ongerief zo laag mogelijk wordt gehouden. Bovendien wordt het verloop van de infectie van de dieren nauwgezet gevolgd, zodat de dieren bij ernstige ziekteverschijnselen op basis van humane eindpunt criteria vroegtijdig uit de proef kunnen worden genomen.</p>
<p>Licht de keuze van de soorten en de bijbehorende levensstadia toe</p>	<p>In de in de literatuur omschreven modellen van weefsel- en longinfectie zijn opgezet in jong-volwassen muizen. Om resultaten uit dit project te kunnen vergelijken met resultaten die eerder (door ons of door anderen) in deze modellen verkregen zijn, is het belangrijk dezelfde diersoort en levensstadia te gebruiken. Bovendien is aangetoond dat de resultaten verkregen in het model van weefselinfectie (met jong-volwassen muizen) goed overeenkomen met de verwachte respons bij patiënten.</p>

VOOR EEN BEOORDELING ACHTERAF GESELECTEERD PROJECT

Project geselecteerd voor BA?	ja
Termijn voor BA	31-05-2028
Reden voor de beoordeling achteraf	
Bevat ernstige procedures	ja
Maakt gebruik van niet-menselijke primaten	
Andere reden	
Toelichting van de andere reden voor de beoordeling achteraf	

AANVULLENDE VELDEN

Nationaal veld 1 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 2 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 3 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 4 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 5 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Startdatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Einddatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Goedkeuringsdatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 1 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 2 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 3 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Link naar de eerdere versie van de NTS buiten het EC-systeem	



Advies aan CCD

Datum 05 augustus 2022

Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD202215947

Instelling: 5.1 lid2h
 Onderzoeker: 5.1 lid2e
 Project: Nieuwe (combinatie)therapieën tegen infecties door multiresistente en moeilijk behandelbare bacteriën 2
 Aanvraagnummer: AVD202215947
 Betreft: Nieuwe aanvraag
 Categorieën: Translationeel of toegepast onderzoek

1 Inzicht in aanvraag en de eventuele knelpunten en risico's


Proces	De volgende vragen zijn gesteld aan de aanvrager: - Waarom staat er "2" achter de titel van de NTS? - U gebruikt in de NTS nog moeilijke termen en voor leken onbekende afkortingen als "intraperitoneaal", "cyclofosfamide", "in-vitro", "IvD". Kunt u de tekst nog een keer doorlopen en beter afstemmen op een algemeen publiek?			
Naam proef	Diersoort	Stam	Aantal dieren	Herkomst
3.4.3.1. Dijspiermodel				
	Muizen (<i>Mus musculus</i>)		9.010	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn
3.4.3.2. Longmodel				
	Muizen (<i>Mus musculus</i>)		9.010	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn


Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

3.4.3.1. Dijspiermodel

Overzicht van opmerkingen bij AdviesNotaCCD_1_5.1 lid2e.pdf

Pagina: 1

 Nummer: 1 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Notitie Datum: 5-8-2022 15:53:26
Ook de titel van de NTS bevat technische termen.

 Nummer: 2 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Markering Datum: 5-8-2022 15:53:44
tekst en de titel van de NTS

Muizen (*Mus musculus*)

Citaat: Standaardisatie van het model is belangrijk om resultaten onderling te kunnen vergelijken. Er is meestal een directe correlatie tussen de PK/PD indexen in vrouwelijke proefdieren en mensen (vrouw én man) voor verschillende antibiotica. Wanneer studies worden uitgevoerd bij vrouwelijke muizen hoeven de resultaten daarom niet ook nog eens bij mannelijke muizen bevestigd te worden. Het gaat immers primair om de concentratie-effect relatie. (Nota bene, de doseringen om die concentraties te bereiken kunnen wel verschillend zijn tussen man en vrouw). In het in de literatuur beschreven dijspiermodel wordt gebruik gemaakt van vrouwelijke muizen. Door in dit project ook vrouwelijke muizen te gebruiken kunnen resultaten vergeleken worden met eerder verkregen resultaten (literatuur en eigen data). Door voor de bepaling van het PK profiel alleen vrouwelijke dieren te gebruiken wordt een zeer gestandaardiseerd PK profiel bepaald met weinig variatie. Alleen bij een PK profiel met weinig variatie is het mogelijk de groepsgroottes in de proeven voor bepaling van de exposure-respons relatief klein te houden. Daarnaast zijn mannelijke muizen vanwege hun agressievere gedrag moeilijker in groepen te huisvesten.

3.4.3.2. Longmodel

Muizen (*Mus musculus*)

Citaat: Standaardisatie van het model is belangrijk om resultaten onderling te kunnen vergelijken. Er is meestal een directe correlatie tussen de PK/PD indexen in vrouwelijke proefdieren en mensen (vrouw én man) voor verschillende antibiotica. Wanneer studies worden uitgevoerd bij vrouwelijke muizen hoeven de resultaten daarom niet ook nog eens bij mannelijke muizen bevestigd te worden. Het gaat immers primair om de concentratie-effect relatie. (Nota bene, de doseringen om die concentraties te bereiken kunnen wel verschillend zijn tussen man en vrouw). In het in de literatuur beschreven longmodel wordt gebruik gemaakt van vrouwelijke muizen. Door in dit project ook vrouwelijke muizen te gebruiken kunnen resultaten vergeleken worden met eerder verkregen resultaten (literatuur en eigen data). Door voor de bepaling van het PK profiel alleen vrouwelijke dieren te gebruiken wordt een zeer gestandaardiseerd PK profiel bepaald met weinig variatie. Alleen bij een PK profiel met weinig variatie is het mogelijk de groepsgroottes in de proeven voor bepaling van de exposure-respons relatief klein te houden. Daarnaast zijn mannelijke muizen vanwege hun agressievere gedrag moeilijker in groepen te huisvesten.

Locatie uitvoering experimenten	<ul style="list-style-type: none">- Alle proeven vinden plaats in een instelling van een vergunninghouder.- Er zijn geen problemen bekend met de vergunninghouder.
--	---

2 DEC advies

DEC-advies	<p>Citaten uit het DEC advies:</p> <p>C11 (ongerief): De indieners hebben duidelijk gemaakt dat het voor het behalen van de doelstellingen in een aantal gevallen het bereiken van een situatie met ernstig ongerief onvermijdelijk is. De humane eindpunten zijn zodanig geformuleerd dat deze situatie nooit langer dan 8 uur zal duren.</p> <p>Bij het aanpassen van de beide bestaande modellen zal maximaal 50% van de 540 dieren worden geconfronteerd met een humaan eindpunt resulterend in ernstig ongerief.</p> <p>Op basis van de resultaten uit het voorafgaande onderzoek is de verwachting dat in de PK experimenten (in elk model 10 monobehandelingen en 5 combinatie-behandelingen) 33% van de dieren (3920) zal uitvallen. Hiervan zal 5% (196 dieren) geconfronteerd worden met ernstig ongerief. Voor alle overige dieren is sprake van matig ongerief.</p> <p>Voor de exposure-respons experimenten is op basis van de ervaringen met dit type experimenten in het verleden de inschatting dat ongeveer de helft van de studies zal worden uitgevoerd met stammen die een gematigd klinisch beeld geven (muizen ondervinden maximaal matig ongerief). De andere helft van de experimenten zal uitgevoerd worden met stammen die in de placebo-behandelde en in de laag-gedoseerde muizen een ernstig klinisch beeld geven. De verwachting is dat in beide modellen 15% van de dieren (totaal 1952 dieren) geconfronteerd zal worden met ernstig ongerief.</p> <p>Voor de overige dieren is sprake van matig ongerief.</p> <p>Het ongerief is gegeven de inherente onzekerheid rond de uiteindelijk te gebruiken bacteriestammen en de te testen middelen herleidbaar ingeschat en geclassificeerd. Omdat de wetenschappelijke eindpunten alleen bereikt kunnen worden wanneer de dieren het volledige doseringsschema kunnen afmaken is de kans op ernstig ongerief bij dieren waarbij de testmiddelen niet werken of die een controle middel krijgen onvermijdelijk.</p> <p>C13 (humane eindpunten): Er wordt voor het toepassen van de humane eindpunten een scoringsysteem toegepast. Dit is specifiek toegespitst op de in dit project voorgestelde type experimenten. Tijdens de experimenten worden de dieren dagelijks met behulp van dit scoringsysteem gemonitord.</p> <p>De indieners hebben aangegeven dat om wetenschappelijke conclusies te kunnen trekken het noodzakelijk is dat per studie een groep dieren een hoge bacteriële load krijgt, om een effectieve (bacteriedodende) dosering van een middel te kunnen bepalen. Alleen op deze manier kunnen de</p>
-------------------	--

dosering en de PK/PD index die nodig is voor bacteriostasis (geen bacteriegroei) en voor afdoding van de bacteriën bepaald worden. In deze groep dieren met een hoge bacteriële load kan dit leiden tot een ernstige klinische infectie resulterend in ernstig ongerief. De duur van dit ernstig ongerief wordt beperkt door het humane eindpunt 'maximaal 8 uur ernstig ongerief'. Op basis van deze strategie/criteria valt voor de betreffende dieren het wetenschappelijke eindpunt dus samen met het humane eindpunt. Aangegeven is dat deze periode met ernstig ongerief noodzakelijk is om wetenschappelijke conclusies te kunnen trekken uit dit onderzoek.

C18 (geslachten): De experimenten worden uitgevoerd in vrouwelijke dieren. Hierdoor wordt een zeer gestandaardiseerd PK profiel bepaald met weinig variatie. Alleen dan is het mogelijk de groepsgroottes in de proeven voor bepaling van de exposure-respons relatief klein te houden. Er is meestal een directe correlatie tussen de PK/PD indexen in vrouwelijke proefdieren en mensen (vrouw én man) voor verschillende antibiotica.

In het in de literatuur beschreven dijspiermodel wordt ook gebruik gemaakt van vrouwelijke muizen. Door in dit project ook vrouwelijke muizen te gebruiken kunnen resultaten vergeleken worden met eerder verkregen resultaten (literatuur en eigen data).

Om de microbiële status van de dieren in alle experimenten constant te houden worden alle dieren betrokken van een geregistreerd fok en toeleveringsbedrijf. Er ontstaan door de keuze voor vrouwelijke dieren lokaal dan ook geen fokoverschotten.

De commissie acht de keuzes voor het exclusief gebruik van vrouwelijke dieren voldoende onderbouwd.

Ethische afweging van de DEC:

1) Rechtvaardigt het belang van de op basis van gestandaardiseerde PK/PD informatie in twee modellen verzamelde kennis over doseringen en toedieningswijzen van 10 middelen als mono-behandeling en 5 combinaties van middelen in mensen, de aantasting van het welzijn en de integriteit van maximaal 18020 muizen (80% matig en 20% ernstig ongerief)?

2) Het welzijn van de aangevraagde 18020 muizen wordt matig (voor 80% van de dieren) of ernstig (voor 20% van de dieren) aangetast. Het ongerief wordt bepaald door de ziekteverschijnselen na de bacteriële besmettingen. Bij de dieren met een hoge bacteriële load kan dit leiden tot een ernstige klinische infectie resulterend in ernstig ongerief. Dit is noodzakelijk voor het behalen van de beoogde doelen.

Dieren worden gedood voor analyse als onderdeel van de dierproef. De

integriteit wordt aangetast door het instrumentele gebruik als proefdier, het ziek maken in het kader van de proef, de huisvesting in een proefdierfaciliteit en het doden aan het eind van de proef. Het belang van de proefdieren om gevrijwaard te blijven van deze aantasting van hun welzijn en integriteit, is groot.

Voor de maatschappij is het belang van de beschikbaarheid van optimale behandelingsstrategieën voor bestaande of nieuwe antibiotica of combinatiepreparaten die beschermen tegen nieuwe (resistente) bacterievarianten groot. Hiermee kunnen ziekte, sterfte en economische en maatschappelijke schade worden voorkomen.

Voor de aanvrager is er sprake van een klinisch, een toegepast wetenschappelijk en een economische belang. Het project sluit aan bij de missie van de instelling, het bevorderen van gezondheid bij de mens. Een economisch belang (bijvoorbeeld het verkrijgen van onderzoeksgelden) is vanuit ethisch gezichtspunt niet bezwaarlijk en staat bij deze studies ook niet voorop. De aanvrager zal het in dit geval vooral van belang achten te handelen in overeenstemming met de missie van de instelling.

De resultaten uit het onderzoek (een onderbouwd doseringsvoorstel voor de behandeling van een bepaalde bacteriële infectie met nieuwe of bestaande antibiotica) zullen als dossier aan de EMA worden aangeboden in voorbereiding op klinische studies naast de gebruikelijke wetenschappelijke communicatie via publicaties in wetenschappelijke tijdschriften en met de partners in dit onderzoek.

Voor de farmaceutische industrie kunnen de resultaten mogelijk helpen bij de ontwikkeling en het op de markt brengen van nieuwe antibioticaproducten om de resistentie tegen bestaande antibiotica te omzeilen. Dit dient tevens een maatschappelijk belang.

3) De DEC is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager, van het belang van de doelstelling van het project: het ontwikkelen van onderbouwde toedieningsprotocollen voor bestaande en nieuw ontwikkelde antibiotica.

De project levert mede door de kwaliteit en positie van de aanvrager een directe bijdrage aan de kliniek, de maatschappij, de wetenschap en uiteindelijk mogelijk de industrie.

Met inzicht in de optimale toedieningsprocedures en eventuele resistentie tegen bestaande en nieuwe antibiotica kan uiteindelijk de maatschappij beter beschermd worden en kan de industrie met een grotere kans meer gerichtere (en dus effectievere) antibiotica (of combinatiepreparaten) produceren.

De commissie is van mening dat het belang van de doelstellingen voor met name de kliniek en de samenleving, voldoende zwaar wegen om het schaden van de belangen van de proefdieren in de vorm van de evidente aantasting van hun integriteit en aantasting van het welzijn te

rechtvaardigen.

De DEC is van mening dat het project goed is opgezet en dat binnen de looptijd van het project de gekozen strategie en de experimentele aanpak kunnen leiden tot betrouwbare uitkomsten.

De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er voor de voorgestelde dierproeven geen geschikte vervangingsalternatieven zijn, dat het doel niet met minder dieren behaald kan worden, dat de gebruikte aanpak de meest verfijnde is en dat voorkomen wordt dat mens, dier en milieu onbedoelde negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven.

De DEC is van oordeel dat het belang van de doelstellingen de aantasting van de integriteit en de onvermijdelijke nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren, rechtvaardigt.

De DEC heeft extern advies ingewonnen bij

- de aanvrager is om aanvullingen gevraagd

De DEC heeft de aanvrager vragen gesteld over:

- Onderbouwing beschrijving en aantallen dieren met ernstig ongerief
- Overwegingen (bijv. medisch, wetenschappelijk, beschikbaarheid nieuw middel?) om nieuw middel te gaan testen.
- Wanneer noodzaak om EMA richtlijnen te volgen
- Onderbouwing aantallen te testen componenten
- Nadere beschrijving doelstelling (bepalentoepassing/concentraties in klinische trials)
- Beschrijving van de belangen die in het geding zijn (eigen afdeling, samenwerkende partners)
- Testen van combi preparaten
- Onderbouwing gebruik neutropene muizen
- Beschrijving go/nogo in de strategie
- Beschrijving onderbouwing van de strategie
- Onderbouwing infectie van beide dijbeenspieren in zelfde muis
- Nadere toelichting breekpuntbepalingen
- Onderbouwing experimentele parameters en aantallen dieren in verschillende fases van experimentele strategie (maximum scenario)
- Ernstige pijn (humaan eindpunt, toepassing van pijnstilling?)
- Nadere toelichting/onderbouwing scoringsschema (ongerief consequenties, humane eindpunten)
- Beschrijving en onderbouwing van de aantallen dieren met risico op ernstig ongerief en de beschrijving en onderbouwing van de humane eindpunten die hierbij gehanteerd worden.

- Tekstuele aanpassingen
- NTS: vervangen 'euthanasie' en 'hoger ongerief' (hoger dan ernstig kan niet)



Citaat DEC: Het heeft de commissie een aantal besprekkingsrondes gekost om op alle vragen die in de eerste ronde al waren gesteld duidelijke antwoorden te krijgen. Speciaal de onderbouwing van de noodzaak van het doormaken van ernstig ongerief bij een substantieel aantal dieren heeft een aantal besprekkingsrondes gekost. Vooral omdat dit een belangrijk aspect in de afweging is geweest.

Alle antwoorden zijn verwerkt in de aanvraag.

Het DEC advies is Verlenen onder voorwaarden

Het uitgebrachte advies is niet gebaseerd op consensus.

Citaat: Het uitgebrachte advies is gebaseerd op een meerderheidsstandpunt. Het minderheidsstandpunt had niet betrekking op het belang van het onderzoek, maar richtte zich op de belangen en waarden van de in dit project opgevoerde dieren waarvan een aanzienlijk deel geconfronteerd wordt met een risico op ernstig ongerief.

De volgende dilemma's zijn signaleerd door de DEC:

Citaat: De DEC ervaart het als een bezwaar dat op het moment van de beoordeling van een vervolgproject als dit het voorgaande project nog niet afgesloten is en er dus ook nog geen rapportage voor een beoordeling achteraf beschikbaar is. Deze kan nu dus niet betrokken worden in de afweging van het vervolgproject.

Verder zijn er geen knelpunten of dilemma's geconstateerd - zowel binnen als buiten de context van het project - die de verantwoordelijkheid en competentie van de DEC overstijgen.

en in de tweede ronde:

- Testen van combi preparaten

- Onderbouwing infectie van beide dijbeenspieren in zelfde muis
- Onderbouwing experimentele parameters en aantallen dieren in verschillende fases van experimentele strategie (maximum scenario)
- Ernstige pijn (humaan eindpunt, toepassing van pijnstilling?)
- Beschrijving en onderbouwing van de aantallen dieren met risico op ernstig ongerief en de beschrijving en onderbouwing van de humane eindpunten die hierbij gehanteerd worden.

3 Kwaliteit DEC advies

Kwaliteit DEC-advies

Het DEC advies is helder en volledig. Er is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die zijn gesteld. Bij de beantwoording van de C vragen gebruikt u een heldere onderbouwing. De ethische afweging volgt op een logische manier uit de antwoorden op de C vragen.

Met de weergaven van het minderheidsstandpunt en het aangekaarte dilemma geeft u op een heldere manier inzicht in de discussies die binnen de DEC zijn gevoerd bij de bespreking van deze aanvraag.

De CCD is het eens met uw oordeel bij C18 dat het gebruik van alleen vrouwtjes voldoende beargumenteerd is. De opmerking dat er lokaal geen fokoverschotten ontstaan door het gebruik van vrouwtjes is voor de afweging verder niet relevant, aangezien er bij de leverancier waarschijnlijk wel fokoverschotten ontstaan doordat mogelijk niet voor alle mannetjes een evengrote vraag is op dat moment.

In uw ethische afweging spreekt u van 20% ernstig ongerief terwijl in de NTS en de bijlagen 15% wordt vermeld. De CCD gaat ervan uit dat dit een verschrijving is en de ethische afweging niet anders uitvalt wanneer er wordt uitgegaan van 15% ernstig ongerief.

Moeten we dit als vraag stellen aan de DEC?

4 Inhoudelijke beoordeling

Doelstelling Doelstelling	<p>Citaat: De doelen van dit project zijn:</p> <p>A. Het aanpassen van het bestaande dijspier- en longmodel voor nog niet eerder door onze onderzoeksgroep gebruikte klinisch relevante bacteriestammen. Voor een aantal species waarmee onze onderzoeksgroep veel ervaring heeft, zoals <i>Escherichia coli</i> en <i>Klebsiella pneumoniae</i>, is bekend dat een standaard inoculum leidt tot een reproduceerbare infectie. Voor een aantal andere species, zoals <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en <i>Acinetobacter baumannii</i>, is bekend dat het geschikte inoculum voor een reproduceerbare infectie wel sterk afhankelijk is van de stam waarmee men infecteert. Voor dit soort stammen is een voorafgaande inoculum-finding studie belangrijk.</p> <p>B. Het bestuderen van de exposure-response relatie (PK/PD) van (combinaties van) middelen (bestaande en/of nieuwe en/of non-antibiotica) bij multiresistente en moeilijk behandelbare bacteriële infecties om inzicht te verkrijgen in de vraag welke dosering, in welke frequentie en via welke route en hoe lang toegediend moet worden. Deze informatie kan worden gebruikt voor het opzetten van klinische trials.</p> <p>Het uiteindelijke doel is: Inzicht in de exposure-response relaties van deze (combinaties van) middelen zal uiteindelijk leiden tot verbetering en optimalisering van de behandeling van multiresistente en moeilijk behandelbare bacteriële infecties.</p> <p>(...)</p>
-------------------------------------	--

<p>Wetenschappelijk en maatschappelijk belang</p>	<p>Citaat: Sociale relevantie Door de wereldwijd toenemende mate van resistentie van bacteriën is behandeling van patiënten met infecties veroorzaakt door deze multiresistente bacteriën niet altijd meer goed mogelijk, met soms zelfs overlijden tot gevolg. Vanwege deze problematiek wordt er gezocht naar wegen om enerzijds behandeling van dergelijke multiresistente en moeilijk behandelbare infecties toch mogelijk te maken en om anderzijds resistentievorming te voorkomen of te omzeilen. Door het bestuderen van de exposure-respons relatie van (combinaties van) middelen in het in vivo dijspier- en/of longinfectiemodel kan het beste doseringsschema van (combinaties van) middelen voor latere klinische studies in patiënten met multiresistente en moeilijk behandelbare infecties bepaald worden. Zo hopen wij de behandeling van infecties door multiresistente en moeilijk behandelbare bacteriën te kunnen verbeteren en te optimaliseren.</p> <p>Wetenschappelijke relevantie Er zijn wel methoden ontwikkeld om de PK/PD relaties van antimicrobiële middelen te bestuderen, maar methoden om het in vivo effect van non-antibiotica en combinaties te bepalen zijn niet beschikbaar. In dit project worden deze methoden ontwikkeld en verder geoptimaliseerd. Door studies uit te voeren in zowel het dijspier- als het longmodel kunnen we bovendien de doseringsschema's bij verschillende soorten infecties onderzoeken. Door het ontwikkelen van computermodellen op basis van de resultaten van de experimenten wordt getracht het effect van de (combinaties van) middelen steeds beter te kunnen voorspellen.</p>
<p>Onderbouwing wetenschappelijk en maatschappelijk belang</p>	<p>Het belang is voldoende uitgewerkt en onderbouwd.</p>
<p>Wetenschappelijke kwaliteit Kwaliteit aanvrager/ onderzoeksgroep en onderzoek</p>	<p>Citaat C7 van het DEC advies: De kennis en kunde van de aanvrager en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd. De aanvrager, een ervaren onderzoeksorganisatie, beschikt over uitgebreide ervaring met dit soort studies en over de daarvoor benodigde voorzieningen. De commissie is ervan overtuigd dat de ervaring en expertise bij de aanvrager ertoe zullen leiden dat de directe doelstellingen en de einddoelstelling haalbaar zijn, dat er zorgvuldig met de dieren gewerkt zal worden en dat er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden.</p> <p>Het Secretariaat heeft geen aanleiding te twijfelen aan de kwaliteit van de aanvragers of het onderzoek.</p>

3V's

Vervanging	
	<p>3.4.3.1. Dijspiermodel: Citaat: Voordat middelen in dieren getest worden, zijn ze reeds in vitro getest. Alleen de (combinaties van) middelen met potentie om in vivo werkzaam te kunnen zijn, zullen in dieren onderzocht worden.</p> <p>Op basis van de data die wordt verkregen uit het in vivo en het in vitro onderzoek kan de stap naar klinische studies worden gemaakt, omdat de exposure-respons relaties in dit model goed overeenkomen met de verwachte respons bij patiënten. Ook voor het opstellen of herzien van de productinformatie van middelen is deze data nodig. De European Medicines Agency (EMA) heeft het voornemen om de productinformatie van bestaande antibiotica de komende jaren te herzien onder andere aan de hand van informatie gegenereerd in diermodellen die relevant zijn voor de latere indicatie. Voor colistine is dit inmiddels gebeurd. Vervangen van deze dierproeven is daarom niet mogelijk.</p>
	<p>3.4.3.2. Longmodel: Zie 3.4.3.1.</p>
Verminderen	
	<p>3.4.3.1. Dijspiermodel: Citaat: Door de gestandaardiseerde opzet van de proeven kunnen de resultaten verkregen voor een middel (of combinatie) goed vergeleken worden met die voor een ander middel (of combinatie), verkregen in dit project, eerdere projecten, of beschreven in de literatuur. Ook is door de gekozen gestandaardiseerde opzet slechts een beperkt aantal onbehandelde controledieren nodig.</p> <p>Voor het bepalen van een standaard exposure-respons curve wordt het minimale aantal dieren gebruikt waarvan verwacht mag worden dat daarmee het effect kan worden beschreven, zonder de noodzaak tot veelvuldig herhalen van de proef. Dit laatste zou bovendien extra controledieren vragen.</p> <p>Door het hanteren van heldere GO/NO GO-criteria worden middelen die al in een vroeg stadium van het onderzoek blijken geen potentie te hebben om in vivo werkzaam te zijn niet verder onderzocht en wordt onnodig proefdiergebruik voorkomen. Experimentele middelen worden vaak voor 1 bacteriespecies ontwikkeld. Bij screening op vroege bacteriedodende activiteit (fase 2) worden dan niet meteen 4 bacteriestammen gebruikt voor infectie, maar eerst 1 stam. Als het middel dan geen activiteit vertoont, is dit een NO GO. Deze experimenten worden met kleine groepen (n=2) uitgevoerd, dit is voldoende om eventueel aanwezige vroege bacteriedodende activiteit te zien.</p> <p>Alle andere experimenten worden uitgevoerd met minimaal 2 en maximaal 3 muizen per groep. Het definitieve aantal dieren per groep wordt bepaald aan de hand van de te verwachten inter-individuele variatie. Bij kleine inter-individuele variatie kan volstaan worden met 2</p>

muizen per groep; bij grotere variatie (ondanks de standaardisatie van het model) zijn 3 muizen per groep noodzakelijk. Wanneer 2 muizen per groep nodig zijn, dan zijn uiteraard ook in totaal per middel of per combinatie minder dieren nodig; de berekeningen zijn gemaakt op basis van 3 dieren per groep.

Wanneer voor concentratie-bepaling van middelen kan volstaan met een kleine hoeveelheid plasma, dan wordt ook tijdens het experiment bloed afgenomen bij de muizen. Dit leidt tot een reductie van het aantal sectie-momenten, en dus tot reductie van het benodigd aantal proefdieren.

In geval van nieuwe antibiotica is een comparator-antibioticum nodig als controle om het effect van het nieuwe antibioticum mee te vergelijken. De noodzaak voor deze controlegroep is er bij bestaande antibiotica niet altijd. Daarom kan deze groep in voorkomende gevallen vervallen, wat leidt tot een vermindering van het benodigd aantal dieren.

In een aantal gevallen kunnen 2 verschillende bacteriestammen per muis gebruikt worden, 1 stam per dijspier. Dit gaat op voor stammen waarvan bekend is dat beide infecties geen invloed hebben op elkaars beloop.

Alleen in die gevallen kan het benodigd aantal muizen gehalveerd worden, omdat per muis 2 bacteriestammen worden gebruikt.

In geval het niet mogelijk is 2 verschillende bacteriestammen per muis te gebruiken, worden ook beide dijspieren geïnfecteerd, met dezelfde bacteriestam. Dit levert dan een duplo binnen een dier op, maar omdat de blootstelling aan het middel hetzelfde is in beide dijspieren (er wordt immers één muis behandeld), is dit geen onafhankelijke duplo. Dit levert daarmee geen vermindering van het aantal benodigde proefdieren op. Er wordt niet voor gekozen om in dit geval slechts 1 dijspier te infecteren. Een duplo binnen het dier levert – ondanks dat het geen onafhankelijke duplo is – meer informatie op uit 1 dier: het gemiddelde van de bacteriële load in de twee dijspieren kan gebruikt worden (in plaats van de load in een dijspier), wat de betrouwbaarheid van de data verhoogt.

Deze extra informatie weegt ons inziens op tegen het beperkte extra ongerief dat een muis ondervindt ten gevolge van infectie in beide dijspieren ten opzichte van infectie in een dijspier. Bij infectie met sommige bacteriestammen is sprake van ontsteking van de achterpoot of -poten, waardoor de muizen deze niet meer goed gebruiken. Ze lopen wel, maar gebruiken daarvoor de voorpoten. Dieren worden dan direct geëuthanaseerd (vraag E) waardoor dit niet leidt tot meer ongerief dan wanneer één dijspier geïnfecteerd zou zijn en minder bruikbaar zou zijn. Bij infectie met andere stammen is de klinische infectie beperkt en lopen en klimmen en bewegen de muizen – ook met twee geïnfecteerde dijspieren – normaal. Hiermee is het ongerief door infectie van een of twee dijspieren beperkt en vergelijkbaar. Door het in acht nemen van de humane eindpunten is ons inziens het ongerief na infectie van beide

	<p>dijspieren versus infectie van één dijspier slechts kortdurend hoger bij gebruik van stammen die resulteren in ontstoken achterpoten, en gelijk bij gebruik van stammen die beperkte klinische infectie geven.</p> <p>De proefopzet van de proeven wordt voorgelegd aan de IvD. Hierbij wordt het aantal dieren gedetailleerd verantwoord.</p> <p>Door het gebruik van computermodellen voor bepaling van het PK profiel en de exposure-respons relatie, zijn – op basis van jarenlange eigen ervaring en gepubliceerde literatuur – minimaal 2 dieren en maximaal 3 dieren per groep voldoende om met voldoende power de parameters te bepalen. (De uiteindelijke groeps grootte hangt af van de verwachte inter-individuele variatie.) Vermindering van deze aantallen of vermindering van het aantal datapunten zou leiden tot onvoldoende power.</p>
	<p>3.4.3.2. Longmodel: Citaat: Door de gestandaardiseerde opzet van de proeven kunnen de resultaten verkregen voor een middel (of combinatie) goed vergeleken worden met die voor een ander middel (of combinatie), verkregen in dit project, eerdere projecten, of beschreven in de literatuur. Ook is door de gekozen gestandaardiseerde opzet slechts een beperkt aantal onbehandelde controledieren nodig.</p> <p>Voor het bepalen van een standaard exposure-respons curve wordt het minimale aantal dieren gebruikt waarvan verwacht mag worden dat daarmee het effect kan worden beschreven, zonder de noodzaak tot veelvuldig herhalen van de proef. Dit laatste zou bovendien extra controledieren vragen.</p> <p>Door het hanteren van heldere GO/NO GO-criteria worden middelen die al in een vroeg stadium van het onderzoek blijken geen potentie te hebben om in vivo werkzaam te zijn niet verder onderzocht en wordt onnodig proefdiergebruik voorkomen. Experimentele middelen worden vaak voor 1 bacteriespecies ontwikkeld. Bij screening op vroege bacteriedodende activiteit (fase 2) worden dan niet meteen 4 bacteriestammen gebruikt voor infectie, maar eerst 1 stam. Als het middel dan geen activiteit vertoont, is dit een NO GO. Deze experimenten worden met kleine groepen (n=2) uitgevoerd, dit is voldoende om eventueel aanwezige vroege bacteriedodende activiteit te zien.</p> <p>Alle andere experimenten worden uitgevoerd met minimaal 2 en maximaal 3 muizen per groep. Het definitieve aantal dieren per groep wordt bepaald aan de hand van de te verwachten inter-individuele variatie. Bij kleine inter-individuele variatie kan volstaan worden met 2 muizen per groep; bij grotere variatie (ondanks de standaardisatie van het model) zijn 3 muizen per groep noodzakelijk. Wanneer 2 muizen per groep nodig zijn, dan zijn uiteraard ook in totaal per middel of per combinatie minder dieren nodig; de berekeningen zijn gemaakt op basis van 3 dieren per groep.</p>

1 Wanneer voor concentratie-bepaling van middelen kan volstaan met een kleine hoeveelheid plasma, dan wordt ook tijdens het experiment bloed afgenomen bij de muizen. Dit leidt tot een reductie van het aantal sectie-momenten, en dus tot reductie van het benodigd aantal proefdieren.

In geval van nieuwe antibiotica is een comparator-antibioticum nodig als controle om het effect van het nieuwe antibioticum mee te vergelijken. De noodzaak voor deze controlegroep is er bij bestaande antibiotica niet altijd. Daarom kan deze groep in voorkomende gevallen vervallen, wat leidt tot een vermindering van het benodigd aantal dieren.

2e proefopzet van de proeven wordt voorgelegd aan de IvD. Hierbij wordt het aantal dieren gedetailleerd verantwoord.

Door het gebruik van computermodellen voor bepaling van het PK profiel en de exposure-respons relatie, zijn – op basis van jarenlange eigen ervaring en gepubliceerde literatuur – minimaal 2 dieren en maximaal 3 dieren per groep voldoende om met voldoende power de parameters te bepalen. (De uiteindelijke groeps grootte hangt af van de verwachte inter-individuele variatie.) Vermindering van deze aantallen of vermindering van het aantal datapunten zou leiden tot onvoldoende power.

Verfijnen

3.4.3.1. Dijspiermodel: Citaat: Voor de in vivo doseringen wordt rekening gehouden met hetgeen bekend is over toxiciteit en/of tolerantie van de middelen, de minimaal toxische dosis of de maximaal getolereerde dosis is de hoogste dosis die in vivo wordt getest voor het bepalen van exposure-response relaties.

De geïntroduceerde infectie zal bij de hogere doseringen niet leiden tot een uitgebreide infectie.


Dosering van cyclofosfamide via de intraperitoneale route is zo geoptimaliseerd dat ziekte door neutropenie zo minimaal mogelijk is. De ernst van de welzijnsaantasting wordt verder zoveel mogelijk beperkt door het in acht nemen van de humane eindpunten.


Door dieren in groepen te huisvesten met gepaste kooiverrijking wordt de proef verder verfijnd.

Zo veel als mogelijk is zal het werken met bacteriestammen die ernstig ongerief kunnen veroorzaken vermeden worden. Echter, soms is dit niet mogelijk vanwege de klinische relevantie van deze stammen.

In geval het niet mogelijk is 2 verschillende bacteriestammen per muis te gebruiken, worden ook beide dijspiers geïnfecteerd, met dezelfde bacteriestam. Dit levert dan een duplo binnen een dier op. Er wordt niet gekozen voor het gebruik van extra dieren die dan ieder individueel minder ongerief hebben, door slechts 1 dijspier te infecteren. Een duplo binnen het dier levert meer datapunten op, die waardevolle informatie oplevert.

Pagina: 14

 Nummer: 1 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Markering Datum: 5-8-2022 16:21:28
tot hier is hetzelfde als 3.4.3.1


 Nummer: 2 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Markering Datum: 5-8-2022 16:22:57
Dit is ook hetzelfde als 3.4.3.1

	<p>Proeven waarin het PK profiel wordt bepaald zijn slechts van relatief korte duur, waardoor de ziekte nog niet veel progressie heeft gemaakt. Voor nieuwe antibiotica, non-antibiotica en voor sommige oude antibiotica geldt dat onbekend is bij welk doseringsschema ze antibacterieel effectief zijn. Doseringsschema's die niet effectief blijken te zijn, zullen relatief meer ongerief kunnen veroorzaken dan succesvolle schema's. Omdat dit de vraagstelling van het onderzoek is, kan in de keuze van middelen en doseringsschema's, die gemaakt worden op basis van literatuur en verwachtingen, geen verdere verfijning plaatsvinden.</p> <p>Alles wordt in het werk gesteld om de periode van ernstig ongerief zo kort mogelijk te houden, zoals beschreven in vraag E (humane eindpunten).</p> <p>Ongerief wordt zo veel mogelijk geminimaliseerd door gebruik van adequate analgetica.</p> <p>Hoewel we ons realiseren dat een doseringsschema met relatief korte intervallen tussen de dosering ongerief veroorzaakt, is er momenteel geen alternatief. Het gebruik van automatische pompjes (zoals ALZET pompjes) is niet mogelijk vanwege de instabiliteit van de meeste middelen. Daarnaast is dit voor combinaties van middelen – waarbij de doseringsfrequentie van het ene middel wel en het andere middel niet wordt gevarieerd – niet mogelijk. Middelen worden indien mogelijk wel gemengd in de spuit, zodat per dosismoment maar een keer toegediend hoeft te worden.</p>
	3.4.3.2. Longmodel: Zie 3.4.3.1.

Hergebruik	Er is geen sprake van hergebruik van dieren.
-------------------	--

Naam proef	Worden de dieren gedood?	Doden volgens richtlijn?
3.4.3.1. Dijspiermodel	Ja	volgens de richtlijn.
3.4.3.2. Longmodel	Ja	volgens de richtlijn.

Naam proef		
3.4.3.1. Dijspiermodel	1EP: 15%	<p>Citaat: Dieren worden na infectie gemonitord, ten minste bij elke handeling, en indien nodig (wanneer de score zoals hieronder omschreven 5 of hoger is) wordt de frequentie verhoogd.</p> <p>De dieren worden gescoord met 0, 1 of 2 op de volgende criteria:</p> <p>criterium</p>

		<p>Gewichtsverlies Normaal 0 - 5% 1 -10% 2</p> <p>Temperatuurdaling Normaal 0 <35,5°C 1 <34°C 2</p> <p>Uitdroging Niet aanwezig 0 Lichte uitdroging 1 Ernstige uitdroging 2</p> <p>Donkere ogen Niet aanwezig 0 Enigszins aanwezig 1 Zeer donkere ogen 2</p> <p>Opstaande vacht Niet aanwezig 0 Enigszins aanwezig 1 Zeer aanwezig 2</p> <p>Deze scores worden per dag bij elkaar opgeteld. Per criterium wordt de hoogst gegeven score meegenomen in de optelsom. Voorbeeld: Een muis scoort op dag 1 één punt op 'gewichtsverlies'. Op dag 2 scoort dezelfde muis nul punten op dit criterium. In de optelsom op dag 2 zal dan toch één punt worden meegenomen. Als deze totale score hoger dan 7 is, dan wordt het dier zonder uitstel geëuthanaseerd en bemonsterd. Wanneer een score van 7 (waarbij dus nog niet voldaan is aan 'hoger dan 7' voor euthanasie) meer dan 24 uur aanhoudt, wordt dit niet ook geaccepteerd, en wordt het dier uit proef gehaald. </p> <p>Naast bovenstaand scoresysteem zijn er ook een aantal 'direct-uit-proef'-criteria:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Gewichtsverlies groter dan 20% t.o.v. het startgewicht • Gewichtsverlies groter dan 15% binnen 24 uur • Rectale temperatuur lager dan 33°C
--	--	--

		<ul style="list-style-type: none"> • Lethargie of hyperactiviteit door disseminatie van infectie naar de hersenen • Tollen (bij infectie van de hersenen) • Wanneer dieren de achterpoten niet meer goed gebruiken en voortbewegen met alleen de voorpoten
Muizen (Mus musculus)	Ongerief: 15,0% Ernstig 85,0% Matig	
3.4.3.2. Longmodel	1EP: 15%	Zie 3.4.3.1. Additioneel citaat: Benauwdheid zou in een longmodel een logisch criterium zijn om op te nemen. Echter, in onze ervaring uit benauwdheid in dit model zich niet zodanig dat dit zichtbaar is: muizen happen niet naar adem, er is geen afwijkende ademhaling en ook geen cyanose. Daarom is dit criterium niet in de lijst opgenomen.
Muizen (Mus musculus)	Ongerief: 15,0% Ernstig 85,0% Matig	

5 Samenvatting

5.2 lid1

Het aangevraagde project is een vervolg op **5.1 lid2h**. In dit project zijn verschillende bestaande middelen en combinaties van bestaande middelen onderzocht, waarvan de analyse nog loopt. Er is ook 1 nieuw middel onderzocht, waarvan de input gebruikt zal gaan worden voor geplande klinische studies.

Voor het onderzoek zullen uitsluitend vrouwtjes worden gebruikt om zo min mogelijk variatie te krijgen in de resultaten en omdat vrouwtjes minder agressief zijn en makkelijker sociaal te huisvesten. De DEC vindt dit voldoende onderbouwd. **5.2 lid1**

Naar schatting zal 15% van de dieren ernstig ongerief ervaren gedurende maximaal 8 uur. **5.2 lid1**

5.2 lid1


5.2 lid1


5.2 lid1

6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning

5.2 lid1

Pagina: 17

 Nummer: 1 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Markering Datum: 5-8-2022 16:17:11
Voor fase 1: 50%, de andere fases zijn 15%

 Nummer: 2 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Markering Datum: 5-8-2022 15:57:04
5.2 lid1

5.2 lid 1

Beoordeling achteraf

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk mei 2028 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

De ingangsdatum van de vergunning kan niet voor de verzenddatum van de beschikking zijn en zal indien van toepassing aangepast worden. Dit is ook het geval bij een voorgenomen besluit.

7 Concept beschikking voor akkoord CCD



Advies aan CCD

Datum 05 augustus 2022
 Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD202215947

Instelling: 5.1 lid2h
 Onderzoeker: 5.1 lid2e
 Project: Nieuwe (combinatie)therapieën tegen infecties door multiresistente en moeilijk behandelbare bacteriën 2
 Aanvraagnummer: AVD202215947
 Betreft: Nieuwe aanvraag
 Categorieën: Translationeel of toegepast onderzoek

1 Inzicht in aanvraag en de eventuele knelpunten en risico's

Proces	De volgende vragen zijn gesteld aan de aanvrager: - U gebruikt in de NTS nog moeilijke termen en voor leken onbekende afkortingen als "intraperitoneaal", "cyclofosfamide", "in-vitro", "IvD". Kunt u de tekst nog een keer doorlopen en beter afstemmen op een algemeen publiek? - Ook de titel is voor een algemeen publiek onduidelijk, kunt u deze aanpassen? Hierbij is het ook niet duidelijk waarom er een 2 achter staat.			
Naam proef	Diersoort	Stam	Aantal dieren	Herkomst
3.4.3.1. Dijspiermodel				
	Muizen (Mus musculus)		9.010	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn
3.4.3.2. Longmodel				
	Muizen (Mus musculus)		9.010	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn

Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

3.4.3.1. Dijspiermodel

Muizen (*Mus musculus*)

Citaat: Standaardisatie van het model is belangrijk om resultaten onderling te kunnen vergelijken. Er is meestal een directe correlatie tussen de PK/PD indexen in vrouwelijke proefdieren en mensen (vrouw én man) voor verschillende antibiotica. Wanneer studies worden uitgevoerd bij vrouwelijke muizen hoeven de resultaten daarom niet ook nog eens bij mannelijke muizen bevestigd te worden. Het gaat immers primair om de concentratie-effect relatie. (Nota bene, de doseringen om die concentraties te bereiken kunnen wel verschillend zijn tussen man en vrouw). In het in de literatuur beschreven dijspiermodel wordt gebruik gemaakt van vrouwelijke muizen. Door in dit project ook vrouwelijke muizen te gebruiken kunnen resultaten vergeleken worden met eerder verkregen resultaten (literatuur en eigen data). Door voor de bepaling van het PK profiel alleen vrouwelijke dieren te gebruiken wordt een zeer gestandaardiseerd PK profiel bepaald met weinig variatie. Alleen bij een PK profiel met weinig variatie is het mogelijk de groepsgroottes in de proeven voor bepaling van de exposure-respons relatief klein te houden. Daarnaast zijn mannelijke muizen vanwege hun agressievere gedrag moeilijker in groepen te huisvesten.

3.4.3.2. Longmodel

Muizen (*Mus musculus*)

Zie 3.4.3.1.

Locatie uitvoering experimenten	<ul style="list-style-type: none">- Alle proeven vinden plaats in een instelling van een vergunninghouder.- Er zijn geen problemen bekend met de vergunninghouder.
--	---

2 DEC advies

DEC-advies	<p>Citaten uit het DEC advies:</p> <p>C11 (ongerief): De indieners hebben duidelijk gemaakt dat het voor het behalen van de doelstellingen in een aantal gevallen het bereiken van een situatie met ernstig ongerief onvermijdelijk is. De humane eindpunten zijn zodanig geformuleerd dat deze situatie nooit langer dan 8 uur zal duren.</p> <p>Bij het aanpassen van de beide bestaande modellen zal maximaal 50% van de 540 dieren worden geconfronteerd met een humaan eindpunt resulterend in ernstig ongerief.</p> <p>Op basis van de resultaten uit het voorafgaande onderzoek is de verwachting dat in de PK experimenten (in elk model 10 monobehandelingen en 5 combinatie-behandelingen) 33% van de dieren</p>
-------------------	--

(3920) zal uitvallen. Hiervan zal 5% (196 dieren) geconfronteerd worden met ernstig ongerief. Voor alle overige dieren is sprake van matig ongerief.

Voor de exposure-respons experimenten is op basis van de ervaringen met dit type experimenten in het verleden de inschatting dat ongeveer de helft van de studies zal worden uitgevoerd met stammen die een gematigd klinisch beeld geven (muizen ondervinden maximaal matig ongerief). De andere helft van de experimenten zal uitgevoerd worden met stammen die in de placebo-behandelde en in de laag-gedoseerde muizen een ernstig klinisch beeld geven. De verwachting is dat in beide modellen 15% van de dieren (totaal 1952 dieren) geconfronteerd zal worden met ernstig ongerief.

Voor de overige dieren is sprake van matig ongerief.

Het ongerief is gegeven de inherente onzekerheid rond de uiteindelijk te gebruiken bacteriestammen en de te testen middelen herleidbaar ingeschat en geclassificeerd. Omdat de wetenschappelijke eindpunten alleen bereikt kunnen worden wanneer de dieren het volledige doseringsschema kunnen afmaken is de kans op ernstig ongerief bij dieren waarbij de testmiddelen niet werken of die een controle middel krijgen onvermijdelijk.

C13 (humane eindpunten): Er wordt voor het toepassen van de humane eindpunten een scoringsysteem toegepast. Dit is specifiek toegespitst op de in dit project voorgestelde type experimenten. Tijdens de experimenten worden de dieren dagelijks met behulp van dit scoringsysteem gemonitord.

De indieners hebben aangegeven dat om wetenschappelijke conclusies te kunnen trekken het noodzakelijk is dat per studie een groep dieren een hoge bacteriële load krijgt, om een effectieve (bacteriedodende) dosering van een middel te kunnen bepalen. Alleen op deze manier kunnen de dosering en de PK/PD index die nodig is voor bacteriostasis (geen bacteriegroei) en voor afdoding van de bacteriën bepaald worden. In deze groep dieren met een hoge bacteriële load kan dit leiden tot een ernstige klinische infectie resulterend in ernstig ongerief.

De duur van dit ernstig ongerief wordt beperkt door het humane eindpunt 'maximaal 8 uur ernstig ongerief'. Op basis van deze strategie/criteria valt voor de betreffende dieren het wetenschappelijke eindpunt dus samen met het humane eindpunt. Aangegeven is dat deze periode met ernstig ongerief noodzakelijk is om wetenschappelijke conclusies te kunnen trekken uit dit onderzoek.

C18 (geslachten): De experimenten worden uitgevoerd in vrouwelijke dieren. Hierdoor wordt een zeer gestandaardiseerd PK profiel bepaald met weinig variatie. Alleen dan is het mogelijk de groeps groottes in de

proeven voor bepaling van de exposure-respons relatief klein te houden. Er is meestal een directe correlatie tussen de PK/PD indexen in vrouwelijke proefdieren en mensen (vrouw én man) voor verschillende antibiotica.

In het in de literatuur beschreven dijspiermodel wordt ook gebruik gemaakt van vrouwelijke muizen. Door in dit project ook vrouwelijke muizen te gebruiken kunnen resultaten vergeleken worden met eerder verkregen resultaten (literatuur en eigen data).

Om de microbiële status van de dieren in alle experimenten constant te houden worden alle dieren betrokken van een geregistreerd fok en toeleveringsbedrijf. Er ontstaan door de keuze voor vrouwelijke dieren lokaal dan ook geen fokoverschotten.

De commissie acht de keuzes voor het exclusief gebruik van vrouwelijke dieren voldoende onderbouwd.

Ethische afweging van de DEC:

1) Rechtvaardigt het belang van de op basis van gestandaardiseerde PK/PD informatie in twee modellen verzamelde kennis over doseringen en toedieningswijzen van 10 middelen als mono-behandeling en 5 combinaties van middelen in mensen, de aantasting van het welzijn en de integriteit van maximaal 18020 muizen (80% matig en 20% ernstig ongerief)?

2) Het welzijn van de aangevraagde 18020 muizen wordt matig (voor 80% van de dieren) of ernstig (voor 20% van de dieren) aangetast. Het ongerief wordt bepaald door de ziekteverschijnselen na de bacteriële besmettingen. Bij de dieren met een hoge bacteriële load kan dit leiden tot een ernstige klinische infectie resulterend in ernstig ongerief. Dit is noodzakelijk voor het behalen van de beoogde doelen.

Dieren worden gedood voor analyse als onderdeel van de dierproef. De integriteit wordt aangetast door het instrumentele gebruik als proefdier, het ziek maken in het kader van de proef, de huisvesting in een proefdierfaciliteit en het doden aan het eind van de proef. Het belang van de proefdieren om gevrijwaard te blijven van deze aantasting van hun welzijn en integriteit, is groot.

Voor de maatschappij is het belang van de beschikbaarheid van optimale behandelingsstrategieën voor bestaande of nieuwe antibiotica of combinatiepreparaten die beschermen tegen nieuwe (resistente) bacterievarianten groot. Hiermee kunnen ziekte, sterfte en economische en maatschappelijke schade worden voorkomen.

Voor de aanvrager is er sprake van een klinisch, een toegepast wetenschappelijk en een economische belang. Het project sluit aan bij de missie van de instelling, het bevorderen van gezondheid bij de mens. Een economisch belang (bijvoorbeeld het verkrijgen van onderzoeksgelden) is

vanuit ethisch gezichtspunt niet bezwaarlijk en staat bij deze studies ook niet voorop. De aanvrager zal het in dit geval vooral van belang achten te handelen in overeenstemming met de missie van de instelling.

De resultaten uit het onderzoek (een onderbouwd doseringsvoorstel voor de behandeling van een bepaalde bacteriële infectie met nieuwe of bestaande antibiotica) zullen als dossier aan de EMA worden aangeboden in voorbereiding op klinische studies naast de gebruikelijke wetenschappelijke communicatie via publicaties in wetenschappelijke tijdschriften en met de partners in dit onderzoek.

Voor de farmaceutische industrie kunnen de resultaten mogelijk helpen bij de ontwikkeling en het op de markt brengen van nieuwe antibioticaproducten om de resistentie tegen bestaande antibiotica te omzeilen. Dit dient tevens een maatschappelijk belang.

3) De DEC is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager, van het belang van de doelstelling van het project: het ontwikkelen van onderbouwde toedieningsprotocollen voor bestaande en nieuw ontwikkelde antibiotica.

De project levert mede door de kwaliteit en positie van de aanvrager een directe bijdrage aan de kliniek, de maatschappij, de wetenschap en uiteindelijk mogelijk de industrie.

Met inzicht in de optimale toedieningsprocedures en eventuele resistentie tegen bestaande en nieuwe antibiotica kan uiteindelijk de maatschappij beter beschermd worden en kan de industrie met een grotere kans meer gerichtere (en dus effectievere) antibiotica (of combinatiepreparaten) produceren.

De commissie is van mening dat het belang van de doelstellingen voor met name de kliniek en de samenleving, voldoende zwaar wegen om het schaden van de belangen van de proefdieren in de vorm van de evidente aantasting van hun integriteit en aantasting van het welzijn te rechtvaardigen.

De DEC is van mening dat het project goed is opgezet en dat binnen de looptijd van het project de gekozen strategie en de experimentele aanpak kunnen leiden tot betrouwbare uitkomsten.

De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er voor de voorgestelde dierproeven geen geschikte vervangingsalternatieven zijn, dat het doel niet met minder dieren behaald kan worden, dat de gebruikte aanpak de meest verfijnde is en dat voorkomen wordt dat mens, dier en milieu onbedoelde negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven.

De DEC is van oordeel dat het belang van de doelstellingen de aantasting van de integriteit en de onvermijdelijke nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren, rechtvaardigt.

De DEC heeft extern advies ingewonnen bij

- de aanvrager is om aanvullingen gevraagd

De DEC heeft de aanvrager vragen gesteld over:

- Onderbouwing beschrijving en aantallen dieren met ernstig ongerief
- Overwegingen (bijv. medisch, wetenschappelijk, beschikbaarheid nieuw middel?) om nieuw middel te gaan testen.
- Wanneer noodzaak om EMA richtlijnen te volgen
- Onderbouwing aantallen te testen componenten
- Nadere beschrijving doelstelling (bepalentoepassing/concentraties in klinische trials)
- Beschrijving van de belangen die in het geding zijn (eigen afdeling, samenwerkende partners)
- Testen van combi preparaten
- Onderbouwing gebruik neutropene muizen
- Beschrijving go/nogo in de strategie
- Beschrijving onderbouwing van de strategie
- Onderbouwing infectie van beide dijbeenspieren in zelfde muis
- Nadere toelichting breekpuntbepalingen
- Onderbouwing experimentele parameters en aantallen dieren in verschillende fases van experimentele strategie (maximum scenario)
- Ernstige pijn (humaan eindpunt, toepassing van pijnstilling?)
- Nadere toelichting/onderbouwing scoringsschema (ongerief consequenties, humane eindpunten)
- Beschrijving en onderbouwing van de aantallen dieren met risico op ernstig ongerief en de beschrijving en onderbouwing van de humane eindpunten die hierbij gehanteerd worden.
- Tekstuele aanpassingen
- NTS: vervangen 'euthanasie' en 'hoger ongerief' (hoger dan ernstig kan niet)

Citaat DEC: Het heeft de commissie een aantal besprekrondes gekost om op alle vragen die in de eerste ronde al waren gesteld duidelijke antwoorden te krijgen. Speciaal de onderbouwing van de noodzaak van het doormaken van ernstig ongerief bij een substantieel aantal dieren heeft een aantal besprekrondes gekost. Vooral omdat dit een belangrijk aspect in de afweging is geweest.

Alle antwoorden zijn verwerkt in de aanvraag.

Het DEC advies is Verlenen onder voorwaarden

	<p>Het uitgebrachte advies is niet gebaseerd op consensus. Citaat: Het uitgebrachte advies is gebaseerd op een meerderheidsstandpunt. Het minderheidsstandpunt had niet betrekking op het belang van het onderzoek, maar richtte zich op de belangen en waarden van de in dit project opgevoerde dieren waarvan een aanzienlijk deel geconfronteerd wordt met een risico op ernstig ongerief.</p> <p>De volgende dilemma's zijn gesignaleerd door de DEC: Citaat: De DEC ervaart het als een bezwaar dat op het moment van de beoordeling van een vervolgproject als dit het voorgaande project nog niet afgesloten is en er dus ook nog geen rapportage voor een beoordeling achteraf beschikbaar is. Deze kan nu dus niet betrokken worden in de afweging van het vervolgproject. Verder zijn er geen knelpunten of dilemma's geconstateerd - zowel binnen als buiten de context van het project - die de verantwoordelijkheid en competentie van de DEC overstijgen.</p>
--	--

3 Kwaliteit DEC advies

Kwaliteit DEC-advies	
	<p>Het DEC advies is helder en volledig. Er is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die zijn gesteld. Bij de beantwoording van de C vragen gebruikt u een heldere onderbouwing. De ethische afweging volgt op een logische manier uit de antwoorden op de C vragen.</p> <p>Met de weergaven van het minderheidsstandpunt en het aangekaarte dilemma geeft u op een heldere manier inzicht in de discussies die binnen de DEC zijn gevoerd bij de bespreking van deze aanvraag.</p> <p>De CCD is het eens met uw oordeel bij C18 dat het gebruik van alleen vrouwtjes voldoende beargumenteerd is. De opmerking dat er lokaal geen fokoverschotten ontstaan door het gebruik van vrouwtjes is voor de afweging verder niet relevant, aangezien er bij de leverancier waarschijnlijk wel fokoverschotten ontstaan doordat mogelijk niet voor alle mannetjes een evengrote vraag is op dat moment.</p> <p>In uw ethische afweging spreekt u van 20% ernstig ongerief terwijl in de NTS en de bijlagen 15% wordt vermeld. De CCD gaat ervan uit dat dit een verschrijving is en de ethische afweging niet anders uitvalt wanneer er wordt uitgegaan van 15% ernstig ongerief.</p>

4 Inhoudelijke beoordeling

<p>Doelstelling Doelstelling</p>	<p>Citaat: De doelen van dit project zijn:</p> <p>A. Het aanpassen van het bestaande dijspier- en longmodel voor nog niet eerder door onze onderzoeksgroep gebruikte klinisch relevante bacteriestammen. Voor een aantal species waarmee onze onderzoeksgroep veel ervaring heeft, zoals <i>Escherichia coli</i> en <i>Klebsiella pneumoniae</i>, is bekend dat een standaard inoculum leidt tot een reproduceerbare infectie. Voor een aantal andere species, zoals <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en <i>Acinetobacter baumannii</i>, is bekend dat het geschikte inoculum voor een reproduceerbare infectie wel sterk afhankelijk is van de stam waarmee men infecteert. Voor dit soort stammen is een voorafgaande inoculum-finding studie belangrijk.</p> <p>B. Het bestuderen van de exposure-response relatie (PK/PD) van (combinaties van) middelen (bestaande en/of nieuwe en/of non-antibiotica) bij multiresistente en moeilijk behandelbare bacteriële infecties om inzicht te verkrijgen in de vraag welke dosering, in welke frequentie en via welke route en hoe lang toegediend moet worden. Deze informatie kan worden gebruikt voor het opzetten van klinische trials.</p> <p>Het uiteindelijke doel is: Inzicht in de exposure-response relaties van deze (combinaties van) middelen zal uiteindelijk leiden tot verbetering en optimalisering van de behandeling van multiresistente en moeilijk behandelbare bacteriële infecties.</p> <p>(...)</p>
---	--

Wetenschappelijk en maatschappelijk belang	<p>Citaat: Sociale relevantie</p> <p>Door de wereldwijd toenemende mate van resistentie van bacteriën is behandeling van patiënten met infecties veroorzaakt door deze multiresistente bacteriën niet altijd meer goed mogelijk, met soms zelfs overlijden tot gevolg. Vanwege deze problematiek wordt er gezocht naar wegen om enerzijds behandeling van dergelijke multiresistente en moeilijk behandelbare infecties toch mogelijk te maken en om anderzijds resistentievorming te voorkomen of te omzeilen. Door het bestuderen van de exposure-respons relatie van (combinaties van) middelen in het in vivo dijspier- en/of longinfectiemodel kan het beste doseringsschema van (combinaties van) middelen voor latere klinische studies in patiënten met multiresistente en moeilijk behandelbare infecties bepaald worden. Zo hopen wij de behandeling van infecties door multiresistente en moeilijk behandelbare bacteriën te kunnen verbeteren en te optimaliseren.</p> <p>Wetenschappelijke relevantie</p> <p>Er zijn wel methoden ontwikkeld om de PK/PD relaties van antimicrobiële middelen te bestuderen, maar methoden om het in vivo effect van non-antibiotica en combinaties te bepalen zijn niet beschikbaar. In dit project worden deze methoden ontwikkeld en verder geoptimaliseerd. Door studies uit te voeren in zowel het dijspier- als het longmodel kunnen we bovendien de doseringsschema's bij verschillende soorten infecties onderzoeken. Door het ontwikkelen van computermodellen op basis van de resultaten van de experimenten wordt getracht het effect van de (combinaties van) middelen steeds beter te kunnen voorspellen.</p>
Onderbouwing wetenschappelijk en maatschappelijk belang	Het belang is voldoende uitgewerkt en onderbouwd.
<p>Wetenschappelijke kwaliteit</p> <p>Kwaliteit aanvrager/ onderzoeksgroep en onderzoek</p>	<p>Citaat C7 van het DEC advies: De kennis en kunde van de aanvrager en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd. De aanvrager, een ervaren onderzoeksorganisatie, beschikt over uitgebreide ervaring met dit soort studies en over de daarvoor benodigde voorzieningen. De commissie is ervan overtuigd dat de ervaring en expertise bij de aanvrager ertoe zullen leiden dat de directe doelstellingen en de einddoelstelling haalbaar zijn, dat er zorgvuldig met de dieren gewerkt zal worden en dat er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden.</p> <p>Het Secretariaat heeft geen aanleiding te twijfelen aan de kwaliteit van de aanvragers of het onderzoek.</p>

3V's

Vervanging	
	<p>3.4.3.1. Dijspiermodel: Citaat: Voordat middelen in dieren getest worden, zijn ze reeds in vitro getest. Alleen de (combinaties van) middelen met potentie om in vivo werkzaam te kunnen zijn, zullen in dieren onderzocht worden.</p> <p>Op basis van de data die wordt verkregen uit het in vivo en het in vitro onderzoek kan de stap naar klinische studies worden gemaakt, omdat de exposure-respons relaties in dit model goed overeenkomen met de verwachte respons bij patiënten. Ook voor het opstellen of herzien van de productinformatie van middelen is deze data nodig. De European Medicines Agency (EMA) heeft het voornemen om de productinformatie van bestaande antibiotica de komende jaren te herzien onder andere aan de hand van informatie gegenereerd in diermodellen die relevant zijn voor de latere indicatie. Voor colistine is dit inmiddels gebeurd. Vervangen van deze dierproeven is daarom niet mogelijk.</p>
	<p>3.4.3.2. Longmodel: Zie 3.4.3.1.</p>
Verminderen	
	<p>3.4.3.1. Dijspiermodel: Citaat: Door de gestandaardiseerde opzet van de proeven kunnen de resultaten verkregen voor een middel (of combinatie) goed vergeleken worden met die voor een ander middel (of combinatie), verkregen in dit project, eerdere projecten, of beschreven in de literatuur. Ook is door de gekozen gestandaardiseerde opzet slechts een beperkt aantal onbehandelde controledieren nodig.</p> <p>Voor het bepalen van een standaard exposure-respons curve wordt het minimale aantal dieren gebruikt waarvan verwacht mag worden dat daarmee het effect kan worden beschreven, zonder de noodzaak tot veelvuldig herhalen van de proef. Dit laatste zou bovendien extra controledieren vragen.</p> <p>Door het hanteren van heldere GO/NO GO-criteria worden middelen die al in een vroeg stadium van het onderzoek blijken geen potentie te hebben om in vivo werkzaam te zijn niet verder onderzocht en wordt onnodig proefdiergebruik voorkomen. Experimentele middelen worden vaak voor 1 bacteriespecies ontwikkeld. Bij screening op vroege bacteriedodende activiteit (fase 2) worden dan niet meteen 4 bacteriestammen gebruikt voor infectie, maar eerst 1 stam. Als het middel dan geen activiteit vertoont, is dit een NO GO. Deze experimenten worden met kleine groepen (n=2) uitgevoerd, dit is voldoende om eventueel aanwezige vroege bacteriedodende activiteit te zien.</p> <p>Alle andere experimenten worden uitgevoerd met minimaal 2 en maximaal 3 muizen per groep. Het definitieve aantal dieren per groep wordt bepaald aan de hand van de te verwachten inter-individuele variatie. Bij kleine inter-individuele variatie kan volstaan worden met 2</p>

muizen per groep; bij grotere variatie (ondanks de standaardisatie van het model) zijn 3 muizen per groep noodzakelijk. Wanneer 2 muizen per groep nodig zijn, dan zijn uiteraard ook in totaal per middel of per combinatie minder dieren nodig; de berekeningen zijn gemaakt op basis van 3 dieren per groep.

Wanneer voor concentratie-bepaling van middelen kan volstaan met een kleine hoeveelheid plasma, dan wordt ook tijdens het experiment bloed afgenomen bij de muizen. Dit leidt tot een reductie van het aantal sectie-momenten, en dus tot reductie van het benodigd aantal proefdieren.

In geval van nieuwe antibiotica is een comparator-antibioticum nodig als controle om het effect van het nieuwe antibioticum mee te vergelijken. De noodzaak voor deze controlegroep is er bij bestaande antibiotica niet altijd. Daarom kan deze groep in voorkomende gevallen vervallen, wat leidt tot een vermindering van het benodigd aantal dieren.

In een aantal gevallen kunnen 2 verschillende bacteriestammen per muis gebruikt worden, 1 stam per dijspier. Dit gaat op voor stammen waarvan bekend is dat beide infecties geen invloed hebben op elkaars beloop.

Alleen in die gevallen kan het benodigd aantal muizen gehalveerd worden, omdat per muis 2 bacteriestammen worden gebruikt.

In geval het niet mogelijk is 2 verschillende bacteriestammen per muis te gebruiken, worden ook beide dijspieren geïnfecteerd, met dezelfde bacteriestam. Dit levert dan een duplo binnen een dier op, maar omdat de blootstelling aan het middel hetzelfde is in beide dijspieren (er wordt immers één muis behandeld), is dit geen onafhankelijke duplo. Dit levert daarmee geen vermindering van het aantal benodigde proefdieren op. Er wordt niet voor gekozen om in dit geval slechts 1 dijspier te infecteren.

Een duplo binnen het dier levert – ondanks dat het geen onafhankelijke duplo is – meer informatie op uit 1 dier: het gemiddelde van de bacteriële load in de twee dijspieren kan gebruikt worden (in plaats van de load in een dijspier), wat de betrouwbaarheid van de data verhoogd.

Deze extra informatie weegt ons inziens op tegen het beperkte extra ongerief dat een muis ondervindt ten gevolge van infectie in beide dijspieren ten opzichte van infectie in een dijspier. Bij infectie met sommige bacteriestammen is sprake van ontsteking van de achterpoot of -poten, waardoor de muizen deze niet meer goed gebruiken. Ze lopen wel, maar gebruiken daarvoor de voorpoten. Dieren worden dan direct geëuthanaseerd (vraag E) waardoor dit niet leidt tot meer ongerief dan wanneer één dijspier geïnfecteerd zou zijn en minder bruikbaar zou zijn. Bij infectie met andere stammen is de klinische infectie beperkt en lopen en klimmen en bewegen de muizen – ook met twee geïnfecteerde dijspieren – normaal. Hiermee is het ongerief door infectie van een of twee dijspieren beperkt en vergelijkbaar. Door het in acht nemen van de humane eindpunten is ons inziens het ongerief na infectie van beide

	<p>dijspieren versus infectie van één dijspier slechts kortdurend hoger bij gebruik van stammen die resulteren in ontstoken achterpoten, en gelijk bij gebruik van stammen die beperkte klinische infectie geven.</p> <p>De proefopzet van de proeven wordt voorgelegd aan de IvD. Hierbij wordt het aantal dieren gedetailleerd verantwoord.</p> <p>Door het gebruik van computermodellen voor bepaling van het PK profiel en de exposure-respons relatie, zijn – op basis van jarenlange eigen ervaring en gepubliceerde literatuur – minimaal 2 dieren en maximaal 3 dieren per groep voldoende om met voldoende power de parameters te bepalen. (De uiteindelijke groeps grootte hangt af van de verwachte inter-individuele variatie.) Vermindering van deze aantallen of vermindering van het aantal datapunten zou leiden tot onvoldoende power.</p>
	<p>3.4.3.2. Longmodel: Zie 3.4.3.1. met extra voor deze bijlage: In geval van nieuwe antibiotica is een comparator-antibioticum nodig als controle om het effect van het nieuwe antibioticum mee te vergelijken.</p> <p>De noodzaak voor deze controlegroep is er bij bestaande antibiotica niet altijd. Daarom kan deze groep in voorkomende gevallen vervallen, wat leidt tot een vermindering van het benodigd aantal dieren.</p>
Verfijnen	
	<p>3.4.3.1. Dijspiermodel: Citaat: Voor de in vivo doseringen wordt rekening gehouden met hetgeen bekend is over toxiciteit en/of tolerantie van de middelen, de minimaal toxische dosis of de maximaal getolereerde dosis is de hoogste dosis die in vivo wordt getest voor het bepalen van exposure-response relaties.</p> <p>De geïntroduceerde infectie zal bij de hogere doseringen niet leiden tot een uitgebreide infectie.</p> <p>Dosering van cyclofosfamide via de intraperitoneale route is zo geoptimaliseerd dat ziekte door neutropenie zo minimaal mogelijk is. De ernst van de welzijnsaantasting wordt verder zoveel mogelijk beperkt door het in acht nemen van de humane eindpunten.</p> <p>Door dieren in groepen te huisvesten met gepaste kooiverrijking wordt de proef verder verfijnd.</p> <p>Zo veel als mogelijk is zal het werken met bacteriestammen die ernstig ongerief kunnen veroorzaken vermeden worden. Echter, soms is dit niet mogelijk vanwege de klinische relevantie van deze stammen.</p> <p>In geval het niet mogelijk is 2 verschillende bacteriestammen per muis te gebruiken, worden ook beide dijspieren geïnfecteerd, met dezelfde bacteriestam. Dit levert dan een duplo binnen een dier op. Er wordt niet gekozen voor het gebruik van extra dieren die dan ieder individueel minder ongerief hebben, door slechts 1 dijspier te infecteren. Een duplo binnen het dier levert meer datapunten op, die waardevolle informatie oplevert.</p>

	<p>Proeven waarin het PK profiel wordt bepaald zijn slechts van relatief korte duur, waardoor de ziekte nog niet veel progressie heeft gemaakt. Voor nieuwe antibiotica, non-antibiotica en voor sommige oude antibiotica geldt dat onbekend is bij welk doseringsschema ze antibacterieel effectief zijn. Doseringsschema's die niet effectief blijken te zijn, zullen relatief meer ongerief kunnen veroorzaken dan succesvolle schema's. Omdat dit de vraagstelling van het onderzoek is, kan in de keuze van middelen en doseringsschema's, die gemaakt worden op basis van literatuur en verwachtingen, geen verdere verfijning plaatsvinden.</p> <p>Alles wordt in het werk gesteld om de periode van ernstig ongerief zo kort mogelijk te houden, zoals beschreven in vraag E (humane eindpunten).</p> <p>Ongerief wordt zo veel mogelijk geminimaliseerd door gebruik van adequate analgetica.</p> <p>Hoewel we ons realiseren dat een doseringsschema met relatief korte intervallen tussen de dosering ongerief veroorzaakt, is er momenteel geen alternatief. Het gebruik van automatische pompjes (zoals ALZET pompjes) is niet mogelijk vanwege de instabiliteit van de meeste middelen. Daarnaast is dit voor combinaties van middelen – waarbij de doseringsfrequentie van het ene middel wel en het andere middel niet wordt gevarieerd – niet mogelijk. Middelen worden indien mogelijk wel gemengd in de spuit, zodat per dosismoment maar een keer toegediend hoeft te worden.</p>
	3.4.3.2. Longmodel: Zie 3.4.3.1.

Hergebruik	Er is geen sprake van hergebruik van dieren.
-------------------	--

Naam proef	Worden de dieren gedood?	Doden volgens richtlijn?
3.4.3.1. Dijspiermodel	Ja	volgens de richtlijn.
3.4.3.2. Longmodel	Ja	volgens de richtlijn.

Naam proef		
3.4.3.1. Dijspiermodel	HEP: 50% in de fase 1 proeven, 5-15% in de andere proeven. Gemiddeld 15% over alle dieren.	<p>Citaat: Dieren worden na infectie gemonitord, ten minste bij elke handeling, en indien nodig (wanneer de score zoals hieronder omschreven 5 of hoger is) wordt de frequentie verhoogd.</p> <p>De dieren worden gescoord met 0, 1 of 2 op de volgende criteria:</p> <p>criterium</p>

		<p>Gewichtsverlies Normaal 0 - 5% 1 -10% 2</p> <p>Temperatuurdaling Normaal 0 <35.5°C 1 <34°C 2</p> <p>Uitdroging Niet aanwezig 0 Lichte uitdroging 1 Ernstige uitdroging 2</p> <p>Donkere ogen Niet aanwezig 0 Enigszins aanwezig 1 Zeer donkere ogen 2</p> <p>Opstaande vacht Niet aanwezig 0 Enigszins aanwezig 1 Zeer aanwezig 2</p> <p>Deze scores worden per dag bij elkaar opgeteld. Per criterium wordt de hoogst gegeven score meegenomen in de optelsom. Voorbeeld: Een muis scoort op dag 1 één punt op 'gewichtsverlies'. Op dag 2 scoort dezelfde muis nul punten op dit criterium. In de optelsom op dag 2 zal dan toch één punt worden meegenomen. Als deze totale score hoger dan 7 is, dan wordt het dier zonder uitstel geëuthanaseerd en bemonsterd. Wanneer een score van 7 (waarbij dus nog niet voldaan is aan 'hoger dan 7' voor euthanasie) meer dan 24 uur aanhoudt, wordt dit niet ook geaccepteerd, en wordt het dier uit proef gehaald.</p> <p>Naast bovenstaand scoresysteem zijn er ook een aantal 'direct-uit-proef'-criteria:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Gewichtsverlies groter dan 20% t.o.v. het startgewicht • Gewichtsverlies groter dan 15% binnen 24 uur
--	--	---

		<ul style="list-style-type: none"> • Rectale temperatuur lager dan 33°C • Lethargie of hyperactiviteit door disseminatie van infectie naar de hersenen • Tollen (bij infectie van de hersenen) • Wanneer dieren de achterpoten niet meer goed gebruiken en voortbewegen met alleen de voorpoten
Muizen (Mus musculus)	Ongerief: 15,0% Ernstig 85,0% Matig	
3.4.3.2. Longmodel	HEP: 50% in de fase 1 proeven, 5-15% in de andere proeven. Gemiddeld 15% over alle dieren.	Zie 3.4.3.1. Additioneel citaat: Benauwdheid zou in een longmodel een logisch criterium zijn om op te nemen. Echter, in onze ervaring uit benauwdheid in dit model zich niet zodanig dat dit zichtbaar is: muizen happen niet naar adem, er is geen afwijkende ademhaling en ook geen cyanose. Daarom is dit criterium niet in de lijst opgenomen.
Muizen (Mus musculus)	Ongerief: 15,0% Ernstig 85,0% Matig	

5 Samenvatting

5.2 lid1

Het aangevraagde project is een vervolg op **5.1 lid2h**. In dit project zijn verschillende bestaande middelen en combinaties van bestaande middelen onderzocht, waarvan de analyse nog loopt. Er is ook 1 nieuw middel onderzocht, waarvan de input gebruikt zal gaan worden voor geplande klinische studies.

Voor het onderzoek zullen uitsluitend vrouwtjes worden gebruikt om zo min mogelijk variatie te krijgen in de resultaten en omdat vrouwtjes minder agressief zijn en makkelijker sociaal te huisvesten. De DEC vindt dit voldoende onderbouwd. **5.2 lid1**

Naar schatting zal 15% van de dieren ernstig ongerief ervaren gedurende maximaal 8 uur. **5.2 lid1**

Vanwege het cumulatief ernstige ongerief in het projectvoorstel, wordt een voorwaarde in de vorm van een beoordeling achteraf aan de vergunning verbonden.

6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning

5.2 lid1



Beoordeling achteraf

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk mei 2028 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

De ingangsdatum van de vergunning kan niet voor de verzenddatum van de beschikking zijn en zal indien van toepassing aangepast worden. Dit is ook het geval bij een voorgenomen besluit.

7 Concept beschikking voor akkoord CCD

Van: info@zbo-ccd.nl
Verzonden: vrijdag 5 augustus 2022 17:00
Aan: 5.1 lid2h 5.1 lid2e
CC: 5.1 lid2e ; 5.1 lid2h
Onderwerp: Aanhouden AVD 5.1 lid2h 202215947
Categorieën: Dossier: 5.1 lid2e

Geachte 5.1 lid2e ,

Op 25-03-2022 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Nieuwe (combinatie)therapieën tegen infecties door multiresistente en moeilijk behandelbare bacteriën 2" met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202215947. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In dit bericht leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

Wij hebben de volgende informatie van u nodig om uw aanvraag verder te kunnen beoordelen:

Niet technische samenvatting

- U gebruikt in de NTS nog moeilijke termen en voor leken onbekende afkortingen als "intraperitoneaal", "cyclofosfamide", "in-vitro", "IvD". Kunt u de tekst nog een keer doorlopen en beter afstemmen op een algemeen publiek?

- Ook de titel is voor een algemeen publiek onduidelijk, kunt u deze aanpassen? Hierbij is het ook niet duidelijk waarom er een 2 achter staat.

Zonder deze aanvullende informatie kan de beslissing nadelig voor u uitvallen omdat de gegevens onvolledig of onduidelijk zijn.

Opsturen binnen veertien dagen

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van dit bericht op. U kunt dit aanleveren via NetFTP.

Uw aanvraag zal 12 augustus worden besproken in de CCD vergadering. Antwoorden die voor die datum zijn ingediend worden meegenomen in de bespreking van uw aanvraag.

Wanneer een beslissing

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Mocht u vragen hebben, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

5.1 lid2e
www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag

.....
T: 0800 789 0789

E: info@zbo-ccd.nl

Naam van het project	Nieuwe therapiën in de behandeling van infecties veroorzaakt door moeilijk te behandelen bacteriën.
NTS-identificatiecode	NTS-NL-888551 v.1
Nationale identificatiecode van de NTS <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Land	Nederland
Taal	nl
Indiening bij EU <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	ja
Duur van het project, uitgedrukt in maanden.	60
Trefwoorden	bacterie infectie resistentie antibioticum optimale dosering
Doel(en) van het project	Omzettinggericht en toegepast onderzoek: Besmettelijke ziekten van de mens

DOELSTELLINGEN EN VERWACHTE VOORDELEN VAN HET PROJECT

<p>Beschrijf de doelstellingen van het project (bijvoorbeeld het aanpakken van bepaalde wetenschappelijke onduidelijkheden, of wetenschappelijke of klinische behoeften).</p>	<p>Wereldwijd neemt het aantal infecties veroorzaakt door moeilijk behandelbare bacteriën (multiresistente bacteriën) toe. Optimale behandeling van deze patiënten met antibiotica is daardoor vaak niet meer mogelijk, met soms zelfs overlijden tot gevolg. Er moet daarom gezocht worden naar alternatieve behandelingen. Van oude antibiotica is vaak maar weinig bekend over de meest optimale dosering, met name over de frequentie en wijze van toediening en over de indicaties (infecties) waarbij het middel gebruikt kan worden. Daarnaast is van een aantal niet-antibiotica ook beschreven dat zij werkzaam zijn tegen bacteriële infecties, maar die werkzaamheid is vaak niet uitgebreid onderzocht. Ook zijn er niet-antibiotica die ontwikkeling van resistentie kunnen remmen. Door deze middelen met antibiotica te combineren, kunnen antibiotica die anders onwerkzaam zouden zijn, toch wel bruikbaar blijven. Daarom onderzoeken we in dit project of oude antibiotica, niet-antibiotica en ook nieuwe antibiotica, en combinaties hiervan, werkzaam zijn in de behandeling van infecties veroorzaakt door moeilijk behandelbare bacteriën. Hiermee komt informatie beschikbaar over de blootstelling aan deze middelen in muizen en over hun effectiviteit. Met deze informatie kunnen de mogelijk succesvolle (combinaties van) middelen in klinische studies worden onderzocht.</p> <p>Om nieuwe behandelingen te ontwikkelen, zijn modellen voor bacteriële infecties nodig. Hiervoor worden in het laboratorium test-omstandigheden nagebootst waarmee een eerste screening van middelen op mogelijke effectiviteit kan worden onderzocht. Daarna worden, in dit project, 10 potente middelen en 5 combinaties in twee veelgebruikte muismodellen onderzocht. De resultaten worden vervolgens vertaald naar optimale doseringen van deze middelen bij de mens.</p>
<p>Welke potentiële voordelen kan dit project opleveren? Leg uit hoe de wetenschap vooruit kan worden geholpen of mensen, dieren of het milieu uiteindelijk voordeel kunnen hebben bij het project. Maak, waar van toepassing, een onderscheid tussen voordelen op korte termijn (binnen de looptijd van het project) en voordelen op</p>	<p>In dit project zullen de beschreven proefdiermodellen van weefsel- en longinfectie aangepast worden, zodat de effectiviteit van middelen tegen een aantal klinisch relevante bacteriestammen kan worden onderzocht. We verwachten dat er 3 (combinaties van) middelen succesvol zullen zijn in onze dierproeven. Deze potentieel succesvolle (combinaties van) middelen kunnen vervolgens onderzocht worden in klinische studies. Op basis van de resultaten van deze dierproeven kunnen de meest optimale doseringsschema's (hoeveel en hoe vaak doseren) bepaald worden. Deze doseringsschema's kunnen dan later in studies in patiënten gebruikt worden. Hiermee kunnen antibiotica mogelijk beter gedoseerd worden, waardoor de huidige antibiotica behouden kunnen blijven, met betere effectiviteit, minder ontstaan van resistentie, en minder toxiciteit.</p>

lange termijn (die mogelijk pas worden bereikt nadat het project is afgerond).

VOORSPELDE SCHADE

<p>In welke procedures worden de dieren gewoonlijk gebruikt (bijvoorbeeld injecties, chirurgische procedures)? Vermeld het aantal en de duur van deze procedures.</p>	<p>Er wordt gewerkt met muizen met verminderde afweer. Hiervoor worden de muizen voorafgaand aan de infectie twee keer in de buikholte geïnjecteerd met een afweeronderdrukkend middel. De dieren zullen geïnfecteerd worden met bacteriën, via de neus voor longinfectie of in de dijbeenspier voor weefselinfectie. Tijdens de infectie worden de dieren behandeld met antibiotica, niet-antibiotica of combinaties daarvan. Aan het eind van het experiment worden de relevante organen uitgenomen om de aantallen bacteriën te bepalen of wordt bloed en longspoeling afgenomen om concentraties van de middelen te bepalen. Longinfectie en het doden vinden plaats onder narcose. Alle dieren ontvangen pijnstilling.</p>																
<p>Wat zijn de verwachte gevolgen/nadelige effecten voor de dieren, bijvoorbeeld pijn, gewichtsverlies, inactiviteit/verminderde mobiliteit, stress, abnormaal gedrag, en wat is de duur van die effecten?</p>	<p>Het is noodzaak de dieren te infecteren met bacteriën om de meest geschikte doseringsschema's van middelen in behandeling van infecties te kunnen onderzoeken. Dit kan ongerief met zich meebrengen wanneer een middel of combinatie van middelen niet effectief blijkt tegen de bacterie waarmee het dier geïnfecteerd is.</p> <p>Bij proeven waarin concentraties van middelen gemeten worden is er een risico op koorts of ondertemperatuur. De kans op het ontwikkelen van een infectie in de bloedbaan en andere organen is klein, omdat de kortdurende proeven over het algemeen beëindigd zijn voordat de infectie kans heeft gehad zich op een dergelijke wijze te ontwikkelen.</p> <p>Bij proeven waarin gekeken wordt naar de samenhang tussen de blootstelling aan middelen en effectiviteit van de middelen kunnen de dieren een infectie in de bloedbaan en organen ontwikkelen, waarbij de ernst van de infectie afhangt van de effectiviteit van de middelen die getest worden. Dieren kunnen hierdoor koorts of ondertemperatuur krijgen, gewicht verliezen, meer/minder actief worden en minder alert worden. Naast de gevolgen van de infectie zal het welzijn van de dieren worden beïnvloed door eventuele bijwerkingen van toediening van middelen die de werking van het immuunsysteem remmen, de toediening van bacteriën en het (herhaaldelijk) toedienen van de te testen middelen.</p>																
<p>Welke soorten en aantallen dieren zullen naar verwachting worden gebruikt? Wat zijn de verwachte ernstgraden en de aantallen dieren in elke ernstcategorie (per soort)?</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Soort:</th> <th rowspan="2">Totaal aantal</th> <th colspan="4">Geraamde aantallen naar ernstgraad</th> </tr> <tr> <th>Terminaal</th> <th>Licht</th> <th>Matig</th> <th>Ernstig</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Muizen (<i>Mus musculus</i>)</td> <td>18020</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>15332</td> <td>2688</td> </tr> </tbody> </table>	Soort:	Totaal aantal	Geraamde aantallen naar ernstgraad				Terminaal	Licht	Matig	Ernstig	Muizen (<i>Mus musculus</i>)	18020	0	0	15332	2688
Soort:	Totaal aantal			Geraamde aantallen naar ernstgraad													
		Terminaal	Licht	Matig	Ernstig												
Muizen (<i>Mus musculus</i>)	18020	0	0	15332	2688												
<p>Wat gebeurt er met de dieren die aan het einde van de procedure in leven worden gehouden?</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Soort:</th> <th colspan="3">Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren</th> </tr> <tr> <th>Hergebruikt</th> <th>Teruggeplaatst</th> <th>Geadopteerd</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Soort:	Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren			Hergebruikt	Teruggeplaatst	Geadopteerd									
Soort:	Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren																
	Hergebruikt	Teruggeplaatst	Geadopteerd														
<p>Geef de redenen voor het geplande lot van de dieren na de procedure.</p>	<p>Aan het eind van de proef worden de dieren op humane wijze gedood, teneinde bloed en weefsels voor verdere wetenschappelijke analyse te kunnen verkrijgen. Het doden van de dieren aan het eind van de proef is ook noodzakelijk vanwege biologische veiligheidsvoorschriften (werk met multiresistente en moeilijk behandelbare bacteriën).</p>																

TOEPASSING VAN DE DRIE V'S

<p>1. Vervanging Beschrijf welke diervrije alternatieven op dit gebied voorhanden zijn en waarom zij niet voor het project kunnen worden gebruikt.</p>	<p>Voordat gestart wordt met dierproeven worden middelen altijd uitgebreid getest, onder in het laboratorium nagebootste omstandigheden middels reageerbuis-achtige systemen. Alleen wanneer middelen in deze experimenten potentie laten zien zullen ze in dierproeven onderzocht worden. Een diermodel is essentieel vanwege de complexe interacties tussen middelen, bacteriën en het immuunsysteem in het menselijk lichaam. Deze reageerbuis-achtige laboratoriummodellen/technieken kunnen deze interacties niet reproduceren en niet goed de optimale manier van toedienen van de middelen voorspellen.</p>
<p>2. Vermindering Leg uit hoe de aantallen dieren voor dit project zijn bepaald. Beschrijf de stappen die zijn genomen om het aantal te gebruiken dieren te verminderen en de beginselen die zijn gebruikt bij het opzetten van de studies. Beschrijf, waar van toepassing, de praktijken die gedurende het hele project zullen worden toegepast om het aantal dieren die in overeenstemming met de wetenschappelijke doelstellingen werden gebruikt, tot een minimum te beperken. Deze praktijken kunnen bijvoorbeeld bestaan uit proefprojecten, computermodellen, het delen van weefsel en hergebruik.</p>	<p>Voorafgaand aan een studie wordt de proefopzet met de benodigde groepsgroottes voorgelegd aan de Instantie voor Dierenwelzijn. Door gebruik te maken van gestandaardiseerde dieren (vrij van specifieke ziekteverwekkers) en van bepaalde leeftijd, gewicht en geslacht wordt de benodigde groepsgrootte verder beperkt. De te bestuderen middelen zullen eerst in detail worden bestudeerd in het laboratorium middels reageerbuis-achtige modellen/technieken. Alleen (combinaties van) middelen die potentie hebben om in dieren werkzaam te kunnen zijn, worden in de muismodellen bestudeerd. Wanneer in een vroege fase van het dieronderzoek blijkt dat een middel geen gewenst concentratieverloop heeft of dat het niet effectief is, dan valt het middel al in een vroege fase af en worden er geen verdere dierexperimenten uitgevoerd. Door de gestandaardiseerde opzet van de proeven kunnen resultaten van verschillende studies onderling goed vergeleken worden waardoor onnodig gebruik van dieren wordt voorkomen.</p>
<p>3. Verfijning Geef voorbeelden van de specifieke maatregelen (bv. verscherpte monitoring, postoperatieve behandeling, pijnbestrijding, training van dieren) die in verband met de procedures moeten worden genomen om de welzijnskosten (schade) voor de dieren tot een minimum te beperken. Beschrijf de mechanismen om gedurende de looptijd van het project nieuwe verfijningstechnieken in gebruik te nemen.</p>	<p>De modellen van weefsel- en longinfectie in de muis worden wereldwijd gebruikt. Van het model van weefselinfectie is aangetoond dat de resultaten verkregen in dit model goed overeenkomen met de verwachte respons bij patiënten.</p> <p>Met de standaard opzet van de experimenten voor optimalisatie van doseringsschema's van middelen is ruime ervaring binnen de onderzoeksgroep.</p> <p>De dierproeven worden uitgevoerd door deskundig personeel. De infectie van de longen en het uiteindelijke doden vinden plaats onder narcose om het ongerief zo veel mogelijk te beperken. Verder wordt pijnstilling toegepast om het ongerief zo veel mogelijk te minimaliseren. De dierproeven waarbij concentraties van de middelen worden bepaald worden relatief kort gehouden, waardoor de infectie zich nog niet ver kan ontwikkelen en het ongerief zo laag mogelijk wordt gehouden. Bovendien wordt het verloop van de infectie van de dieren nauwgezet gevolgd, zodat de dieren bij ernstige ziekteverschijnselen op basis van humane eindpuntcriteria vroegtijdig uit de proef kunnen worden genomen.</p>
<p>Licht de keuze van de soorten en de bijbehorende levensstadia toe</p>	<p>In de in de literatuur omschreven modellen van weefsel- en longinfectie zijn opgezet in jongvolwassen muizen. Om resultaten uit dit project te kunnen vergelijken met resultaten die eerder in deze modellen verkregen zijn, is het belangrijk dezelfde diersoort en levensstadia te gebruiken. Bovendien is aangetoond dat de resultaten verkregen in het weefselinfectiemodel (met jongvolwassen muizen) goed overeenkomen met de verwachte respons bij patiënten.</p>

VOOR EEN BEOORDELING ACHTERAF GESELECTEERD PROJECT

Project geselecteerd voor BA?	ja
Termijn voor BA	31-05-2028
Reden voor de beoordeling achteraf	
Bevat ernstige procedures	ja
Maakt gebruik van niet-menselijke primaten	
Andere reden	
Toelichting van de andere reden voor de beoordeling achteraf	

AANVULLENDE VELDEN

Nationaal veld 1 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 2 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 3 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 4 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 5 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Startdatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Einddatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Goedkeuringsdatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 1 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 2 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 3 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Link naar de eerdere versie van de NTS buiten het EC-systeem	

Van: info@zbo-ccd.nl
Verzonden: maandag 15 augustus 2022 10:19
Aan: 5.1 lid2h 5.1 lid2e
CC: 5.1 lid2e 5.1 lid2h
Onderwerp: Aanhouden AVD 5.1 lid2h 202215947

Geachte 5.1 lid2e

Op 25-03-2022 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Nieuwe (combinatie)therapieën tegen infecties door multiresistente en moeilijk behandelbare bacteriën 2" met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202215947. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In dit bericht leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

Wij hebben de volgende informatie van u nodig om uw aanvraag verder te kunnen beoordelen:

Onduidelijkheden

Uw aanvraag is afgelopen vrijdag besproken in de CCD vergadering. Naar aanleiding van de gevoerde discussie wil de commissie u nog aanvullende vragen stellen:

- De studie is een vervolg op een eerder door de CCD toegewezen project. Kunt u iets toelichten over hoeveel dieren er toen zijn gebruikt in hoeveel verschillende experimenten, wat het ongerief was en waar de resultaten toe geleid hebben (niet alleen in de zin van doorontwikkeling van nieuwe behandelstrategieën maar ook ten aanzien van verfijning van de modellen).
- Verder is de commissie geïnteresseerd in uw motivering voor de gebruikte diersoort en diermodellen, hierbij rekening houdend met de translationele waarde van de modellen. Kunt u hiervoor nog verdere onderbouwing geven?

Zonder deze aanvullende informatie kan de beslissing nadelig voor u uitvallen omdat de gegevens onvolledig of onduidelijk zijn.

Opsturen binnen veertien dagen

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van dit bericht op. U kunt dit aanleveren via NetFTP.

Uw aanvraag zal 2 september opnieuw worden besproken in de CCD vergadering. Wij verzoeken u uiterlijk 25 augustus de ontbrekende informatie in te dienen.

Wanneer een beslissing

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Mocht u vragen hebben, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

5.1 lid2e

www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag

.....
T: 0800 789 0789
E: info@zbo-ccd.nl

Projectnummer: 5.1 lid2h A VD 5.1 lid2h 202215947(2022-007)

Nieuwe (combinatie)therapieën tegen infecties door multiresistente en moeilijk behandelbare bacteriën 2

Onduidelijkheden:

- De studie is een vervolg op een eerder door de CCD toegewezen project. Kunt u iets toelichten over hoeveel dieren er toen zijn gebruikt in hoeveel verschillende experimenten, wat het ongerief was en waar de resultaten toe geleid hebben (niet alleen in de zin van doorontwikkeling van nieuwe behandelstrategieën maar ook ten aanzien van verfijning van de modellen).

Antwoord:

In totaal zijn in het voorgaande project 5237 muizen gebruikt in een groot aantal studies, waarvan 5078 muizen matig en 159 muizen ernstig ongerief hebben ondervonden.

Dit is toegevoegd in het projectvoorstel (vraag 3.1, Wat is er al gedaan?).

Een retrospectieve evaluatie van het voorgaande project is momenteel in voorbereiding. Hierin zullen nadere details over de uitgevoerde studies volgen.

Een inschatting van benodigde aantallen dieren en verwacht ongerief op basis van retrospectieve beoordeling van de voorgaande vergunning is ons inziens niet realistisch. De gebruikte (combinaties van) middelen en hun te onderzoeken effectiviteit bepalen hoeveel muizen een klinisch beeld ontwikkelen en hoeveel muizen de humane eindpunten bereiken en dus kortdurend ernstig ongerief ondervinden. In het huidige project worden andere, effectievere en/of minder succesvolle (combinaties van) middelen gebruikt dan in het voorgaande project, waardoor een inschatting op basis van de voorgaande vergunning een over- of onderschatting kan geven. Deze tekst staat vermeld in beide bijlagen (vraag F).

In de voorgaande vergunning hebben we veel verschillende experimenten gedaan voor 10 bestaande middelen als mono-behandeling, 4 combinaties van bestaande middelen, en voor 1 nieuw middel en verschillende analogen daarvan. Resultaten van enkele studies worden gebruikt als input voor klinische studies die gepland staan.

Naast deze wetenschappelijke en maatschappelijke resultaten zijn de gebruikte modellen in de afgelopen jaren ook verder verfijnd. Er is veel ervaring opgebouwd met de modellen en het infectieverloop na inoculatie van verschillende bacteriespecies en -stammen. Deze ervaring heeft ertoe geleid dat wij als onderzoekers steeds preciezer kunnen inschatten of en wanneer de humane eindpunten bereikt zullen worden binnen de duur van het experiment, waardoor de periode van ernstig ongerief zo kort mogelijk gehouden kan worden. Ook duurden alle studies maximaal 24 uur na start van de behandeling (26 uur na infectie); de halfwaardetijden van de middelen die we hebben onderzocht was niet zodanig lang dat langduriger experimenten (>24 uur na start behandeling) noodzakelijk waren. Hierdoor is de periode van ongerief zo kort mogelijk gehouden. De doseringsfrequentie van de gebruikte middelen is waar mogelijk gekozen op basis van literatuur en aannames op basis van gegevens van vergelijkbare middelen, waardoor zeer frequent doseren (elke 2 uur gedurende 24 uur) slechts in een beperkt aantal gevallen nodig is geweest.

- Verder is de commissie geïnteresseerd in uw motivering voor de gebruikte diersoort en dierspecies, hierbij rekening houdend met de translationele waarde van de modellen. Kunt u hiervoor nog verdere onderbouwing geven?

Antwoord:

Het dijspier- en het longmodel in de neutropene muis zijn modellen die worden aanbevolen in de richtlijnen van het European Medicines Agency (EMA) en zijn internationaal geaccepteerd voor het bepalen van de PK/PD index en de PD target, om doseringen in klinische studies te bepalen. Resultaten behaald in deze modellen worden door het EMA geaccepteerd in het dossier in voorbereiding op klinische studies. Het dijspiermodel is een veelgebruikt en zeer gestandaardiseerd model dat gebruikt wordt om infecties in de weke delen te simuleren. Het longmodel wordt ook veel toegepast, omdat de penetratie van middelen in de longen kan afwijken van die in het bloed, waardoor middelen bij longinfecties verminderd effectief kunnen zijn. Er worden neutropene muizen gebruikt om de pure interactie tussen de bacterie en het antibioticum te bepalen, zonder tussenkomst van het immuunsysteem. De modellen worden internationaal toegepast voor het bepalen van de PK/PD index en de PD target.

Voor de modellen is een directe correlatie tussen de PK/PD indexen in neutropene, geïnfecteerde muizen enerzijds en mensen anderzijds voor verschillende antibiotica (5.1 lid2h, 5.1 lid2e), wat de hoge translationele waarde van de modellen aangeeft.

Bovenstaande stond gedeeltelijk al vermeld in het projectvoorstel (vraag 3.1). De translationele waarde is extra benadrukt in beide bijlagen (vraag B, diersoort).



Formulier

Projectvoorstel dierproeven

- Dit formulier gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
- Bij dit formulier hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
- Meer informatie vindt u in de 'Toelichting op de te gebruiken formulieren voor de aanvraag van een projectvergunning' op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul de titel van het project in.

2 Categorie van het project

- 2.1 In welke categorie valt het project?
- U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.*
- Fundamenteel onderzoek
- Translationeel of toegepast onderzoek
- Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
- Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid of het welzijn van mens of dier
- Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
- Hoger onderwijs of opleiding
- Forensisch onderzoek
- Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

Licht het project toe. Beschrijf de aanleiding, de achtergrond en de context. Besteed aandacht aan de bij vraag 2.1 aangekruiste categorieën.

Het probleem

Antibiotica zijn essentieel bij de behandeling van bacteriële infecties. Echter, dergelijke behandelingen zijn niet in alle gevallen effectief waardoor infecties toch nog gecompliceerd of zelfs fataal kunnen verlopen. Bijkomend probleem is de toegenomen **resistentie** tegen verschillende antibiotica.

In 2017 heeft de Wereldgezondheidsorganisatie een lijst met zogenaamde '**priority pathogens for R&D of new antibiotics**' gepubliceerd. Deze lijst geeft aan voor welke bacteriële infecties nieuwe behandelingen en/of nieuwe antibiotica het meest urgent zijn.

Priority 1 – critical:

- *Acinetobacter baumannii*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Enterobacterales*, waaronder *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*

Priority 2 – high:

- *Enterococcus faecium*
- *Staphylococcus aureus*
- *Helicobacter pylori*
- *Campylobacter* spp
- *Salmonellae*
- *Neisseria gonorrhoeae*

Priority 3 – medium:

- *Streptococcus pneumoniae*
- *Haemophilus influenzae*
- *Shigella* spp

Klinisch gezien worden *K. pneumoniae* en *E. coli* als meest voorkomende veroorzakers van infecties gezien en zijn dus klinisch ook zeer relevant. Dit soort organismen kunnen verschillende soorten infecties geven. Maar meest voorkomend zijn urineweginfecties al dan niet gepaard gaand met bacteremiën. De *Acinetobacters* en *Pseudomonas* zijn vaak betrokken bij ziekenhuisinfecties. Patiënten worden eerst gekoloniseerd door deze organismen en kunnen vervolgens overgaan tot daadwerkelijke infecties. Het is dan ook nodig nieuwe strategieën te ontwikkelen tegen deze en andere organismen op deze lijst van priority pathogens door de toename in resistentie tegen bestaande middelen.

Veel van de antibiotica die we vandaag de dag gebruiken zijn zo'n 60 jaar geleden geïntroduceerd, in een tijd waarin we nog geen gebruik maakten van de **PK/PD** principes om de effectieve dosering vast te stellen. (Meer uitleg over deze PK/PD principes volgt hieronder.) Vandaar dat deze bestaande ("oude"), maar ook nieuwe middelen bestudeerd moeten worden om op grond van de **in vivo effectiviteit** en hun PK/PD relatie nauwkeurig de dosering vast te stellen.

Behalve deze aspecten zijn ook andere aspecten relevant voor de effectiviteit, zoals de bereikbaarheid van deze middelen op verschillende plekken in het lichaam. Bacteriën kunnen zich immers bevinden op een plek in het lichaam waar ze met systemisch toegediende medicatie niet bereikbaar zijn, iets dat ook bij overigens gezonde mensen kan leiden tot een ernstige afloop. Verder hebben tegenwoordig veel patiënten een verminderde afweer omdat ze behandeld worden met medicatie die immunosuppressief werkt (bij indicaties zoals auto-immuunziekten, orgaantransplantatie, kanker) waardoor het immuunsysteem niet voldoende bijdraagt aan de eliminatie van bacteriën. Ook zijn veel bacteriën intrinsiek resistent of resistent geworden tegen antibiotica (selectiedruk) waardoor er een dringende behoefte is aan nieuwe behandelingen. Deze problematiek is niet zozeer het gevolg van medisch handelen in Nederland (terughouden antibioticabeleid en microbiologische monitoring in ziekenhuizen), maar neemt wel toe door royaler medisch gebruik van antibiotica in het buitenland (vaak zonder dat moeite wordt gedaan om verdere verspreiding van resistentie te voorkomen) en is af en toe ook afkomstig uit de dierhouderij. In een in 2016 verschenen rapport in opdracht van de Engelse regering was de eindconclusie dat infecties door bacteriën die resistent zijn tegen bestaande antibiotica binnen enkele decennia de **grootste bedreiging voor de gezondheid** vormen.

Alternatieven voor de huidige gebruikte antibiotica zijn dringend nodig om bacteriële infecties ook in de toekomst te kunnen blijven behandelen. Een alternatief kan zijn het optimaliseren van de doseringsschema's van bestaande middelen ter verbetering van de effectiviteit en ter voorkoming van resistentieselectie tijdens therapie, en het ontwikkelen van doseringsschema's voor nieuwe (combinaties van) middelen (antibiotica en non-antibiotica).

Farmacokinetiek (PK) en farmacodynamiek (PD)

De **optimale dosering** van antibiotica is van belang voor de patiënt, enerzijds voor een effectieve behandeling, en anderzijds ter voorkoming van resistentie van het pathogeen en de normaal aanwezige microflora in en op het lichaam. De optimale dosering van een antibioticum om het gewenste effect te bereiken is afhankelijk van een aantal factoren, waarvan de belangrijkste zijn:

1. De activiteit van het antibioticum. Voor een bacterie wordt deze uitgedrukt in de **MRC (minimaal remmende concentratie)**, in het Engels MIC, minimum inhibitory concentration). Deze wordt eerst *in vitro* bepaald.
2. De wijze waarop het antibioticum de bacterie doodt. Dit kan heel langzaam zijn maar ook heel snel en verschilt per bacteriesoort en, in mindere mate, per bacteriestam (**farmacodynamiek, PD**).
3. De concentraties die bereikt worden in de patiënt (de 'exposure') over de tijd – de concentraties vertonen fluctuaties door de dosering en de eliminatie van het middel (**farmacokinetiek, PK**).
4. De concentratie-effect (exposure-respons) relatie over de tijd, waarbij als effectmaat de mate van doding ('killing') van bacteriën wordt gebruikt ten opzichte van de concentratie van het middel in de patiënt, is afhankelijk van ieder van de drie eerste factoren (**PK/PD**). De PK/PD index is een maat die deze relatie het best omschrijft. Deze geeft inzicht in hoe het optimale doseringsschema eruit ziet: is de totale dagdosis het belangrijkste, of de hoogste concentratie die bereikt kan worden, of moet juist heel vaak gedoseerd worden? Tevens kan de waarde van de PK/PD index bepaald worden die minimaal bereikt dient te worden voor een optimaal effect.

Deze vier factoren samen bepalen uiteindelijk welk doseringsschema voor een antibioticum de hoogste kans op slagen biedt. Door de **PK/PD index** en de waarde ervan te vertalen naar de patiënt kan het optimale doseringsschema in de patiënt worden bepaald. De interactie tussen de genoemde factoren is echter groot en met name het hierboven genoemde punt 4 – de exposure-respons relatie over de tijd, PK/PD – is niet goed voorspelbaar. Hiertoe zijn dierproeven noodzakelijk en de uitkomsten hiervan worden gebruikt om te komen tot aanbevolen doseringsschema's (hoogte, frequentie, duur). Uit de uitkomst van deze proeven kan vastgesteld worden wat de optimale dosering van een middel is en welke bacteriesoorten klinisch gevoelig zijn voor het middel. Dit laatste is uiteraard afhankelijk van de gebruikte dosering: met hogere doseringen kunnen relatief wat minder gevoelige bacteriën vaak nog goed bestreden worden, mits maar duidelijk is hoe precies de exposure-respons relatie in de tijd ligt. Dit wordt samenvattend de 'pharmacodynamic target' genoemd. Dit is de doel-exposure van het antibioticum ten opzichte van de MRC van de bacterie.

Voor deze proefdierstudies past onze afdeling twee beproefde en uitgebreid in de literatuur beschreven infectiemodellen van weefsel- en longinfectie toe om de effectiviteit van (combinaties van) antibiotica en/of non-antibiotica tegen multiresistente en moeilijk behandelbare bacteriën te onderzoeken:

- **Dijspiermodel**
- **Longmodel**

Deze modellen worden aanbevolen in de richtlijnen van het European Medicines Agency (EMA) en zijn internationaal geaccepteerd voor het bepalen van de PK/PD index en de PD target, om doseringen in klinische studies te bepalen. Het EMA moet uiteindelijk het doseringsvoorstel goedkeuren. Onze onderzoeksgroep en internationale partners hebben de ervaring dat resultaten verkregen in deze twee modellen door het EMA geaccepteerd worden in het dossier in voorbereiding op klinische studies. In de 'Guideline on the use of pharmacokinetics and pharmacodynamics in the development of antimicrobial medicinal products' van het EMA staat vermeld: "Most animal models involve mice. In the commonly used neutropenic mouse thigh and lung infection models mice are rendered neutropenic and then infected with an estimated inoculum of colony forming units ... in the thigh or lung that is known to be sufficient for assay sensitivity" Het dijspiermodel is een veelgebruikt en zeer gestandaardiseerd model dat gebruikt wordt om infecties in de weke delen te simuleren. Het longmodel wordt ook veel toegepast, omdat de penetratie van middelen in de longen kan afwijken van die in het bloed, waardoor middelen bij longinfecties verminderd effectief kunnen zijn.

In dit onderzoek worden de richtlijnen van het EMA gevolgd. In deze richtlijnen staat (in grote lijnen) wat voor soort studies gedaan moeten worden voor het bepalen van de PK/PD index en de PD target, maar betreffen geen precieze uitwerking van de studies. Deze richtlijnen voorkomen dat er studies worden gedaan waarvan de resultaten niet worden geaccepteerd voor het klinisch dossier. Welke studies met welke opzetten gedaan moeten worden, is afhankelijk van de reeds beschikbare informatie over het te onderzoeken middel, en van vergelijkbare middelen, met daarbij een duidelijke plaats voor wetenschappelijke overwegingen. (Het onderzoek betreft dus geen wettelijk verplicht onderzoek.)

Wat is er al gedaan?

Dit project is een vervolg op projectvergunning AVD5.1 lid2h "Nieuwe (combinatie)therapieën tegen infecties door multiresistente en moeilijk behandelbare bacteriën". In deze projectvergunning is de farmacokinetiek en -dynamiek van 10 bestaande ("oude") middelen als mono-behandeling, van 4 combinaties van deze middelen, en van 1 nieuw middel en verschillende analogen daarvan in het

dijspier- en/of het longmodel onderzocht. Analyse van de data van de bestaande middelen loopt momenteel. De data-analyse van het nieuwe middel wordt momenteel afgerond, de PK/PD index en target worden bepaald, en deze waarden worden gebruikt als input voor klinische studies die gepland staan. De analogen van dit nieuwe middel bleken soms meer, soms minder succesvol. Door dit te relateren aan onder andere de chemische structuur, verschillende *in vitro* karakteristieken (zoals MRC, maar bijvoorbeeld ook hemolytische activiteit) en *in vivo* tolerantie (onderzoek uitgevoerd door een projectpartner) zijn een beperkt aantal analogen uitgezocht met de meest gunstige eigenschappen geselecteerd voor verder onderzoek.

In dit voorgaande project zijn in totaal 5237 muizen gebruikt, waarvan 5078 muizen matig en 159 muizen ernstig ongerief hebben ondervonden.

Het voorgestelde onderzoek

In dit project zal de effectiviteit van bestaande middelen, van nieuwe middelen (zowel antibiotica als non-antibiotica) en combinaties daarvan, worden onderzocht. Het is niet precies voorspelbaar welke middelen in de komende 5 jaar onderzocht zullen gaan worden. Voor nieuwe middelen is dit mede afhankelijk van de ontwikkelingsprogramma's van derden. Voor oude middelen en/of non-antibiotica zal eerst moeten blijken of er genoeg potentie is van combinaties *in vitro* om aannemelijk te maken dat zij *in vivo* werkzaam zullen zijn.

Deze (combinaties van) middelen zullen volgens de gestandaardiseerde aanpak van het PK/PD onderzoek worden bestudeerd. Dit zullen **bestaande middelen** zijn waarvan geen of zeer beperkte PK/PD data zijn, maar ook **nieuwe middelen** en **non-antibiotica**. Non-antibiotica omvatten bijvoorbeeld middelen die resistentiemechanismen neutraliseren (maar op zichzelf niet antimicrobieel werken) en middelen die niet geregistreerd zijn als antimicrobieel maar mogelijk wel een antibiotisch effect bezitten.

Voor het onderzoek worden middelen geselecteerd waarvan nog niet (volledig) bekend is, op basis van farmacokinetiek en -dynamiek, welke blootstelling er in patiënten minimaal nodig is voor een optimale antibiotische behandeling, waarbij ook het ontstaan van bacteriële resistentie wordt meegenomen.

De keuze voor (combinaties van) middelen wordt gebaseerd op:

- vragen vanuit de kliniek (bepaalde infecties zijn moeilijk te behandelen met de huidige antibiotica en behoeven therapieverbetering); en/of
- vragen van partners/opdrachtgevers met een nieuw middel waarvan nog geen/slechts beperkte PK/PD data beschikbaar is; en/of
- vragen vanuit wetenschappelijke projecten/samenwerkingen.

waarbij centraal staat dat het gaat over verbetering van behandeling van een klinisch relevante infectie die moeilijk behandelbaar is met de nu geregistreerde antibiotica in de toegepaste doseringsschema's.

Entrée criteria die worden gehanteerd bij het uiteindelijke besluit tot uitvoering van een studie zijn:

- De geselecteerde bacteriesoort(en) en antibioticum(combinatie) zijn relevant voor de verbetering van behandeling van klinisch relevante infecties die moeilijk behandelbaar zijn met de nu geregistreerde antibiotica in de toegepaste doseringsschema's.
- Uit *in vitro* onderzoek moet blijken dat het middel of het middel gecombineerd met een antibioticum activiteit vertoont tegen de geselecteerde bacterie.
- Toxiciteits- en/of tolerantiegegevens van het middel moeten beschikbaar zijn.
- De uitkomst van deze studie moet richtinggevend zijn voor (latere) klinische vervolgstudies.

Context

De data die genereerd wordt in deze studies vormt een waardevol deel van de productinformatie van nieuwe (combinaties van) antibiotica en/of non-antibiotica te gebruiken bij bacteriële infecties en geeft een essentieel inzicht bij welke concentraties *in vivo* een middel effectief is. Op basis van deze resultaten kan besloten worden of doorgegaan wordt met klinische studies en/of de optimale dosering in patiënten met infecties worden vastgesteld.

De gegenereerde data zijn ook essentieel om het zogenaamde **klinische breekpunt** te kunnen vaststellen. Het klinisch breekpunt is de grenswaarde van de MRC die medisch microbiologische laboratoria gebruiken om aan te geven of een bacterie gevoelig of resistent is voor een middel. De behandelende arts gebruikt dit om te beoordelen of een middel juist wel of juist niet aan een patiënt kan of moet worden voorgeschreven.

3.2 Doel

3.2.1 Beschrijf het directe en het uiteindelijke doel van het project. Beschrijf de bijdrage van het behalen van het directe doel aan het uiteindelijke doel.

- Indien het directe doel bestaat uit verschillende subdoelstellingen, benoem deze dan hier.

De doelen van dit project zijn:

- A. Het aanpassen van het bestaande dijspier- en longmodel voor nog niet eerder door onze onderzoeksgroep gebruikte klinisch relevante bacteriestammen. Voor een aantal species waarmee onze onderzoeksgroep veel ervaring heeft, zoals *Escherichia coli* en *Klebsiella pneumoniae*, is bekend dat een standaard inoculum leidt tot een reproduceerbare infectie. Voor een aantal andere species, zoals *Pseudomonas aeruginosa* en *Acinetobacter baumannii*, is bekend dat het geschikte inoculum voor een reproduceerbare infectie wel sterk afhankelijk is van de stam waarmee men infecteert. Voor dit soort stammen is een voorafgaande inoculum-finding studie belangrijk.
- B. Het bestuderen van de exposure-response relatie (PK/PD) van (combinaties van) middelen (bestaande en/of nieuwe en/of non-antibiotica) bij multiresistente en moeilijk behandelbare bacteriële infecties om inzicht te verkrijgen in de vraag welke dosering, in welke frequentie en via welke route en hoe lang toegediend moet worden. Deze informatie kan worden gebruikt voor het opzetten van klinische trials.

Het **uiteindelijke doel** is:

Inzicht in de exposure-response relaties van deze (combinaties van) middelen zal uiteindelijk leiden tot verbetering en optimalisering van de behandeling van multiresistente en moeilijk behandelbare bacteriële infecties.

Welke middelen we precies zullen gaan onderzoeken in het dijspier- en in het longmodel is nog niet bekend, omdat de *in vitro* studies met verschillende (combinaties van) middelen momenteel volop gaande zijn. Hierbij wordt vaak **5.1 lid1c** gebruikt. Het is zeer waarschijnlijk dat we dit middel dan ook in onze proefdiermodellen gaan onderzoeken. Andere middelen of combinaties zijn op dit moment nog niet bekend. Voor het onderzoek worden middelen geselecteerd waarvan nog niet (volledig) bekend is, op basis van farmacokinetiek en -dynamiek, welke blootstelling er in patiënten minimaal nodig is voor een optimale antibiotische behandeling, waarbij ook het ontstaan van bacteriële resistentie wordt meegenomen.

In de komende 5 jaar verwachten we per proefdiermodel 10 middelen als mono-behandeling en 5 combinaties van middelen (2 antibiotica gecombineerd of een antibioticum gecombineerd met remmers van beta-lactamase enzymen) te onderzoeken, voor klinisch relevante bacteriële infecties. We verwachten dat van deze middelen er 3 succesvol zullen zijn in onze dierproeven. Deze potentieel succesvolle (combinaties van) middelen kunnen vervolgens onderzocht worden in klinische studies.

3.2.2 Hoe wordt de haalbaarheid van het directe doel gewaarborgd?

Onze afdeling en onderzoeksgroep hebben jarenlange ervaring met dit soort onderzoek aan multiresistente en moeilijk behandelbare bacteriën en onderzoek met muizen, zodat haalbaarheid zeer waarschijnlijk is. Er is reeds uitgebreide ervaring binnen de onderzoeksgroep met de voorgestelde proeven en de benodigde faciliteiten en kennis om de doelstellingen te bereiken zijn aanwezig, zoals kennis van basale en moleculaire microbiologie, immunologie, en pathologie. Technieken zoals kweek van bacteriën, bepaling van antibioticumspiegels, etc. zijn allen operationeel en ook gestandaardiseerd. Daarnaast is in de faciliteit waar de proeven zullen worden uitgevoerd alle benodigde kennis over proefdieren aanwezig en ook de voorzieningen voor biologische veiligheid. Onze afdeling opereert binnen zeer sterke nationale en internationale samenwerkingsverbanden. Het voorgestelde onderzoek is wetenschappelijk getoetst binnen het kader van de projecten.

3.2.3 Is voor de uitvoering van dit project andere wet- en regelgeving van toepassing die een invloed zou kunnen hebben op het welzijn van de dieren en/of de haalbaarheid van het directe doel?

Nee

Ja > Geef aan welke wet- en regelgeving van toepassing is en beschrijf de effecten daarvan op het welzijn van de dieren en de haalbaarheid van het project.

3.3 Belang

3.3.1 Beschrijf het wetenschappelijk en/of maatschappelijk belang van de hierboven beschreven doelen.

Sociale relevantie

Door de wereldwijd toenemende mate van resistentie van bacteriën is behandeling van patiënten met infecties veroorzaakt door deze multiresistente bacteriën niet altijd meer goed mogelijk, met soms zelfs overlijden tot gevolg. Vanwege deze problematiek wordt er gezocht naar wegen om enerzijds behandeling van dergelijke multiresistente en moeilijk behandelbare infecties toch mogelijk te maken en om anderzijds resistentievorming te voorkomen of te omzeilen. Door het bestuderen van de exposure-respons relatie van (combinaties van) middelen in het *in vivo* dijspier- en/of longinfectiemodel kan het beste doseringsschema van (combinaties van) middelen voor latere klinische studies in patiënten met multiresistente en moeilijk behandelbare infecties bepaald worden. Zo hopen wij de behandeling van infecties door multiresistente en moeilijk behandelbare bacteriën te kunnen verbeteren en te optimaliseren.

Wetenschappelijke relevantie

Er zijn wel methoden ontwikkeld om de PK/PD relaties van antimicrobiële middelen te bestuderen, maar methoden om het *in vivo* effect van non-antibiotica en combinaties te bepalen zijn niet beschikbaar. In dit project worden deze methoden ontwikkeld en verder geoptimaliseerd. Door studies uit te voeren in zowel het dijspier- als het longmodel kunnen we bovendien de doseringsschema's bij verschillende soorten infecties onderzoeken. Door het ontwikkelen van computermodellen op basis van de resultaten van de experimenten wordt getracht het effect van de (combinaties van) middelen steeds beter te kunnen voorspellen.

3.3.2 Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden wat hun belang is.

De belanghebbenden bij de uitvoering van dit project:

- De proefdieren die gebruikt moeten worden om de projectdoelen te behalen. Zij hebben er belang bij de infecties en behandelingen niet te ondergaan, zodat hun welzijn niet wordt aangetast.
- Onze afdeling en onze onderzoeksgroep. Zij zijn geïnteresseerd in onderzoek naar de effectiviteit van bestaande en nieuwe middelen voor de behandeling van multiresistente en moeilijk behandelbare bacteriële infecties, en voeren de studies uit en publiceren hierover in internationale wetenschappelijke tijdschriften.
- Patiënten met multiresistente en moeilijk behandelbare infecties. Wanneer doseringsschema's van bestaande en nieuwe middelen zijn geoptimaliseerd, kunnen zij beter (effectiever) behandeld worden.
- Samenwerkende partners (industrie, academische partners). Het kan zijn dat partners middelen leveren om onderzocht te worden, en zij leveren data over bijvoorbeeld toxiciteit, tolerantie, en/of *in vitro*. Zij zijn geïnteresseerd in de effectiviteit van deze middelen tegen multiresistente en moeilijk behandelbare infecties. Industriële partners hebben ook commerciële belangen en kunnen onze studies financieren. Hiermee zijn zij mede bepalend in de keuze van de te onderzoeken (combinaties van) middelen.

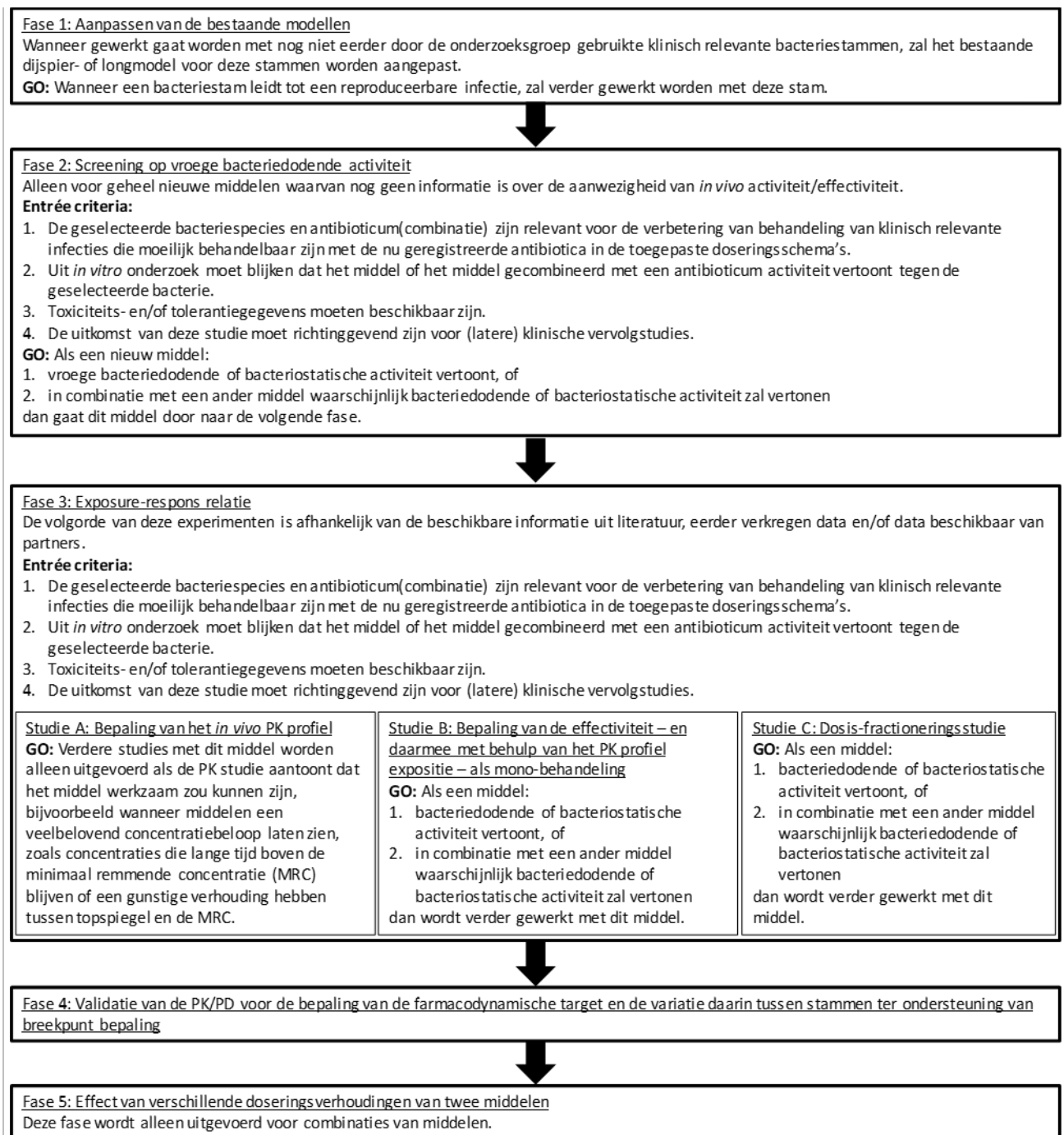
3.4 Strategie

3.4.1 Geef een overzicht van de algemene opzet van het project. Besteed aandacht aan de eventuele fasering in de uitvoering en de samenhang. Vermeld eventuele mijlpalen, keuzemomenten en besliscriteria.

In deze studies wordt een duidelijk gefaseerde en gestandaardiseerde aanpak toegepast om de projectdoelen te behalen.

Als eerste zal ***in vitro* onderzoek** plaatsvinden, waaronder bijvoorbeeld MRC-bepalingen en time-kill curves. Kandidaat (combinaties van) middelen hiervoor worden geselecteerd door de onderzoeksgroep, door consortia binnen welke deze studies plaatsvinden en op basis van vraag door externe partners. Bacteriesoorten worden gekozen op basis van klinische relevantie, bestaande literatuur en verwachte werkingsmechanismen van de middelen. Op basis van de resultaten van deze *in vitro* studies wordt een keuze gemaakt voor (combinaties van) middelen die potentieel effectief kunnen zijn om vervolgens in proefdieren te onderzoeken. In het proefdieronderzoek worden die bacteriesoorten gebruikt waarbij *in vitro* activiteit gevonden wordt.

De *in vitro* karakterisering van een nieuw middel of combinatie zullen we voornamelijk zelf uitvoeren. Daarnaast kunnen data worden aangeleverd door derden, maar deze zullen door onszelf gevalideerd worden. Deze karakterisering kan bijvoorbeeld bepaling van de minimaal remmende concentraties van de middelen zijn, een checkerboard assay met een zeer uitgebreid panel aan bacteriestammen (verschillende bacteriespecies en verschillende stammen binnen het species en verschillende resistentiemechanismen), of time-kill experimenten waarin is aangetoond dat een (combinatie van) middelen *in vitro* groeiremmende activiteit vertoont. In de *in vitro* experimenten zullen alleen concentraties worden gebruikt die uiteindelijk haalbaar zijn in de patiënt en niet toxisch (in dier en mens). Als hieruit blijkt dat middelen additief of synergistisch werken, dan kunnen hierna *in vivo* experimenten starten. Een vereiste voordat gestart wordt met het proefdieronderzoek is dat toxiciteits- en/of tolerantiegegevens van de middelen beschikbaar zijn (gegenereerd door anderen).



Figuur. Verschillende fases en studies in het project.

In de studies wordt met neutropene muizen gewerkt omdat de meeste pathogenen voor de mens – zoals *Pseudomonas aeruginosa* – niet pathogeen zijn voor de immuuncompetente muis. In een immuuncompetente muis zal niet/nauwelijks een infectie optreden. Daarom zal het gebruik van een immuuncompetente muis een grote overschatting van het effect geven dat het middel bij de mens zou hebben. Daarnaast is ook de primaire vraag: wat is het effect van het middel zonder interferentie van een immuunsysteem?

Bij het **proefdieronderzoek** (zie figuur hierboven) wordt – indien gewerkt gaat worden met nog niet eerder door onze onderzoeksgroep gebruikte klinisch relevante bacteriestammen – het bestaande dijspier- en longmodel aangepast. Voor een aantal species waarmee onze onderzoeksgroep veel ervaring

heeft, zoals *Escherichia coli* en *Klebsiella pneumoniae*, is bekend dat een standaard inoculum leidt tot een reproduceerbare infectie. Voor een aantal andere species, zoals *Pseudomonas aeruginosa* en *Acinetobacter baumannii*, is bekend dat het geschikte inoculum voor een reproduceerbare infectie stam-afhankelijk is. Voor dit soort species is een **inoculum-finding studie** (welk inoculum leidt tot een reproduceerbare infectie in het toegepast model?) belangrijk.

Zodra de proefdiermodellen zijn geoptimaliseerd, kan de aanpak gevolgd worden die nodig is in voorbereiding op klinische studies, zoals omschreven in de richtlijnen van de EMA. In de komende 5 jaar verwachten we per proefdiermodel 10 middelen als mono-behandeling en 5 combinaties van middelen te onderzoeken. Sommige middelen of combinaties zullen alleen in het dijspiermodel of alleen in het longmodel worden onderzocht, terwijl andere middelen in beide modellen bestudeerd zullen worden. De keuze hiervoor is afhankelijk van de (beoogde) indicatie voor het middel of de combinatie van middelen. Wanneer de indicatie van het middel de behandeling van pneumonieën betreft, zal het longmodel worden toegepast. Echter, voor sommige middelen of klassen is bekend dat de weefselpenetratie in de long laag is; deze middelen worden uiteraard niet in het longmodel bestudeerd. Wanneer de indicatie anders dan pneumonie is, dan zal het middel in het dijspiermodel worden toegepast. Wanneer de precieze indicatie nog niet bekend is (het middel heeft *in vitro* of *in vivo* activiteit laten zien tegen een moeilijk behandelbare bacterie, maar bijv. de longpenetratie is nog niet bekend), worden beide modellen toegepast. Omdat gebrek aan effectiviteit van een middel bij de ene indicatie effectiviteit van datzelfde middel bij een andere indicatie niet uitsluit, worden in dat geval beide modellen naast elkaar toegepast. Door toepassing van de GO/NO GO-criteria vallen middelen zonder effectiviteit in een van beide modellen af in een vroege fase, zonder daarbij alle fases in dat model te doorlopen.

Voor geheel nieuwe middelen wordt gestart met een **screening op vroege bacteriedodende activiteit**. Zonder bacteriedodende of –remmende activiteit (of wanneer niet verwacht wordt dat het middel in combinatie met een ander middel bacteriedodende of –remmende activiteit zal vertonen) zal een dergelijk middel niet verder *in vivo* worden onderzocht.

Voor alle (combinaties van) middelen wordt de **farmacokinetiek (PK)** en de **farmacodynamiek (PD)**, en de relatie hiertussen (**PK/PD**) bepaald.

Het *in vivo* **PK profiel** (de blootstelling, exposure) wordt voor verschillende doses bepaald na een eenmalige gift van de middelen (of indien strikt noodzakelijk na meerdere toedieningen) in het dijspier- en/of het longinfectiemodel. Het PK profiel wordt in geïnfecteerde dieren bepaald, omdat infectie het concentratiebeloop van middelen kan beïnvloeden. Wanneer het PK profiel in een niet-geïnfecteerd dier zou worden bepaald, kan geen goede exposure-respons relatie worden vastgesteld.

Ook wordt de exposure-response relatie over de tijd bepaald. Op basis van de resultaten van de *in vitro* assays en van het (te verwachten of aangetoonde) PK profiel in de muis worden doseringsschema's gekozen. Hierbij wordt de **effectiviteit van middelen als mono-behandeling** bepaald, en zal een **dosis-fractioneringsstudie** worden uitgevoerd, waarbij verschillende doseringsfrequenties van een middel of combinatie worden vergeleken.

De **farmacodynamische target** en de variatie daarin tussen bacteriestammen wordt vervolgens bepaald ter ondersteuning van de breekpunt bepaling.

In geval van combinaties wordt tot slot een *in vivo* **checkerboard assay** gedaan met verschillende doseringsschema's voor beide middelen, voor verschillende bacteriestammen.

Door de gefaseerde aanpak vallen (combinaties van) middelen zonder potentie om in de patiënt werkzaam te kunnen zijn, af in een vroege fase van het onderzoek, waardoor het aantal benodigde proefdieren beperkt kan worden, en komt waardevolle data over succesvolle (combinaties van) middelen beschikbaar. Niet alle (combinaties van) middelen zullen succesvol zijn.

We verwachten dat van de 10 middelen als mono-behandeling en 5 combinaties van middelen er 3 succesvol zullen zijn in onze dierproeven. Deze potentieel succesvolle (combinaties van) middelen kunnen vervolgens onderzocht worden in klinische studies.

Op basis van deze informatie kan besloten worden of de (combinatie van) middelen waardevol genoeg is om een zeer dure **klinische studie** te starten. Het is zeer belangrijk dat het infectiemodel in het dier (aspecten van) de humane infectie zo veel mogelijk reproduceert, voor de veiligheid van de proefpersonen/patiënten, om proefpersonen/patiënten niet onnodig te belasten met middelen die uiteindelijk niet voldoende nuttig blijken, en vanwege de zeer hoge kosten van klinische studies.

Fase 1: Aanpassen van de bestaande modellen

Indien nodig worden de bestaande modellen van dijspier- en longinfectie aangepast voor klinisch relevante bacteriestammen. Er zal bepaald worden welk inoculum leidt tot een reproduceerbare infectie.

GO: Wanneer een bacteriestam leidt tot een reproduceerbare infectie, zal verder gewerkt worden met deze stam.

In alle gevallen gelden onderstaande **entree criteria** voor fase 2 (nieuwe middelen) respectievelijk fase 3 (bestaande middelen):

- De geselecteerde bacteriesoort en antibioticum (combinatie) zijn relevant voor de verbetering van behandeling van klinisch relevante infecties die moeilijk behandelbaar zijn met de nu geregistreerde antibiotica in de toegepaste doseringsschema's.
- Uit *in vitro* onderzoek moet blijken dat het middel of het middel gecombineerd met een antibioticum activiteit vertoont tegen de geselecteerde bacterie, en
- Toxiciteits- en/of tolerantiegegevens moeten beschikbaar zijn.
- De uitkomst van deze studie moet richtinggevend zijn voor (latere) klinische vervolgstudies.

Fase 2: Screening op vroege bacteriedodende activiteit

Alleen voor geheel nieuwe middelen waarvan bij ons of bij partners nog geen informatie is over de aanwezigheid van *in vivo* activiteit/effectiviteit worden screeningsexperimenten uitgevoerd.

Van sommige middelen wordt niet verwacht dat ze zelf actief zijn tegen een bacteriële infectie, of slechts beperkt, zoals remmers van beta-lactamase enzymen. Het is wel belangrijk te weten of deze middelen vroege bacteriedodende activiteit hebben, om in vervolgstudies te kunnen kijken naar de synergie van zo'n middel met een bestaand middel.

GO: Als een nieuw middel:

1. vroege bacteriedodende of bacteriostatische activiteit vertoont, of
2. in combinatie met een ander middel waarschijnlijk bacteriedodende of bacteriostatische activiteit zal vertonen (bijvoorbeeld in geval van een antibioticum gecombineerd met remmers van beta-lactamase enzymen, waarvan de laatste meestal zelf geen activiteit hebben)

dan gaat dit middel door naar de volgende fase.

Door uitvoering van deze proef met een klein aantal dieren wordt een eerste indruk gekregen of het nieuwe middel *in vivo* werkzaam kan zijn. Als dit niet het geval is, hoeven geen uitgebreide PK en PD studies gedaan te worden. Dit voorkomt onnodig gebruik van proefdieren.

Fase 3: Exposure-respons relatie

In deze fase worden het *in vivo* PK profiel en de effectiviteit van middelen (met een vaste doseringsfrequentie of met verschillende doseringsfrequenties) bepaald en aan elkaar gerelateerd. De volgorde van deze experimenten is afhankelijk van de beschikbare informatie uit literatuur, eerder verkregen data en/of data beschikbaar van partners. Wanneer er bijvoorbeeld al concrete aanwijzingen zijn over het PK profiel van een middel, dan zal eerst naar de effectiviteit van het middel gekeken worden, en later alsnog naar het PK profiel (in hetzelfde proefdiermodel). Wanneer er al duidelijkheid is over de meest geschikte doseringsfrequentie van het middel, dan zal een dosis-fractioneringsstudie (met verschillende doseringsfrequenties van het middel) minder prioriteit hebben, en pas na bepaling van het PK profiel en de effectiviteit (met een vaste doseringsfrequentie van het middel) worden geconfirméerd. Na elke studie volgt wel een GO/NO GO moment waarop bepaald wordt of het zinvol is om door te gaan met de andere studies in deze fase.

Studie A: Bepaling van het *in vivo* PK profiel

GO: Verdere studies met dit middel worden alleen uitgevoerd als de PK studie aantoont dat het middel werkzaam zou kunnen zijn, bijvoorbeeld wanneer middelen een veelbelovend concentratiebeloop laten zien, zoals concentraties die lange tijd boven de minimaal remmende concentratie (MRC) blijven of een gunstige verhouding hebben tussen topspiegel en de MRC.

Op basis van de resultaten van de *in vitro* assays en van het (te verwachten of aangetoonde) PK profiel in het dier worden doseringsschema's gekozen voor studies naar de effectiviteit van middelen.

Studie B: Bepaling van de effectiviteit van middelen – en daarmee met behulp van het PK profiel expositie – als mono-behandeling

Deze studies worden uitgevoerd voor zowel antibiotica als non-antibiotica. Ook voor deze laatste groep zijn deze studies zinvol, zeker wanneer het gaat om middelen die niet geregistreerd zijn als

antimicrobieel maar mogelijk wel een antibiotisch effect bezitten. Ook voor middelen die bijvoorbeeld resistentiemechanismen remmen zijn deze studies zinvol, want als zij op zichzelf toch enige bacteriedodende of bacteriostatische activiteit vertonen, moet hier rekening mee worden gehouden in combinatie-behandeling. Wanneer een non-antibioticum zelf een antimicrobieel effect heeft en dit wordt niet afzonderlijk getest, dan wordt het effect hiervan onterecht toebedeeld aan het combinatiemiddel. Om de goede verhouding tussen de twee middelen te kunnen bepalen is van belang te weten welk deel van de effectiviteit aan welk van de middelen toe te schrijven is. Wanneer een antibioticum wordt gecombineerd met een middel zonder op zichzelf staande antibacteriële activiteit, dan worden bijvoorbeeld vaste doseringsverhoudingen van de twee middelen gebruikt, of een vaste dosis van het antibioticum. Wanneer beide middelen antibacterieel werken, dan wordt de matrix complexer, doordat doseringen van beide middelen kunnen variëren. Met non-antibiotica waarvan bekend is dat ze geen antimicrobiële werking hebben, zullen geen mono-behandelingen worden gedaan.

GO: Als een middel:

1. bacteriedodende of bacteriostatische activiteit vertoont, of
2. in combinatie met een ander middel waarschijnlijk bacteriedodende of bacteriostatische activiteit zal vertonen (bijvoorbeeld in geval van een antibioticum gecombineerd met remmers van beta-lactamase enzymen, waarvan de laatste meestal zelf geen activiteit hebben)

dan wordt verder gewerkt met dit middel.

Studie C: Dosis-fractioneringsstudie

GO: Als een middel:

1. bacteriedodende of bacteriostatische activiteit vertoont, of
2. in combinatie met een ander middel waarschijnlijk bacteriedodende of bacteriostatische activiteit zal vertonen (bijvoorbeeld in geval van een antibioticum gecombineerd met remmers van beta-lactamase enzymen, waarvan de laatste meestal zelf geen activiteit hebben)

dan wordt verder gewerkt met dit middel.

Fase 4: Validatie van de PK/PD voor de bepaling van de farmacodynamische target en de variatie daarin tussen stammen ter ondersteuning van breekpunt bepaling

In deze fase worden de gegevens verkregen in eerdere fases gevalideerd met behulp van een meer uitgebreid panel aan bacteriestammen. Ook wordt gekeken naar de variatie tussen stammen.

Het klinisch breekpunt is de grenswaarde van de MRC (Minimaal Remmende Concentratie) die medisch microbiologische laboratoria gebruiken om aan te geven of een bacterie gevoelig of resistent is voor een middel. De behandelende arts gebruikt dit om te beoordelen of een middel juist wel of juist niet aan een patiënt kan of moet worden voorgeschreven. Het is belangrijk dat de PD target van een middel daarom bepaald wordt op basis van studies met een voldoende uitgebreid panel aan relevante bacteriestammen voor dit middel, die het gehele klinische spectrum – van gevoelig naar ongevoelig/resistent, met of zonder resistentiemechanismen – vertegenwoordigen.

Fase 5: Effect van verschillende doseringsverhoudingen van twee middelen

Deze fase wordt alleen uitgevoerd voor combinaties van middelen.

3.4.2 Onderbouw de gekozen strategie.

Voordat gestart wordt met het bestuderen van de exposure-respons relatie van (combinaties van) middelen zal – indien gewerkt gaat worden met bacteriestammen waarmee onze onderzoeksgroep nog geen ervaring heeft – het dijspier- en/of het longmodel worden aangepast voor deze stammen. Er wordt een inoculum “getitreerd” dat leidt tot een reproduceerbare infectie. (Fase 1; Doel A.) Dit voorkomt dat muizen met een bacteriestam waarmee nog geen ervaring is, worden geïnfecteerd met een inoculum dat te hoog of te laag is, en dus te veel of geen ziekte veroorzaakt (verfijning). Ook voorkomt het zo veel mogelijk dat geen conclusies uit experimenten getrokken kunnen worden omdat het inoculum en daarmee de infectiegraad niet juist is geweest (vermindering).

Vervolgens zullen deze (combinaties van) middelen volgens de gestandaardiseerde aanpak van het PK/PD onderzoek worden bestudeerd (Fase 2-5, Doel B). Deze aanpak staat omschreven in de aanbevelingen van het EMA en borgt dat deze studieresultaten in latere fases worden geaccepteerd door EMA voor het klinisch dossier.

Voor geheel nieuwe middelen waarover nog geen informatie bekend is *in vivo* en die in *in vitro* assays een antimicrobiële werking laten zien, wordt allereerst een screeningsexperiment uitgevoerd (fase 2).

Van nieuwe antibiotica is meestal nog helemaal geen of uiterst beperkte *in vivo* data bekend met betrekking tot de werkzaamheid, maar vaak wel het toxiciteits- en/of tolerantieprofiel. Daarom wordt voor geheel nieuwe middelen (mits een toxiciteits- of tolerantieprofiel beschikbaar) eerst bestudeerd of het nieuwe middel voldoende *in vivo* activiteit heeft in deze fase en het dus verantwoord is om de verdere proeven met grotere aantallen doseringen en dieren uit te gaan voeren. Dit voorkomt dat uitgebreide studies naar PK en PD gedaan worden met middelen die later zullen afvallen. Voor middelen waarover al wel informatie bekend is, zal deze fase worden overgeslagen.

Alle middelen doorlopen de vervolgfases (3 en 4 voor mono-behandeling, 3-5 voor combinaties van middelen), zo lang als ze voldoen aan de GO/NO GO criteria.

In fase 3 worden 3 verschillende studies uitgevoerd. De volgorde van deze studies is afhankelijk van de beschikbare informatie uit literatuur, eerder verkregen data en/of data beschikbaar van partners. Wanneer er bijvoorbeeld al concrete aanwijzingen zijn over het PK profiel van een middel, dan zal eerst naar de effectiviteit van het middel gekeken worden, en later alsnog naar het PK profiel (in hetzelfde proefdiermodel). Wanneer er al duidelijkheid is over de meest geschikte doseringsfrequentie van het middel, dan zal een dosis-fractioneringsstudie (met verschillende doseringsfrequenties van het middel) minder prioriteit hebben, en pas na bepaling van het PK profiel en de effectiviteit (met een vaste doseringsfrequentie van het middel) worden geconfirmeerd.

Ook als er bijvoorbeeld al data beschikbaar is over de doseringsfrequentie van een middel zal deze in onze modellen worden geconfirmeerd, maar is het niet nodig dit voor even veel bacteriestammen te doen als voor een middel waarvan nog geen aanwijzingen zijn over de doseringsfrequentie.

Wanneer op basis van de studies in fase 3 de PK/PD index is bepaald, is het belangrijk te valideren of dit ook geldt voor een uitgebreider bacterie-stammenpanel met verschillende gevoeligheden en verschillende resistentiemechanismen, die in de kliniek voorkomen (fase 4). Bovendien kan de PD target (de grootte van de PK/PD index) pas worden bepaald op een uitgebreider panel aan bacteriestammen.

Voor combinaties van middelen zal tot slot een *in vivo* checkerboard studie worden uitgevoerd, waarbij de doseringsverhoudingen van de twee middelen verschillen. In de voorgaande fases wordt, in geval van combinaties van middelen, een vaste doseringsverhouding gebruikt. Echter, de effectiviteit van een combinatie van middelen kan vergroot worden wanneer de verhouding van de doseringen anders is. Dit wordt tot slot in fase 5 bestudeerd.

Wanneer deze fasen doorlopen zijn, kunnen de PK/PD index en target bepaald worden, die dienen als input voor klinische studies.

Om wetenschappelijke conclusies te kunnen verbinden aan het onderzoek naar nieuwe therapieën voor de behandeling van multiresistente en moeilijk behandelbare bacteriën is het noodzakelijk dat per studie een groep dieren (bijv. placebo-behandeling, behandeling met een lage dosering van een middel) een hoge bacteriële load in de dijspier of de longen krijgt, om een effectieve (bacteriedodende) dosering, dus met een lage bacteriële load, van een middel tegen af te kunnen zetten. Alleen op deze manier kan de dosering en de PK/PD index en target die nodig is voor bacteriostasis (geen bacteriegroei) en voor afdoding van de bacteriën bepaald worden. Deze groep dieren met een hoge bacteriële load kan (afhankelijk van de gebruikte bacteriestam, want niet alle bacteriestammen leiden tot een ernstige klinische infectie bij een hoge bacteriële load) leiden tot ernstig ongerief.

De duur van dit ernstig ongerief wordt zo veel als mogelijk bekort door het in acht nemen van de humane eindpunten, zoals beschreven in beide bijlagen (vraag E, humane eindpunten). Kortdurend ernstig ongerief is noodzakelijk om wetenschappelijke conclusies te kunnen trekken uit dit onderzoek.

3.4.3 Benoem de type dierproeven. Vul per type dierproef een bijlage Beschrijving dierproeven in.

Volgnummer	Titel bijlage Beschrijving dierproef
1	Dijspiermodel
2	Longmodel
3	
4	
5	
6	

7	
8	
9	
10	



Bijlage

Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u in de 'Toelichting op de te gebruiken formulieren voor de aanvraag van een projectvergunning' op de website www.centralecommissiedierproeven.nl
- Of neem telefonisch contact op (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in. 5.1 lid2h
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in. 5.1 lid2h
- 1.3 Vul het volgnummer en de titel van de dierproef in.
- | Volgnummer | Titel dierproef |
|------------|-----------------|
| 1 | Dijspiermodel |

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.3 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

Middelen en combinaties van middelen zullen volgens de gestandaardiseerde aanpak van het PK/PD onderzoek worden bestudeerd, in het dijspier- en/of het longmodel. In deze modellen wordt gebruik gemaakt van neutropene muizen, zoals ook in de richtlijnen van het EMA beschreven. Deze bijlage beschrijft het dijspiermodel.

In de studies wordt met neutropene muizen gewerkt omdat de meeste pathogenen voor de mens – zoals *Pseudomonas aeruginosa* – niet pathogeen zijn voor de immuuncompetente muis. Het gebruik van een immuuncompetente muis geeft daarom een grote overschatting van het effect dat het middel bij de mens zou hebben. Daarnaast is ook de primaire vraag: wat is het effect van het middel zonder interferentie van een immuunsysteem?

Wanneer gewerkt gaat worden met nog niet eerder door de onderzoeksgroep gebruikte klinisch relevante bacteriestammen, zal het bestaande en in de literatuur uitgebreid beschreven dijspiermodel voor deze stammen worden aangepast. De onderzoeksgroep heeft veel ervaring met een ruim aantal species, waaronder *Escherichia coli* en *Klebsiella pneumoniae*. Voor deze species is bekend dat een standaard inoculum leidt tot een reproduceerbare infectie. Voor een aantal andere species, zoals *Pseudomonas aeruginosa* en *Acinetobacter baumannii*, is bekend dat het geschikte inoculum voor een reproduceerbare infectie stam-afhankelijk is.

Fase 1. Aanpassen van de bestaande modellen

Indien nodig wordt het bestaande dijspiermodel aangepast voor klinisch relevante bacteriestammen. Er zal bepaald worden welk inoculum leidt tot een reproduceerbare infectie.

Primaire uitkomstparameter: het ontstaan van een reproduceerbare infectie, waarbij de inter-individuele variatie beperkt is, waarbij de bacteriële load voldoende hoog is, maar die niet leidt tot ernstige sepsis.

GO: Wanneer een bacteriestam leidt tot een reproduceerbare infectie, zal verder gewerkt worden met deze stam.

Na deze aanpassing zal gestart worden met het daadwerkelijke PK/PD onderzoek. Voor geheel nieuwe middelen zal gestart worden met fase 2. Voor alle andere middelen zal gestart worden met fase 3.

In alle gevallen gelden onderstaande entrée criteria voor fase 2 (nieuwe middelen) respectievelijk fase 3 (bestaande middelen):

- De geselecteerde bacteriespecies en antibioticum(combinatie) zijn relevant voor de verbetering van behandeling van klinisch relevante infecties die moeilijk behandelbaar zijn met de nu geregistreerde antibiotica in de toegepaste doseringsschema's.
- Uit *in vitro* onderzoek moet blijken dat het middel of het middel gecombineerd met een antibioticum activiteit vertoont tegen de geselecteerde bacterie, en
- Toxiciteits- en/of tolerantiegegevens moeten beschikbaar zijn.
- De uitkomst van deze studie moet richtinggevend zijn voor (latere) klinische vervolgstudies.

Fase 2. Screening op vroege bacteriedodende activiteit

Alleen voor geheel nieuwe middelen waarvan nog geen informatie is over de aanwezigheid van *in vivo* activiteit/effectiviteit worden screeningsexperimenten uitgevoerd naar de vroege bacteriedodende activiteit. Neutropene, geïnfekteerde muizen worden behandeld met het middel, per os of parenteraal, de route die het meest passend is op basis van verwachtingen aan de hand van bijvoorbeeld de structuur of antibioticum-klasse (meestal SC, IM, IV, IP of soms per maagsonde). Daarbij wordt het maximaal toe te dienen volume voor die route in acht genomen (Principles of Laboratory Animal Science revised edition, Van Zutphen 2001, tabel 16-1).

Primaire uitkomstparameter: bacteriële load in de dijspier in behandelde vs onbehandelde muizen.

GO: Als een nieuw middel:

1. vroege bacteriedodende of bacteriostatische activiteit vertoont, of
2. in combinatie met een ander middel waarschijnlijk bacteriedodende of bacteriostatische activiteit zal vertonen (bijvoorbeeld in geval van een antibioticum gecombineerd met remmers van beta-lactamase enzymen, waarvan de laatste meestal zelf geen activiteit hebben)

dan gaat dit middel door naar de volgende fase.

Door uitvoering van deze proef met een klein aantal dieren wordt een eerste indruk gekregen of het nieuwe middel *in vivo* werkzaam kan zijn. Als dit niet het geval is, hoeven geen uitgebreide PK en PD studies gedaan te worden. Dit voorkomt onnodig gebruik van proefdieren.

Fase 3: Exposure-respons relatie

In deze fase worden het *in vivo* PK profiel en de effectiviteit van middelen (met een vaste doseringsfrequentie of met verschillende doseringsfrequenties) bepaald en aan elkaar gerelateerd. De volgorde van deze experimenten is afhankelijk van de beschikbare informatie uit literatuur, eerder verkregen data en/of data beschikbaar van partners. Wanneer er bijvoorbeeld al concrete aanwijzingen zijn over het PK profiel van een middel, dan zal eerst naar de effectiviteit van het middel gekeken worden, en later alsnog naar het PK profiel (in hetzelfde proefdiermodel). Wanneer er al duidelijkheid is over de meest geschikte doseringsfrequentie van het middel, dan zal een dosis-fractioneringsstudie (met verschillende doseringsfrequenties van het middel) minder prioriteit hebben, en pas na bepaling van het PK profiel en de effectiviteit (met een vaste doseringsfrequentie van het middel) worden geconfirmeerd.

Na elke studie binnen deze fase volgt een GO/NO GO moment waarop bepaald wordt of het zinvol is om door te gaan met de andere studies in deze fase, of naar de volgende fase. De GO/NO GO-criteria zijn onderstaand per studie vermeld.

Studie A: Bepaling van het *in vivo* PK profiel

Voor alle (combinaties van) middelen wordt het PK profiel (concentraties van het middel in de tijd bij verschillende doses) bepaald. Neutropene, geïnfekteerde muizen worden éénmalig (of, in specifieke situaties, meerdere malen, maximaal 3 keer) behandeld, waarna op verschillende tijdstippen de muizen worden gedood om het concentratieverloop van het middel te bepalen.

Primaire uitkomstparameter: concentratie van het middel in de loop van de tijd.

GO: Verdere studies met dit middel worden alleen uitgevoerd als de PK studie aantoont dat het middel werkzaam zou kunnen zijn, bijvoorbeeld wanneer middelen een veelbelovend concentratiebeloop laten zien, zoals concentraties die lange tijd boven de minimaal remmende concentratie (MRC) blijven of een gunstige verhouding hebben tussen topspiegel en de MRC.

Op basis van de resultaten van de *in vitro* assays en van het (te verwachten of aangetoonde) PK profiel in het dier worden doseringsschema's gekozen voor studies naar de effectiviteit van middelen.

Studie B: Bepaling van de effectiviteit van middelen – en daarmee met behulp van het PK profiel expositie – als mono-behandeling

De exposure-respons relatie van de (combinatie van) middelen wordt bepaald. Hiervoor wordt de effectiviteit van de middelen als mono-behandeling bepaald. Neutropene, geïnfecteerde muizen worden behandeld met verschillende doseringsschema's met een vaste doseringsfrequentie.

Primaire uitkomstparameter: bacteriële load in de dijspier in behandelde vs onbehandelde muizen, en daarmee de bacteriostatische dosis (dosis waarbij geen uitgroei van de bacterie plaatsvindt) van het middel als mono-behandeling.

GO: Als een middel:

1. bacteriedodende of bacteriostatische activiteit vertoont, of
2. in combinatie met een ander middel waarschijnlijk bacteriedodende of bacteriostatische activiteit zal vertonen (bijvoorbeeld in geval van een antibioticum gecombineerd met remmers van beta-lactamase enzymen, waarvan de laatste meestal zelf geen activiteit hebben)

dan wordt verder gewerkt met dit middel.

Studie C: Dosis-fractioneringsstudie

De exposure-respons relatie van de (combinatie van) middelen wordt verder onderzocht. Hiervoor wordt een dosis-fractioneringsstudie uitgevoerd. Neutropene, geïnfecteerde muizen worden behandeld met verschillende doseringsschema's met verschillende doseringsfrequenties van een middel of combinatie van middelen.

Primaire uitkomstparameter: bacteriële load in de dijspier in behandelde vs onbehandelde muizen, en daarmee bepaling van de PK/PD index die de exposure-respons relatie het beste beschrijft.

GO: Als een middel:

1. bacteriedodende of bacteriostatische activiteit vertoont, of
2. in combinatie met een ander middel waarschijnlijk bacteriedodende of bacteriostatische activiteit zal vertonen (bijvoorbeeld in geval van een antibioticum gecombineerd met remmers van beta-lactamase enzymen, waarvan de laatste meestal zelf geen activiteit hebben)

dan wordt verder gewerkt met dit middel.

Fase 4: Validatie van de PK/PD voor de bepaling van de farmacodynamische target en de variatie daarin tussen stammen ter ondersteuning van breekpunt bepaling

Na deze fase 3-studies wordt de waarde van de PK/PD index gevalideerd voor een aantal andere bacteriestammen. Ook wordt in deze fase gekeken naar de variatie tussen stammen.

Het klinisch breekpunt is de grenswaarde van de MRC (Minimaal Remmende Concentratie) die medisch microbiologische laboratoria gebruiken om aan te geven of een bacterie gevoelig of resistent is voor een middel. De behandelende arts gebruikt dit om te beoordelen of een middel juist wel of juist niet aan een patiënt kan of moet worden voorgeschreven. Het is belangrijk dat de PD target van een middel daarom bepaald wordt op basis van studies met een voldoende uitgebreid panel aan relevante bacteriestammen voor dit middel, die het gehele klinische spectrum – van gevoelig naar ongevoelig/resistent, met of zonder resistentiemechanismen – vertegenwoordigen.

Primaire uitkomstparameter: bacteriële load in de dijspier in behandelde vs onbehandelde muizen, en daarmee validatie van de PK/PD index en bepaling van de PD target.

Fase 5: Effect van verschillende doseringsverhoudingen van twee middelen

Deze fase wordt alleen uitgevoerd voor combinaties van middelen. Er wordt een *in vivo* checkerboard experiment uitgevoerd. Neutropene, geïnfecteerde muizen worden behandeld met verschillende doseringsverhoudingen van twee middelen.

Primaire uitkomstparameter: bacteriële load in de dijspier in behandelde vs onbehandelde muizen, en daarmee het effect van verschillende doseringsverhoudingen van twee middelen.

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

Ongerief wordt zo veel mogelijk geminimaliseerd door gebruik van adequate analgetica. Alle dieren in alle experimenten zullen deze analgesie ontvangen. Euthanasie zal plaatsvinden onder adequate anesthesie. Ongerief wordt gedurende het experiment geregistreerd op een score sheet, waarbij de humane eindpunt criteria worden meegenomen. Hiervoor worden de muizen gewogen (dag -4, dag -1, na infectie wanneer daar aanleiding toe is) en temperatuur (infrarood thermometer) wordt gemeten (na infectie wanneer daar aanleiding toe is).

Gedurende alle studies worden de muizen nauwkeurig gemonitord, ten minste elke 8 uur. Wanneer het klinisch beeld daartoe aanleiding geeft zal deze frequentie worden verhoogd. Studies worden alleen uitgevoerd op werkdagen, zodat overdag monitoren eenvoudig is. Het moment van infectie wordt zodanig

gekozen dat de 'kritische periode' waarin muizen een klinisch beeld kunnen gaan vertonen zo veel mogelijk overdag (vroeg ochtend tot vroege avond, waarbij onderzoekers aanwezig zijn) valt.

Muizen worden neutropeen gemaakt door voorbehandeling met cyclofosfamide (IP op dag -4 en dag -1 voor infectie).

Op dag 0 worden de muizen geïnfecteerd in beide dijspieren. In een aantal gevallen kunnen 2 verschillende bacteriestammen per muis gebruikt worden, 1 stam per dijspier. Dit gaat op voor stammen waarvan bekend is dat beide infecties geen invloed hebben op elkaars beloop. Alleen in die gevallen kan het benodigd aantal muizen gehalveerd worden, omdat per muis 2 bacteriestammen worden gebruikt.

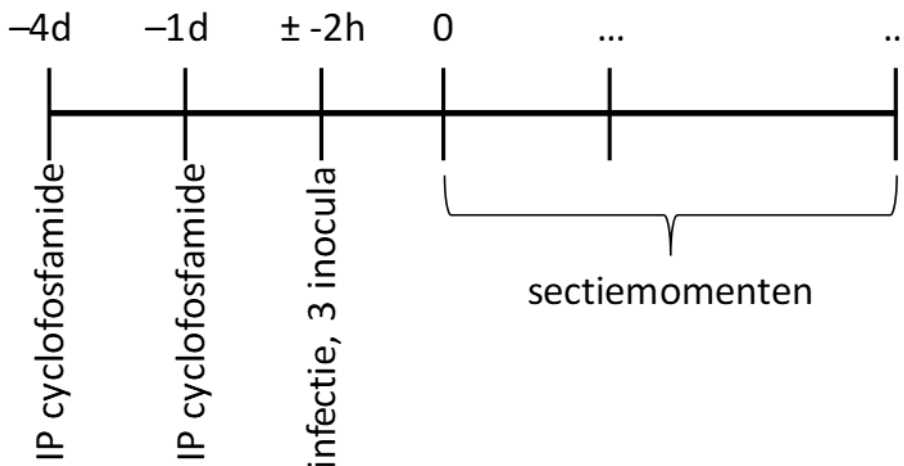
In geval het niet mogelijk is 2 verschillende bacteriestammen per muis te gebruiken, worden ook beide dijspieren geïnfecteerd, met dezelfde bacteriestam. Dit levert dan een duplo binnen een dier op, maar omdat de blootstelling aan het middel hetzelfde is in beide dijspieren (er wordt immers één muis behandeld), is dit geen onafhankelijke duplo. Dit levert daarmee geen vermindering van het aantal benodigde proefdieren op. Er wordt niet voor gekozen om in dit geval slechts 1 dijspier te infecteren. Een duplo binnen het dier levert – ondanks dat het geen onafhankelijke duplo is – meer informatie op uit 1 dier: het gemiddelde van de bacteriële load in de twee dijspieren kan gebruikt worden (in plaats van de load in een dijspier), wat de betrouwbaarheid van de data verhoogt.

Deze extra informatie weegt ons inziens op tegen het beperkte extra ongerief dat een muis ondervindt ten gevolge van infectie in beide dijspieren ten opzichte van infectie in een dijspier. Bij infectie met sommige bacteriestammen is sprake van ontsteking van de achterpoot of -poten, waardoor de muizen deze niet meer goed gebruiken. Ze lopen wel, maar gebruiken daarvoor de voorpoten. Dieren worden dan direct geëuthanaseerd (vraag E) waardoor dit niet leidt tot meer ongerief dan wanneer één dijspier geïnfecteerd zou zijn en minder bruikbaar zou zijn. Bij infectie met andere stammen is de klinische infectie beperkt en lopen en klimmen en bewegen de muizen – ook met twee geïnfecteerde dijspieren – normaal. Hiermee is het ongerief door infectie van een of twee dijspieren beperkt en vergelijkbaar. Door het in acht nemen van de humane eindpunten is ons inziens het ongerief na infectie van beide dijspieren versus infectie van één dijspier slechts kortdurend hoger bij gebruik van stammen die resulteren in ontstoken achterpoten, en gelijk bij gebruik van stammen die beperkte klinische infectie geven.

Fase 1: Aanpassen van de bestaande modellen

Op dag 0 worden de neutropene muizen geïnfecteerd in beide dijspieren met een van de drie bacteriële inocula. Op het moment dat normaliter behandeling wordt gestart (2 uur na infectie), op het moment dat normaliter behandeling wordt beëindigd (meestal 24 uur na start behandeling), en op een tussenliggend tijdstip (afhankelijk van de bacteriestam) worden groepen dieren gedood voor bepaling van de bacteriële load in de dijspier. Het inoculum dat leidt tot een reproduceerbare infectie wordt gekozen voor vervolgonderzoek.

Deze experimenten duren in het algemeen maximaal 26 uur (Figuur 1). In een beperkt aantal experimenten zal zo nodig ook na 48 en/of 72 uur een verificatie plaatsvinden. Dit kan bijvoorbeeld het geval zijn wanneer de bacteriestam minder snel dan verwacht blijkt te groeien.



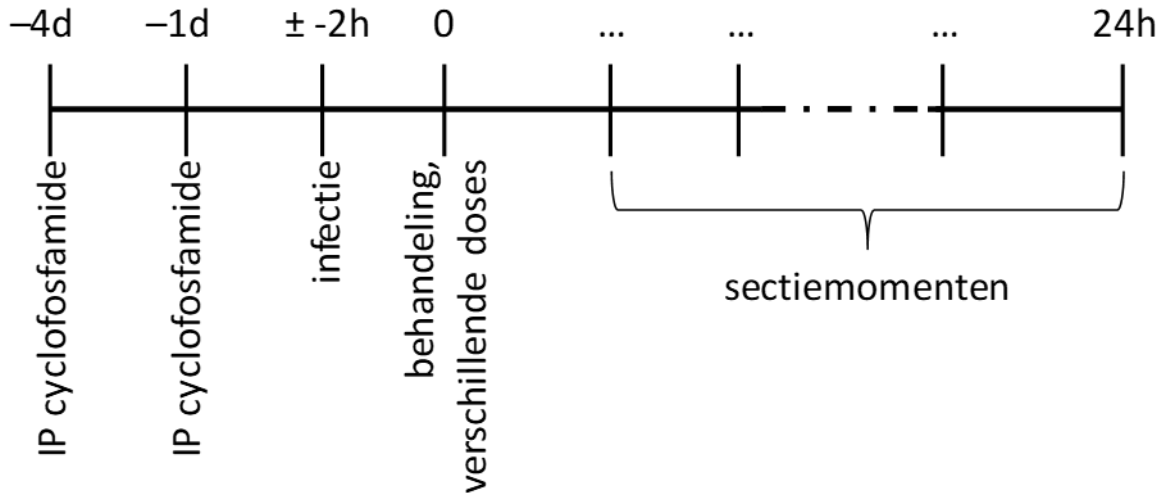
Figuur 1. Algemene opzet van 'Fase 1: Aanpassen van de bestaande modellen'.

Fase 2: Screening op vroege bacteriedodende activiteit

Neutropene, geïnfecteerde dieren worden éénmalig behandeld, dosisgroepen van enkele dieren met verschillende doses van het middel (maximaal 8). Behandeling met het middel is per os of parenteraal, de

route die het meest passend is (meestal SC, IM, IV, IP of soms per maagsonde). Daarbij wordt het maximaal toe te dienen volume voor die route in acht genomen (Principles of Laboratory Animal Science revised edition, Van Zutphen 2001, tabel 16-1). Enkele uren na deze toediening wordt op verschillende tijdstippen (maximaal 8) sectie verricht op de dieren om de vroege bacteriedodende activiteit te bepalen (Figuur 2).

Deze studies duren maximaal 26 uur (na start behandeling).



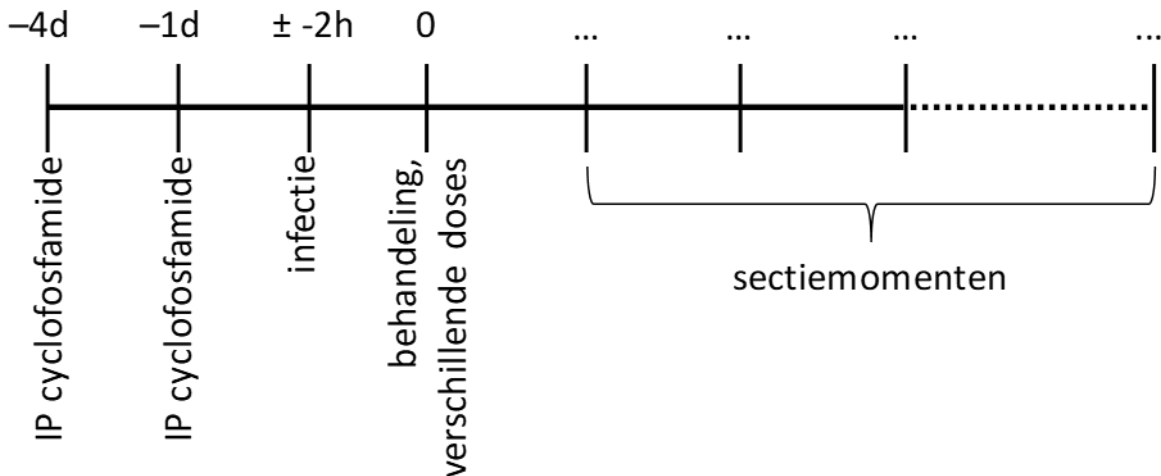
Figuur 2. Algemene opzet van 'Fase 2: Screening op vroege bacteriedodende activiteit'.

Fase 3: Exposure-respons relatie

Studie A: Bepaling van het *in vivo* PK profiel

Neutropene, geïnfecteerde dieren worden éénmalig (of, in specifieke situaties zoals zeer korte halfwaardetijd, meerdere malen, maximaal 3 keer) behandeld, verschillende dosisgroepen met verschillende doses van het middel (hoogste dosis niet hoger dan de drempelwaarde voor toxiciteit, maximaal 8 dosisgroepen). Op verschillende tijdstippen (maximaal 12) na de behandeling worden dieren gedood voor sectie om het concentratieverloop van het middel (PK profiel) in bloed en epithelial lining fluid (ELF) te bepalen (Figuur 3). Wanneer voor concentratie-bepaling van een middel kan worden volstaan met een kleine hoeveelheid plasma, dan wordt ook tijdens het experiment bloed afgenomen bij de muizen, waarbij het aantal sectie-momenten gereduceerd kan worden.

Deze studies duren over het algemeen niet langer dan 48 uur, maar in uitzonderlijke gevallen, bijvoorbeeld als de halfwaardetijd van het middel uitzonderlijk lang is, maximaal 7 dagen (na start behandeling).

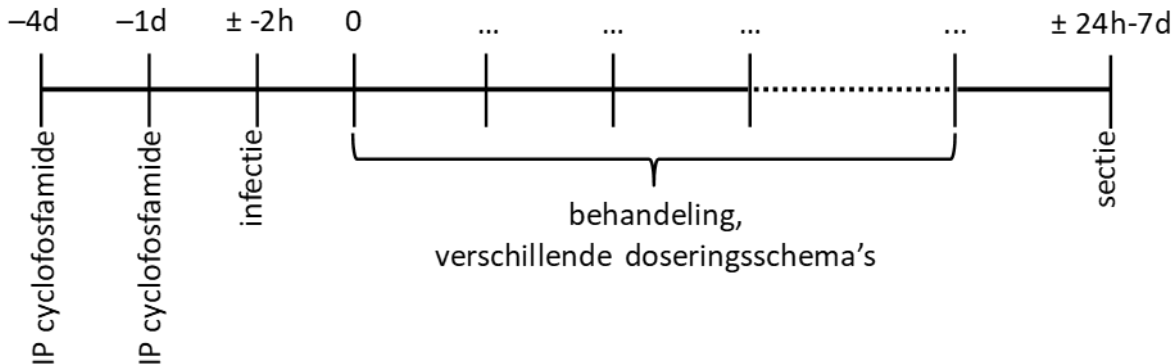


Figuur 3. Algemene opzet van 'Fase 3: Exposure-respons relatie. Studie A: Bepaling van het *in vivo* PK profiel'.

Studie B: Bepaling van de effectiviteit van middelen – en daarmee met behulp van het PK profiel expositie – als mono-behandeling

Neutropene, geïnfecteerde dieren (infectie door maximaal 8 bacteriestammen met verschillende gevoeligheden ofwel MRC's) worden behandeld met het middel als mono-behandeling gedurende 24 uur of maximaal 7 dagen. Er worden verschillende doses (maximaal 6) van het middel onderzocht (Figuur 4).

Deze studies duren meestal 24 uur en maximaal 7 dagen (na start behandeling). Het doseringsschema voor herhaalde toedieningen is mede afhankelijk van de verwachte halfwaardetijd van het middel en bedraagt maximaal 18 toedieningen per maximaal 7 dagen.

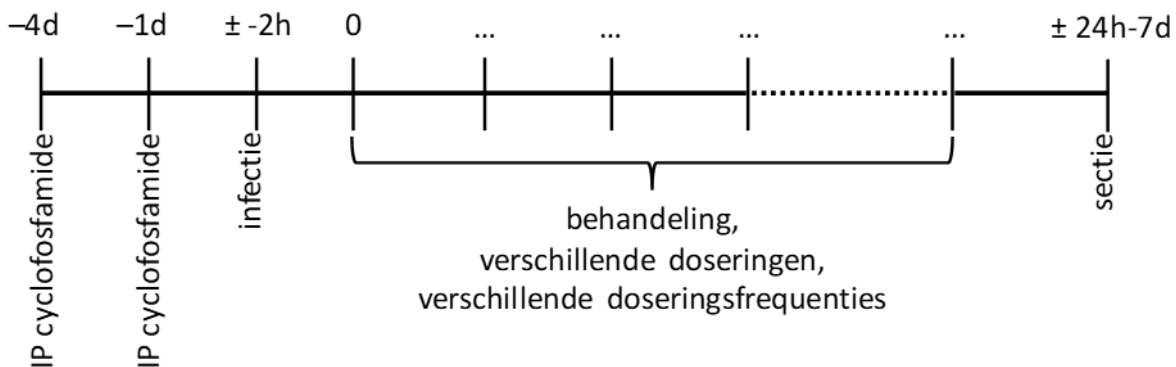


Figuur 4. Algemene opzet van 'Fase 3: Exposure-respons relatie. Studie B: Bepaling van de effectiviteit van middelen – en daarmee met behulp van het PK profiel expositie – als mono-behandeling'.

Studie C: Dosis-fractioneringsstudie

Neutropene, geïnfecteerde dieren (infectie door maximaal 4 verschillende bacteriestammen met verschillende gevoeligheden) worden behandeld met een (combinatie van) middelen waarbij de doseringsfrequentie varieert, maximaal 18 of 20 verschillende doseringsschema's, voor mono- respectievelijk combinatie-behandeling (Figuur 5).

Deze studies duren meestal 24 uur en maximaal 7 dagen (na start behandeling). Het doseringsschema voor herhaalde toedieningen is mede afhankelijk van de verwachte halfwaardetijd van het middel en bedraagt maximaal 18 toedieningen per maximaal 7 dagen.



Figuur 5. Algemene opzet van 'Fase 3: Exposure-respons relatie. Studie C: Dosis-fractioneringsstudie' en van 'Fase 4: Validatie van de PK/PD voor de bepaling van de farmacodynamische target en de variatie daarin tussen stammen ter ondersteuning van breekpunt bepaling'.

Fase 4: Validatie van de PK/PD voor de bepaling van de farmacodynamische target en de variatie daarin tussen stammen ter ondersteuning van breekpunt bepaling

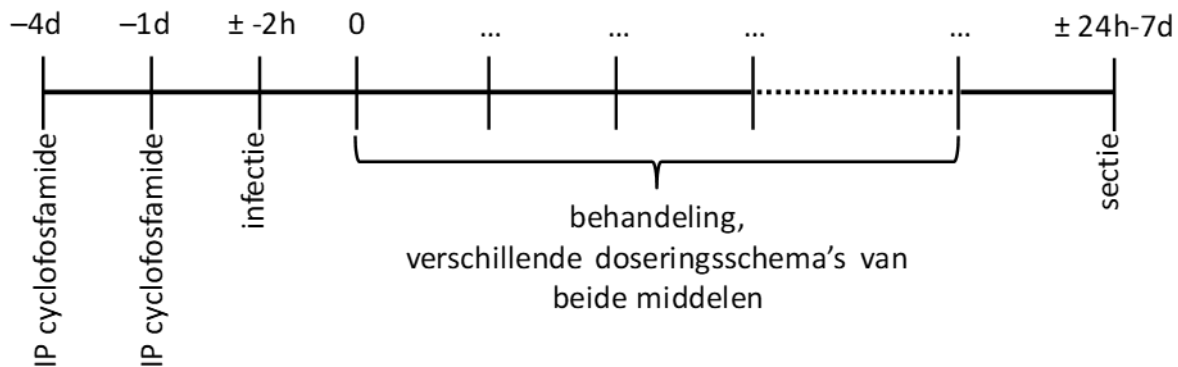
Deze proef is in opzet hetzelfde als studie C (fase 3), maar wordt gedaan met andere bacteriestammen (maximaal 6), om zo te verifiëren of de waarde van de PK/PD index gevonden in fase 2 ook geldig is bij andere bacteriestammen met andere gevoeligheden en andere resistentiemechanismen (Figuur 5). Er worden maximaal 12 verschillende doseringsschema's bestudeerd.

Deze studies duren meestal 24 uur en maximaal 7 dagen (na start behandeling). Het doseringsschema voor herhaalde toedieningen is mede afhankelijk van de verwachte halfwaardetijd van het middel en bedraagt maximaal 18 toedieningen per maximaal 7 dagen.

Fase 5: Effect van verschillende doseringsverhoudingen van twee middelen

In deze proef wordt een *in vivo* checkerboard assay gedaan, met verschillende doseringsschema's (maximaal 6) voor beide middelen (in totaal dus maximaal 6x6 doseringsschema's), voor verschillende bacteriestammen (maximaal 2). Verschil met de eerdere dosisfractioeneringsstudies is dat in deze fase de doseringsschema's van beide middelen variëren, met juist hoge of lage concentraties van een van de middelen. Resultaten worden vergeleken met die van de *in vitro* checkerboard assays (Figuur 6).

Deze studies duren meestal 24 uur en maximaal 7 dagen (na start behandeling). Het doseringsschema voor herhaalde toedieningen is mede afhankelijk van de verwachte halfwaardetijd van de middelen en bedraagt maximaal 18 toedieningen per maximaal 7 dagen.



Figuur 6. Algemene opzet van 'Fase 5: Effect van verschillende doseringsverhoudingen van twee middelen'.

Geef aan welke overwegingen en statistische methoden worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken.

Voor het modelleren van het PK profiel zijn plasma- en ELF-concentraties nodig in de tijd. Uit jarenlange eigen ervaring en gepubliceerde literatuur is gebleken dat het PK profiel gemodelleerd kan worden op basis van minimaal 2-3 dieren per tijdstip. (Het precieze aantal dieren hangt af van de te verwachten inter-individuele variatie in de concentraties van de middelen.) Het aantal tijdstipen per dosis en de exacte tijdstipen wordt gebaseerd op het aantal vrijheidsgraden van de modelcurve en de te verwachten kinetiek van het middel en mogelijke te verwachten interacties. Dit zal per middel verschillen.

Voor het modelleren van de exposure-respons relatie wordt een E_{max} -model gebruikt met variabele helling (slope). Het benodigde aantal datapunten wordt gebaseerd op het aantal vrijheidsgraden (4 bij het E_{max} -model) en de te verwachten respons curve. Voor een goede curve fit zijn op basis hiervan minimaal 5 datapunten (dus 5 doseringsschema's) nodig (aantal vrijheidsgraden + 1): 1 datapunt op het maximale effect, 1 punt op het minimale effect en 3 punten voor het beschrijven van de helling. Echter, van tevoren is niet precies bekend bij welk doseringsschema het maximum of minimum effect optreedt. Er wordt daarom standaard bij 6 schema's gemeten. Dit is een balans tussen enerzijds te vaak een proef te moeten herhalen omdat er geen goede curvedescriptie kan worden bepaald (de punten op de effectcurve liggen te veel naar links of naar rechts ten opzichte van de EC50 en/of het bacteriostatische effect) en anderzijds standaard heel veel punten meten waarbij onnodig veel dieren worden gebruikt. Vanwege de biologische variatie in expositie en respons bij de individuele dieren moet elk datapunt in duplo of in triplo (afhankelijk van de te verwachten inter-individuele variatie) worden uitgevoerd. Daarnaast zijn per middel (of combinatie) infectiecontroles, groei-controles en comparator-antibioticum controles (behandeld met een middel waarvan het effect bekend is) nodig en single drug controles bij proeven met combinaties van middelen.

Voor de aanvang van de proef wordt de proefopzet in detail voorgelegd aan de IvD.

B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, levensstadia, geschatte aantallen per levensstadium, geslacht, genetische wijzigingen en, indien van belang voor het behalen van de doelstelling, de te gebruiken stam.

Volgnr.	Diersoort	Herkomst	Levensstadium	Aantal	Geslacht	Genetisch gewijzigd	Stam
---------	-----------	----------	---------------	--------	----------	---------------------	------

1	Mus Musculus	Dieren gefokt voor onderzoek	Jong volwassen	9010	vrouwelijk	NVT	Bij voorkeur worden CD-1 muizen gebruikt.
---	--------------	------------------------------	----------------	------	------------	-----	---

Onderbouw de bovengenoemde keuzes.

Diersoort	<p>Standaardisatie van het model is belangrijk om resultaten onderling te kunnen vergelijken. In het dijspiermodel dat in de literatuur beschreven is, wordt gebruik gemaakt van muizen. Het dijspiermodel is een veelgebruikt en zeer gestandaardiseerd model dat gebruikt wordt om infecties in de weke delen te simuleren. Er worden neutropene muizen gebruikt om de pure interactie tussen de bacterie en het antibioticum te bepalen, zonder tussenkomst van het immuunsysteem. Dit model worden internationaal toegepast voor het bepalen van de PK/PD index en de PD target. Er is een directe correlatie tussen de PK/PD indexen in neutropene, geïnfecteerde muizen enerzijds en mensen anderzijds voor verschillende antibiotica 5.1 lid2h, 5.1 lid2e wat de hoge translationele waarde van dit model aangeeft.</p>
Herkomst	<p>Standaardisatie, ook van de microbiologische status van het gebruikte proefdier, is belangrijk om resultaten onderling te kunnen vergelijken. De normale flora van de muis kan invloed hebben op het beloop van de infectie. Door muizen te betrekken van een geregistreerde proefdierleverancier wordt deze flora zo veel mogelijk gestandaardiseerd.</p>
Levensstadia	<p>In het dijspiermodel dat in de literatuur beschreven is, wordt gebruik gemaakt van jong volwassen (5-10 weken) muizen. Deze standaardisatie is belangrijk om resultaten onderling te kunnen vergelijken.</p>
Aantal	<p>Fase 1-proeven moeten eenmalig worden uitgevoerd; als de modellen zijn aangepast dan kunnen (combinaties van) middelen getest worden in de fases 2-5.</p> <p>Het aantal te testen (combinaties van) middelen zal enerzijds afhangen van (combinaties van) middelen met potentie uit eigen <i>in vitro</i> onderzoek in het kader van wetenschappelijke onderzoeksprojecten en anderzijds van de interesse vanuit de farmaceutische industrie. Dit aantal is daarom niet geheel nauwkeurig in te schatten. Op basis van ervaring in de afgelopen jaren schatten we in dat we per 5 jaar maximaal 10 middelen als mono-behandeling en 5 combinaties van middelen gaan testen, waarvan een deel al in een vroeg stadium van het onderzoek zal afvallen ten gevolge van de GO/NO GO-criteria.</p> <p>Het totaal aantal dieren dat nodig zal zijn in 5 jaar hangt af van het succes van de (combinaties van) middelen. Wanneer een middel of combinatie in eerste proeven blijkt geen potentie te hebben om <i>in vivo</i> werkzaam te zijn, dan wordt dit middel niet verder <i>in vivo</i> onderzocht en wordt slechts een beperkt aantal dieren gebruikt. Wanneer een middel (of combinatie) wel succesvol is, dan worden alle proeven beschreven in fases 2-4 (voor mono-behandeling) of 2-5 (voor combinatie-behandeling) uitgevoerd. Dan zijn logischerwijs ook meer dieren nodig.</p> <p>In onderstaande berekeningen wordt uitgegaan van maximale aantallen. Wanneer de variatie binnen de groep naar verwachting kleiner is, dan kan worden volstaan met 2 dieren per groep, een kleiner aantal bacteriestammen en/of tijdstippen. Wanneer al enige informatie beschikbaar is over het doseringsschema (dosis en/of frequentie), dan kan in die gevallen eventueel worden volstaan met een beperkter aantal doseringsschema's. Voor de combinatie-behandelingen is uitgegaan van twee middelen die beide nog niet getest zijn als mono-behandeling. Uiteraard zullen er ook combinaties onderzocht worden van middelen waarvan we zelf (in eerder onderzoek of in het huidige project) het effect van mono-behandeling hebben onderzocht. In dat geval worden deze experimenten uiteraard niet herhaald, en wordt deze data gebruikt als input voor de experimenten met de combinatie. Er kan dan volstaan worden met een kleiner aantal groepen.</p>

Waar mogelijk zullen in het dijspiermodel 2 bacteriestammen per muis worden bestudeerd, wat leidt tot een halvering van het aantal benodigde proefdieren. In onderstaande berekeningen is niet van deze situatie uit gegaan, wat leidt tot maximale aantallen.

Fase 1: Aanpassen van de bestaande modellen

In geval gewerkt gaat worden met bacteriestammen waarmee de onderzoeksgroep nog geen ervaring heeft, zal het bestaande model voor deze stam worden aangepast. Dit wordt gedaan voor maximaal 10 bacteriestammen. Muizen worden geïnfecteerd met 3 verschillende inocula. Op 3 verschillende momenten wordt sectie verricht op de muizen om te zien of er een reproduceerbare infectie ontstaat. In verband met biologische variatie zullen 3 muizen per groep worden gebruikt. Daarnaast zal ook vaak een groep van 3 muizen worden behandeld met een controle-antibioticum ("comparator-drug") waarvan bekend is dat dit effectief zal zijn *in vivo*, om aan te tonen dat de infectie behandelbaar is. Voor maximaal 10 bacteriestammen zal op 3 verschillende sectiemomenten bij 3 verschillende inocula de bacteriële load in de dijspier worden bepaald en onderling vergeleken. Het aantal bacteriestammen dat zal worden bestudeerd hangt af van het aantal stammen waarvoor het bestaande model geoptimaliseerd moet worden. De 3 inocula zijn het 'standaard' inoculum, en 2 inocula daar omheen. De 3 sectiemomenten zijn het moment dat normaliter behandeling wordt gestart (2 uur na infectie), op het moment dat normaliter behandeling wordt beëindigd (meestal 24 uur na start behandeling), en op een tussenliggend tijdstip.

Voor deze proef zijn 540 muizen nodig:

10 bacteriestammen x 3 inocula x 3 sectiemomenten x (3 onbehandelde muizen + 3 controle-antibioticum controles)

Voor (succesvolle) middelen zijn de volgende proeven noodzakelijk:

Fase 2: Screening op vroege bacteriedodende activiteit

Voor nieuwe middelen wordt op vroege bacteriedodende activiteit gescreend voor maximaal 4 relevante bacteriestammen met verschillende gevoeligheden (om de variatie tussen stammen te bestuderen, aantal afhankelijk van het onderzochte middel), bij maximaal 8 verschillende doses en/of sectiemomenten (keuze voor meerdere doses en/of meerdere sectiemomenten afhankelijk van verwachting over de effectieve dosis en killingsnelheid), voor elke dosis 2 muizen (1 muis in onvoldoende i.v.m. biologische variatie, meer dan 2 is onnodig omdat het hier een screening betreft) en 6 controles (2 infectiecontroles waarop sectie wordt verricht bij start behandeling, 2 placebo-behandelde groeicontroles en 2 muizen behandeld met een comparator-antibioticum). (Een comparator-antibioticum is vooral van belang om het effect van voornamelijk nieuwe middelen te vergelijken met dat van een bestaand antibioticum.)

Voor maximaal 4 bacteriestammen wordt bij maximaal 8 verschillende doses en/of sectiemomenten de bacteriële load in de dijspier in behandelde muizen vergeleken met onbehandelde muizen. Het aantal bacteriestammen hangt af van de breedte van de MRC-verdeling. Van nature is de spreiding tussen de MRC's van de ene bacteriesoort groter dan van de andere, voor een middel. Wanneer die spreiding groot is (zoals bij *E. coli* en cefuroxim; 0.008-8 mg/l; 11 dilutiestappen tussen de laagste en de hoogste MRC), dan zullen 4 bacteriestammen nodig zijn, terwijl bij een kleinere spreiding (zoals bij *E. coli* en meropenem; 0.008-0.06 mg/l; 4 dilutiestappen tussen de laagste en de hoogste MRC) kan soms worden volstaan met minder dan 4 bacteriestammen. De keuze voor doses en/of sectiemomenten hangt af van de verwachte effectieve dosis en killingsnelheid. Bij een verwachte grote killingsnelheid zullen bijvoorbeeld 4 doses en 2 sectiemomenten per dosis worden bestudeerd, bij verwachte lage killingsnelheid bijvoorbeeld 2 doses en 4 sectiemomenten per dosis.

Voor mono-behandeling zijn 88 muizen nodig:

4 bacteriestammen x 8 (doses en/of sectiemomenten) x 2 muizen per groep

+
4 bacteriestammen x (2 infectiecontroles + 2 groeiconroles + 2 comparator-antibioticum controles)

Voor 10 middelen als mono-behandeling zijn theoretisch $10 \times 88 = 880$ muizen nodig.

Voor combinatie-behandeling zijn 88 muizen nodig:

Nieuwe middelen worden in het algemeen gecombineerd met bestaande middelen. Voor het bestaande middel zijn deze screeningsexperimenten niet nodig, wel voor het nieuwe middel.

4 bacteriestammen x 8 (doses en/of sectiemomenten) x 2 muizen per groep
+
4 bacteriestammen x (2 infectiecontroles + 2 groeiconroles + 2 comparator-antibioticum controles)

Voor 5 combinaties van middelen zijn theoretisch $5 \times 88 = 440$ muizen nodig.

Fase 3: Exposure-respons relatie; Studie A: Bepaling van het *in vivo* PK profiel

Voor het modelleren van het PK profiel van een middel of combinatie van middelen zijn plasma- en ELF-concentraties van de middelen nodig op voldoende tijdstippen (maximaal 12 voor het maken van een volledige PK curve) bij voldoende verschillende doses (meestal 6-8, maximaal 8 voor het maken van een volledige PK curve) in triplo (1 sample is onvoldoende i.v.m. biologische variatie, 2 samples kan voldoende zijn wanneer de verwachte biologische variatie beperkt is, meer dan 3 is onnodig omdat een hele PK-curve wordt gecreëerd). Tijdstippen worden gekozen aan de hand van beschikbare data over PK en PD in literatuur en/of uit eigen eerdere studies, en/of aan de hand van data van vergelijkbare middelen (bijvoorbeeld dezelfde antibioticum-klasse). Dit wordt gedaan voor 1 bacteriestam (het gaat erom dat de muis geïnfecteerd is; de verwachte verschillen in PK profiel tussen muizen geïnfecteerd met verschillende stammen is minimaal). Het concentratie-verloop van het middel in de tijd wordt bepaald. Uit ervaring weten we dat 12 tijdstippen hiervoor voldoende zijn. Soms kan ook volstaan worden met minder tijdstippen, wanneer bijvoorbeeld bekend is dat een middel snel uit het lichaam geklaard wordt en de concentraties snel onder de detectielimiet zullen komen. Het concentratie-verloop van maximaal 8 verschillende doses wordt bepaald. Dit aantal en de hoogte van de doses hangt af van de (verwachte) klinisch haalbare concentraties van het middel.

Voor mono-behandeling zijn 294 muizen nodig:

(1 bacteriestam x 12 tijdstippen x 8 doses x maximaal 3 muizen per groep)
+
(1 bacteriestam x (3 infectiecontroles + 3 groeiconroles))

Voor 10 middelen als mono-behandeling zijn theoretisch $10 \times 294 = 2.940$ muizen nodig.

Voor combinatie-behandeling zijn 588 muizen nodig:

2 middelen x 294 muizen per middel

Voor 5 combinaties van middelen zijn theoretisch $5 \times 588 = 2.940$ muizen nodig.

Fase 3: Exposure-respons relatie; Studie B: Bepaling van de effectiviteit van middelen – en daarmee met behulp van het PK profiel expositie – als mono-behandeling

Dit wordt gedaan voor maximaal 8 bacteriestammen met verschillende gevoeligheden (2 bacteriespecies, 4 stammen per species met goede, slechte en gemiddelde gevoeligheid, om inzicht te krijgen in de variatie tussen en binnen species, aantal afhankelijk van het onderzochte middel), bij 6 verschillende doses (4 vrijheidsgraden, dus minimaal $4+1=5$

doses; om te voorkomen dat een experiment herhaald moet worden, worden 6 doses gekozen), voor elke dosis maximaal 3 muizen en 9 controles (3 infectiecontroles, 3 groeicontroles, 3 comparator-antibioticum controles).

Voor maximaal 8 bacteriestammen wordt bij 6 verschillende doses de bacteriële load in de dijspier in behandelde muizen vergeleken met onbehandelde muizen. Het aantal bacteriestammen hangt af van de breedte van de MRC-verdeling (zie uitleg bij fase 2). Het aantal doses hangt af van het aantal vrijheidsgraden (4 bij het E_{max} -model). De hoogte van de doseringen zijn afhankelijk van het middel en het verwachte minimale en maximale effect.

Voor mono-behandeling zijn 216 muizen nodig:

(8 bacteriestammen x 6 doses x 3 muizen per groep)

+

(8 bacteriestammen x (3 infectiecontroles + 3 groeicontroles + 3 comparator-antibioticum controles))

Voor 10 middelen als mono-behandeling zijn theoretisch $10 \times 216 = 2.160$ muizen nodig.

Voor combinatie-behandeling zijn 432 muizen nodig:

2 middelen x 216 muizen per middel

Voor 5 combinaties van middelen zijn theoretisch $5 \times 432 = 2.160$ muizen nodig.

Fase 3: Exposure-respons relatie; Studie C: Dosis-fractioneringsstudie

Dit wordt gedaan voor 2 tot maximaal 4 (vaak andere dan in studie B gebruikte, aantal afhankelijk van het onderzochte middel) bacteriestammen met verschillende gevoeligheden (geeft inzicht in de variatie tussen stammen; eenzelfde hoeveelheid stammen als in studie B is niet nodig omdat de focus in dit experiment op de doseringsschema's ligt), in maximaal 18 (mono-behandeling) of 20 (combinatie-behandeling) verschillende doseringsschema's (verschillende doses in verschillende toedieningsfrequenties), voor elk schema maximaal 3 muizen en voor de hele proef maximaal 9 controles (3 infectiecontroles, 3 groeicontroles, 3 comparator-antibioticum controles). Bij combinatie-experimenten zijn bovendien maximaal 6 single-drug controles (3 single-drug controles van het ene en 3 van het andere middel) per combinatie van middelen.

Voor maximaal 4 bacteriestammen wordt bij maximaal 18 (mono-behandeling) of 20 (combinatie-behandeling) doseringsschema's de bacteriële load in de dijspier in behandelde muizen vergeleken met onbehandelde muizen. Het aantal bacteriestammen hangt af van de breedte van de MRC-verdeling (zie uitleg bij fase 2). Het aantal doseringsschema's bij mono-behandeling (maximaal 18; bijv. 6 doses in 3 frequenties) hangt af van de al beschikbare informatie en/of verwachting over effectieve dosis en toedieningsfrequentie. Bij combinatie-behandeling geldt hetzelfde, maar dan worden maximaal 20 doseringsschema's (bijv. 5 doses van middel A gecombineerd met middel B in 4 frequenties) bestudeerd. De hoogte van de doseringen zijn afhankelijk van het middel en het verwachte minimale en maximale effect.

Voor mono-behandeling zijn 504 muizen nodig:

(8 bacteriestammen x 18 doseringsschema's x 3 muizen per groep)

+

(8 bacteriestammen x (3 infectiecontroles + 3 groeicontroles + 3 comparator-antibioticum controles))

Voor 10 middelen als mono-behandeling zijn theoretisch $10 \times 504 = 5.040$ muizen nodig.

Voor combinatie-behandeling zijn 600 muizen nodig:

(8 bacteriestammen x 20 doseringsschema's x 3 muizen per groep)

+
(8 bacteriestammen x (3 infectiecontroles + 3 groeiconroles + 3 comparator-antibioticum controles))
+
(8 bacteriestammen x (3 single-drug controles middel 1 + 3 single-drug controles middel 2))

Voor 5 combinaties van middelen zijn theoretisch $5 \times 600 = 3.000$ muizen nodig.

Fase 4: Validatie van de PK/PD voor de bepaling van de farmacodynamische target en de variatie daarin tussen stammen ter ondersteuning van breekpunt bepaling

Dit wordt gedaan voor minimaal 4 tot maximaal 6 andere bacteriestammen dan de eerder gebruikte stammen (geeft, gecombineerd met data uit studies B en C, fase 2, een uitgebreid inzicht in de variatie tussen stammen, bij verschillende doseringsschema's; aantal afhankelijk van het onderzochte middel), in 12 verschillende doseringsschema's (bijv. 3 schema's voor het ene en 4 schema's voor het andere middel; gekozen wordt voor de meest belovende schema's uit studie B voor een uitgebreider stammenpanel), voor elk schema maximaal 3 muizen, 9 controles (3 infectiecontroles, 3 groeiconroles, 3 comparator-antibioticum controles) en voor combinaties van middelen bovendien maximaal 6 single-drug controles (3 single-drug controles van het ene en 3 van het andere middel). Voor maximaal 6 bacteriestammen wordt bij maximaal 12 doseringsschema's de bacteriële load in de dijspier in behandelde muizen vergeleken met onbehandelde muizen. Het aantal bacteriestammen hangt af van de breedte van de MRC-verdeling (zie uitleg bij fase 2). Het aantal doseringsschema's (maximaal 12, bijv. 4 doses in 3 frequenties) hangt af van de al beschikbare informatie en/of verwachting over effectieve dosis en toedieningsfrequentie. De hoogte van de doseringen zijn afhankelijk van het middel en het verwachte minimale en maximale effect.

Voor mono-behandeling zijn 270 muizen nodig:

(6 bacteriestammen x 12 doseringsschema's x 3 muizen per groep)
+
(6 bacteriestammen x (3 infectiecontroles + 3 groeiconroles + 3 comparator-antibioticum controles))

Voor 10 middelen als mono-behandeling zijn theoretisch $10 \times 270 = 2.700$ muizen nodig.

Voor combinatie-behandeling zijn 306 muizen nodig:

(6 bacteriestammen x 12 doseringsschema's x 3 muizen per groep)
+
(6 bacteriestammen x (3 infectiecontroles + 3 groeiconroles + 3 comparator-antibioticum controles))
+
(6 bacteriestammen x (3 single-drug controles middel 1 + 3 single-drug controles middel 2))

Voor 5 combinaties van middelen zijn theoretisch $5 \times 306 = 1.530$ muizen nodig.

Fase 5: Effect van verschillende doseringsverhoudingen van twee middelen

Dit wordt gedaan voor 2 verschillende bacteriestammen (geeft, gecombineerd met de resultaten van experimenten uit fases 3 en 4 een vrijwel volledig inzicht in de variatie tussen stammen bij verschillende doseringsschema's; aantal afhankelijk van het onderzochte middel), in 6 verschillende doseringsschema's per middel (dus maximaal 6 schema's voor het ene en 6 schema's voor het andere middel; 4 vrijheidsgraden, dus minimaal 5 schema's; om te voorkomen dat een experiment herhaald moet worden, worden 6 schema's gekozen), voor elk schema maximaal 3 muizen. (Dit is een *in vivo* checkerboard assay.) De focus in dit experiment ligt op de doseringsschema's die voor

een klein stammenpanel worden bestudeerd. Daarnaast zijn maximaal 18 infectiecontroles, 18 groeiconroles en 18 comparator-antibioticum controles nodig voor de hele proef. Voor 2 verschillende bacteriestammen wordt bij maximaal 36 verschillende doseringsschema's de bacteriële load in de dijspier in behandelde muizen vergeleken met onbehandelde muizen. Er wordt gekozen voor 2 verschillende bacteriestammen, waarmee aanvullend aan de resultaten van experimenten uit fases 3 en 4 een goed beeld van de variatie tussen stammen verkregen wordt. Het aantal doseringsschema's (maximaal 36; bijv. 6 schema's voor het ene en 6 schema's van het andere middel) hangt af van de al beschikbare informatie en/of verwachting over effectieve dosis en toedieningsfrequentie. De hoogte van de doseringen zijn afhankelijk van het middel en het verwachte minimale en maximale effect.

Voor combinatie-behandeling zijn 324 muizen nodig:

(2 bacteriestammen x 36 doseringsschema's x 3 muizen per groep)
 +
 (2 bacteriestammen x (18 infectiecontroles + 18 groeiconroles + 18 comparator-antibioticum controles))

Voor 5 combinaties van middelen zijn theoretisch $5 \times 324 = 1.620$ muizen nodig.

Voor één succesvol middel als mono-behandeling zijn in totaal maximaal $88+294+216+504+270= 1.372$ muizen nodig.

Voor één succesvolle combinatie van middelen zijn in totaal maximaal $88+588+432+600+306+324= 2.338$ muizen nodig.

Voor 10 middelen als mono-behandeling zijn theoretisch $10 \times 1.372 = 13.720$ muizen nodig. Voor 5 combinaties van middelen zijn theoretisch $5 \times 2.338 = 11.690$ muizen nodig. Echter, niet alle (combinaties van) middelen zullen even succesvol zijn en deze zullen in verschillende stadia van het *in vivo* onderzoek afvallen ten gevolge van de GO/NO GO-criteria. Op basis van ervaring weten we dat waarschijnlijk ongeveer 1/3 deel van het theoretisch aantal benodigde muizen nodig is. $(13.720 + 11.690) : 3 = 8.470$ muizen.

We verwachten dat 2/3 deel van het theoretisch benodigde aantal muizen zal afvallen ten gevolge van de GO/NO GO-criteria en ook doordat er minder dan het maximaal aantal berekende dierproeven voor alle bacteriestammen, doseringsschema's en tijdstippen nodig zullen zijn door bovenstaande overwegingen.

In totaal zijn hiermee maximaal 540 (fase 1) + 8.470 (fases 2-5) = 9.010 muizen nodig.

In dit totaal aantal van 9.010 muizen is al rekening gehouden met het feit dat middelen zullen afvallen (en dus niet alle fases doorlopen) ten gevolge van een NO GO-beslissing. Op basis van ervaring uit het verleden weten we dat ongeveer 1/3 deel van het theoretisch benodigde aantal dieren $(13.720 + 11.690 = 25.410)$ nodig zal zijn voor de PK/PD studies in fases 2-5, wat neerkomt op $(25.410 : 3 =) 8.470$. Het overige 2/3 deel zal afvallen.

Geslacht

Standaardisatie van het model is belangrijk om resultaten onderling te kunnen vergelijken. Er is meestal een directe correlatie tussen de PK/PD indexen in vrouwelijke proefdieren en mensen (vrouw én man) voor verschillende antibiotica. Wanneer studies worden uitgevoerd bij vrouwelijke muizen hoeven de resultaten daarom niet ook nog eens bij mannelijke muizen bevestigd te worden. Het gaat immers primair om de concentratie-effect relatie. (Nota bene, de doseringen om die concentraties te bereiken kunnen wel verschillend zijn tussen man en vrouw). In het in de literatuur beschreven dijspiermodel wordt gebruik gemaakt van vrouwelijke muizen. Door in dit project ook vrouwelijke muizen te gebruiken kunnen resultaten vergeleken worden met eerder verkregen resultaten (literatuur en eigen data).

	Door voor de bepaling van het PK profiel alleen vrouwelijke dieren te gebruiken wordt een zeer gestandaardiseerd PK profiel bepaald met weinig variatie. Alleen bij een PK profiel met weinig variatie is het mogelijk de groeps groottes in de proeven voor bepaling van de exposure-respons relatief klein te houden. Daarnaast zijn mannelijke muizen vanwege hun agressievere gedrag moeilijker in groepen te huisvesten.
Genetisch gewijzigd	N.v.t.
Stam	Bij voorkeur worden CD-1 muizen gebruikt. Deze stam wordt ook in het dijspiermodel beschreven in de literatuur gebruikt.

C. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

Ja

Nee > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

D. Pijn en welzijnsaantasting

Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?

Nee >

Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

De mogelijke pijn die veroorzaakt wordt door lokale ontsteking en ziekte zal worden geminimaliseerd door gebruik van adequate analgetica waarvan gebleken is dat zij niet interfereren met de infectie. Pijnbestrijding zal worden toegepast bij alle dieren in alle experimenten voordat gestart wordt met behandeling met de verschillende middelen. In verband met standaardisatie ontvangen alle dieren analgesie. Omdat op voorhand niet bekend is welke therapie effectief is (dit is de vraagstelling van het onderzoek) kan er niet alleen aan de niet of slecht behandelde muizen pijnbestrijding gegeven worden. De eerste injectie zal zijn vlak voor de eerste behandeling. De dosis wordt zodanig gekozen dat deze 12 uur effectief is en pijn door ontsteking en ziekte voorkomt. Op dat moment wordt een volgende injectie gegeven, wat elke 12 uur herhaald wordt tot aan het einde van de proef. Bij experimenten die langer duren dan 48 uur (maximaal 7 dagen) wordt in de eerste 48 uur pijnbestrijding worden toegepast. Na 48 uur wordt in overleg met de IvD al dan niet pijnbestrijding toegepast. Bij dieren waarbij na 48 uur nog steeds sprake is van (ernstige) pijn zullen de nadelige verschijnselen van een langere opiaat-behandeling minder prominent optreden. Dit zal per gebruikte bacteriestam worden afgewogen. Bij bacteriestammen die infectie veroorzaken die naar verwachting meer pijn oplevert, zal de pijnbestrijding ook na 48 uur worden toegepast. Bij stammen die infectie veroorzaken die naar verwachting minder pijn oplevert, zal pijnbestrijding na 48 uur niet meer worden toegepast.

Uit eerdere experimenten binnen onze onderzoeksgroep en andere onderzoeksgroepen is gebleken dat toepassing van analgetica niet interfereert met het PK profiel van de tot nu toe onderzochte middelen. We verwachten dat dit ook voor andere middelen niet het geval zal zijn. Theoretisch zou wel een controlegroep meegenomen moeten worden zonder analgesie om dit uit te sluiten. Omdat er inmiddels vele middelen zijn bestudeerd waarbij gebruik wordt gemaakt van deze vorm van pijnstilling (door onszelf in eerder onderzoek en door andere onderzoeksgroepen) vinden wij het aannemelijk dat deze vorm van analgesie ook niet met het PK profiel van andere middelen zal interfereren. Het zou bovendien – als er al interferentie zou zijn – een systematische afwijking betreffen van het PK profiel. Ook de dieren waar het PK profiel bij is bepaald

hebben immers deze pijnstilling gehad. Een extra controlegroep zou om extra dieren vragen zonder dat dit ook maar enige bijdrage levert aan de uitkomst van de experimenten.

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Wanneer de infectie onbehandeld blijft of wanneer de behandeling niet effectief is, dan zullen de achterpoten van het dier ontstoken raken. Hierdoor kunnen ze deze niet meer goed gebruiken en zullen ze zich vooral met de voorpoten voortbewegen. In sommige gevallen zal de infectie dissemineren en ontaarden in een sepsis. In beide gevallen worden de dieren direct geëuthanaseerd. Wel willen we benadrukken dat de experimenten meestal maar 24 uur, soms 48 uur en maar bij uitzondering langer dan 48 uur (na start behandeling) duren. Deze klinische effecten komen in de meeste gevallen pas na 24 uur tot uiting.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Stress kan ontstaan door experimentele handelingen (hanteren, infecteren, injecties, euthanasie onder anesthesie). Ziekte kan ontstaan door de bacteriële infecties bij niet-effectieve doseringsschema's of bijwerkingen van de middelen.

Beschrijf welke maatregelen worden genomen om deze schadelijke effecten te voorkomen of waar mogelijk te minimaliseren.

Stress door experimentele handelingen kan niet worden voorkomen. Handelingen zullen alleen uitgevoerd worden door competente medewerkers die getraind zijn om met muizen te werken. Bij het bereiken van de humane eindpunten zal het dier worden geëuthanaseerd. Euthanasie vindt plaats onder anesthesie.

E. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

Nee > Ga verder met vraag F.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Dieren worden na infectie gemonitord, ten minste bij elke handeling, en indien nodig (wanneer de score zoals hieronder omschreven 5 of hoger is) wordt de frequentie verhoogd.

De dieren worden gescoord met 0, 1 of 2 op de volgende criteria:

criterium	0	1	3
Gewichtsverlies	Normaal	Licht afwijkend (-5% t.o.v. startgewicht)	Erg afwijkend (-10% t.o.v. startgewicht)
Temperatuurdaling	Normaal	Licht afwijkend (<35.5°C)	Erg afwijkend (<34°C)
Uitdroging	Niet aanwezig	Lichte uitdroging	Ernstige uitdroging
Donkere ogen	Niet aanwezig	Enigszins aanwezig	Zeer donkere ogen
Opstaande vacht	Niet aanwezig	Enigszins aanwezig	Zeer aanwezig

Deze scores worden per dag bij elkaar opgeteld. Per criterium wordt de hoogst gegeven score meegenomen in de optelsom. Voorbeeld: Een muis scoort op dag 1 één punt op 'gewichtsverlies'. Op dag 2 scoort dezelfde muis nul punten op dit criterium. In de optelsom op dag 2 zal dan toch één punt worden meegenomen.

Als deze totale score hoger dan 7 is, dan wordt het dier zonder uitstel geëuthanaseerd en bemonsterd. Wanneer een score van 7 (waarbij dus nog niet voldaan is aan 'hoger dan 7' voor euthanasie) meer dan 24 uur aanhoudt, wordt dit niet ook geaccepteerd, en wordt het dier uit proef gehaald.

Naast bovenstaand scoresysteem zijn er ook een aantal 'direct-uit-proef'-criteria:

- Gewichtsverlies groter dan 20% t.o.v. het startgewicht
- Gewichtsverlies groter dan 15% binnen 24 uur
- Rectale temperatuur lager dan 33°C
- Lethargie of hyperactiviteit door disseminatie van infectie naar de hersenen
- Tollen (bij infectie van de hersenen)
- Wanneer dieren de achterpoten niet meer goed gebruiken en voortbewegen met alleen de voorpoten

Om wetenschappelijke conclusies te kunnen verbinden aan dit onderzoek is het noodzakelijk dat per studie een groep dieren (bijv. placebo-behandeling, behandeling met een lage dosering van een middel) een hoge bacteriële load krijgt, om een effectieve (bacteriedodende) dosering, dus met een lage bacteriële load, van een middel tegen af te kunnen zetten. Alleen op deze manier kan de dosering en de PK/PD index en target die nodig is voor bacteriostasis (geen bacteriegroei) en voor afdoding van de bacteriën bepaald worden. Deze groep dieren met een hoge bacteriële load kan (afhankelijk van de gebruikte bacteriestam, want niet alle bacteriestammen leiden tot een ernstige klinische infectie bij een hoge bacteriële load) leiden tot ernstig ongerief.

De duur van dit ernstig ongerief wordt zo veel als mogelijk bekort door het in acht nemen van de humane eindpunten. Kortdurend ernstig ongerief is noodzakelijk om wetenschappelijke conclusies te kunnen trekken uit dit onderzoek.

De humane eindpunten hebben daarom niet tot doel ernstig ongerief te voorkomen, maar om de duur en impact van het ernstig ongerief zo kortdurend mogelijk te houden. Afhankelijk van het klinisch beeld worden de muizen gemonitord, maar ten minste elke 8 uur, waardoor het ernstig ongerief nooit langer dan 8 uur duurt. Wanneer het klinisch beeld daartoe aanleiding geeft, dan zal de frequentie van monitoren worden verhoogd, om het ernstig ongerief zo kortdurend mogelijk te houden. Experimenten worden alleen uitgevoerd op werkdagen, zodat overdag monitoren eenvoudig is. Het tijdstip van infectie wordt zodanig gekozen dat de 'kritische periode' waarin muizen een klinisch beeld kunnen gaan vertonen zo veel mogelijk overdag (vroeg ochtend tot vroeg avond, waarbij onderzoekers aanwezig zijn) valt, om te realiseren dat het ongerief zo kortdurend mogelijk is.

In sommige gevallen is het dus noodzakelijk voor een experiment dat een groep dieren een relatief hoger (kortdurend ernstig) ongerief heeft. De humane eindpunt criteria worden hierbij wel altijd in acht genomen, maar hiermee is niet te voorkomen dat muizen in voorkomende gevallen toch ernstig ongerief ondervinden. Welke en hoeveel dieren dit zal betreffen, is van tevoren niet te voorspellen, omdat dit afhangt van de effectiviteit van een middel, hetgeen onderzocht wordt in het experiment. Dit zal voornamelijk gaan om dieren in experimenten waarbij de exposure-respons relatie wordt onderzocht, bij dieren die een lage dosis van het middel of een placebo-behandeling krijgen. Echter, bij niet-effectieve middelen zullen ook dieren die een hogere dosis van het middel krijgen hoger ongerief ondervinden.

Zoals in vraag F aangegeven, verwachten we dat in fase 1-studies 50% (n=270), in PK-proeven 5% (n=98) en in exposure-respons proeven 15% (n=976) van de dieren de humane eindpunten zal bereiken.

Het is belangrijk dat voorkomen wordt dat de eindpunt criteria al (te) scherp worden gedefinieerd, waardoor het wetenschappelijk eindpunt niet zou worden bereikt en het doel van de proef niet wordt gerealiseerd.

Bij termineren van de dieren voordat het ongerief hoog wordt kan de vraagstelling niet worden beantwoord. Voor de vraagstelling is het van groot belang dat het doseringsschema kan worden afgemaakt. Dit schema wordt opgesteld aan de hand van gegevens uit literatuur en op basis van resultaten van onze eigen *in vitro* experimenten. Het schema wordt niet langer gemaakt dat strikt noodzakelijk is. Als er doseringsschema's of tijdstippen missen doordat dieren voortijdig geëuthanaseerd worden, dan kan de exposure-response relatie (farmacodynamische index en farmacodynamische target) niet of minder nauwkeurig worden berekend. Daardoor zullen de proeven met een aangepast doseringsschema moeten worden herhaald en zijn ook opnieuw de bijbehorende controledieren nodig. Bij een groep dieren zal dit dus mogelijk leiden tot relatief hoger ongerief (kortdurend ernstig ongerief), maar het voorkomt wel dat proeven herhaald moeten worden.

Welk percentage van de dieren loopt per diersoort kans deze criteria te halen?

Ziekte komt in de meeste gevallen pas na 24 uur tot uiting. Bij proeven in fase 1 blijven dieren onbehandeld, en dieren waarbij het inoculum te hoog worden hebben een grotere kans het humane eindpunt te bereiken. Ingeschat is dat bij maximaal de helft van de dieren het humane eindpunt wordt bereikt.

Voor fase 1: maximaal 50%
Dit percentage is in vraag F verder toegelicht.

Proeven waarbij het PK profiel (fase 3, studie A) wordt bepaald duren over het algemeen niet langer dan 24 uur (na start behandeling) en voor het grootste aantal groepen korter, waardoor de kans op het bereiken van de humane eindpunten klein is.

Voor PK-proeven (fase 3, studie A): 5%

Dit percentage is in vraag F verder toegelicht.

Proeven waarbij de exposure-respons relatie wordt bepaald (fase 2, fase 3 studie B en C, fase 4, fase 5) duren meestal 24 uur (na start behandeling), maar in sommige gevallen langer dan 48 uur, maximaal 7 dagen na start therapie. In die gevallen kan het voorkomen – afhankelijk van de effectiviteit van de (combinatie van) middelen – dat de humane eindpunten bereikt worden.

Voor exposure-respons proeven (fase 2, fase 3 studie B en C, fase 4, fase 5): 15%
Dit percentage is in vraag F verder toegelicht.

F. Classificatie van ongerief

Benoem de experiment gebonden factoren die bijdragen aan het ongerief en geef voor elk van deze factoren aan hoe het ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig'. Geef per diersoort en behandelgroep het cumulatieve ongerief aan in percentages van het totale aantal dieren.

Het ongerief ten gevolge van de experimentele handelingen is voor alle dieren ingeschat op matig:

Dag -4 en -1: IP cyclofosfamide, wegen

T = ± -2h: IM infectie in beide dijspieren

T = 0: behandeling, meestal SC

T = ...: behandeling, meestal SC, frequentie afhankelijk van doseringsschema, maximaal 18 toedieningen per maximaal 7 dagen; bij aanleiding wegen en temperaturen (infrarood thermometer)

Daarnaast kan er ongerief zijn ten gevolge van de infectie. Bij (te) lage inocula, bij middelen die succesvol blijken, bij middelen zonder bijwerkingen en bij groepen waarbij sectie vroeg na start behandeling plaatsvindt zal het ongerief ten gevolge van infectie minder hoog zijn. Echter, bij welke inocula en middelen dit het geval is, is van tevoren niet te voorspellen; dit is de onderzoeksvraag.

Bij dieren die de humane eindpunten niet bereiken is het totale ongerief ingeschat op matig; bij dieren die de humane eindpunten wel bereiken is het totale ongerief nu ingeschat op ernstig. Naar verwachting ondervindt 50% van de dieren in fase 1-studies (Aanpassen van de bestaande modellen), 5% van de dieren in PK proeven (fase 3, studie A) en 15% van de dieren in exposure-respons proeven (fase 2, fase 3 studie B en C, fase 4, fase 5) ernstig ongerief, en bereikt de humane eindpunten. Het is belangrijk om zo veel mogelijk te voorkomen dat het doseringsschema niet kan worden afgemaakt, omdat de exposure-respons relatie dan niet of minder nauwkeurig kan worden berekend. Bij termineren van de dieren voordat het ongerief hoog wordt kan de vraagstelling niet worden beantwoord, zoals beargumenteerd in het antwoord op vraag E (Humane eindpunten).

In absolute aantallen geldt onderstaande beredeneerde schatting:

Fase 1: Aanpassen van de bestaande modellen

Bij deze proeven zal maximaal 50% van de muizen (n=270) de humane eindpunten bereiken ten gevolge van te hoge inocula. Bij deze muizen is het totale ongerief ingeschat op ernstig. Bij de overige 50% (=270 muizen) zal het inoculum te laag of goed zijn; bij deze muizen is het totale ongerief ingeschat op maximaal matig.

Het percentage van 50% van de muizen dat (kortdurend) ernstig ongerief zal ondervinden is gebaseerd op de inschatting dat het inoculum óf te hoog is (50% van de gevallen, leidend tot ernstig ongerief) óf laag of goed (50% van de gevallen, leidend tot matig ongerief.) Met deze proeven is nog geen eerdere ervaring opgedaan. Deze inschatting is daarom aan de voorzichtige kant, waarbij 50% ernstig ongerief wellicht een overschatting is: het inoculum dat als eerst wordt gebruikt is een redelijk en beredeneerd inoculum, waarvan we verwachten dat dit het juiste inoculum zou kunnen zijn, en dat dus niet leidt tot ernstig ongerief.

PK-proeven (fase 3, studie A):

5% van de dieren in PK-experimenten ondervindt ernstig ongerief (inschatting o.b.v. ervaringen in het verleden met dergelijke experimenten). In deze experimenten worden per middel maximaal 294 muizen gebruikt (voor een combinatie komt dit dus neer op $2 \times 294 = 588$ muizen). Voor 10 succesvolle mono-behandelingen en 5 combinatie-behandelingen zouden dit $10 \times 294 + 5 \times 588 = 5.880$ muizen zijn. 1/3 van het totaal aantal muizen is nodig i.v.m. uitval ten gevolge van de GO/NO GO criteria: $5.880 : 3 = 1.960$ muizen. 5% hiervan zal ernstig ongerief ondervinden: $1.960 \times 0,05 = 98$ muizen die ernstig ongerief ondervinden. De overige dieren ($1.960 - 98 = 1.862$ muizen) ondervinden matig ongerief.

Het percentage van 5% van de muizen dat (kortdurend) ernstig ongerief zal ondervinden is gebaseerd op ervaringen in het verleden met dit soort studies. (Een inschatting op basis van retrospectieve beoordeling van de voorgaande vergunning is ons inziens niet realistisch. De gebruikte (combinaties van) middelen en hun te onderzoeken effectiviteit bepalen hoeveel muizen een klinisch beeld ontwikkelen en hoeveel muizen de humane eindpunten bereiken en dus kortdurend ernstig ongerief ondervinden. In het huidige project worden andere, effectievere en/of minder succesvolle (combinaties van) middelen gebruikt dan in het voorgaande project, waardoor een inschatting op basis van de voorgaande vergunning een over- of onderschatting kan geven.)

De meeste studies duren maximaal 24 uur, maar op het grootste deel van de muizen zal sectie worden verricht al vroeg na infectie. Dit is het meest interessante stuk van de concentratie-tijd curve (PK curve), en daarom worden in dit stuk de meeste data verzameld. Door sectie te verrichten al vroeg na infectie ontwikkelen de meeste dieren geen klinisch beeld en bereiken ze de humane eindpunten niet.

Bij middelen met een lange halfwaardetijd duren de studies langer dan 24 uur en is het eerste deel van de PK curve wat meer uitgesmeerd. De kans dat hier dieren een klinisch beeld en eventueel ernstig ongerief ontwikkelen is iets groter dan bij 24-uurs studies, maar nog steeds zal dit een kleine groep dieren zijn; die dieren waarop relatief laat na infectie sectie plaatsvindt.

Exposure-respons proeven (fase 2, fase 3 studie B en C, fase 4, fase 5):

15% van de dieren in PK/PD-experimenten ondervindt ernstig ongerief (inschatting o.b.v. ervaringen in het verleden met dergelijke experimenten). In deze experimenten worden per mono-behandeling maximaal 88 (fase 2) + 216 (fase 3 studie B) + 504 (fase 3 studie C) + 270 (fase 4) = 1.078 muizen gebruikt; per combinatie-behandeling maximaal 88 (fase 2) + 432 (fase 3 studie B) + 600 (fase 3 studie C) + 306 (fase 4) + 324 (fase 5) = 1.750 muizen. Voor 10 succesvolle mono-behandelingen en 5 combinatie-behandelingen zouden dit $10 \times 1.078 + 5 \times 1.750 = 19.530$ muizen zijn. $1/3$ van het totaal aantal muizen is nodig i.v.m. uitval ten gevolge van de GO/NO GO criteria: $19.530 : 3 = 6.510$ muizen. 15% hiervan zal ernstig ongerief ondervinden: $6.510 \times 0,15 = 976$ muizen die ernstig ongerief ondervinden. De overige dieren ($6.510 - 976 = 5.534$ muizen) ondervinden matig ongerief.

Het percentage van 15% van de muizen dat (kortdurend) ernstig ongerief zal ondervinden is gebaseerd op ervaringen in het verleden met dit soort studies. (Een inschatting op basis van retrospectieve beoordeling van de voorgaande vergunning is ons inziens niet realistisch. De gebruikte (combinaties van) middelen en hun te onderzoeken effectiviteit bepalen hoeveel muizen een klinisch beeld ontwikkelen en hoeveel muizen de humane eindpunten bereiken en dus kortdurend ernstig ongerief ondervinden. In het huidige project worden andere, effectievere en/of minder succesvolle (combinaties van) middelen gebruikt dan in het voorgaande project, waardoor een inschatting op basis van de voorgaande vergunning een over- of onderschatting kan geven.)

De meeste studies duren 24 uur na start behandeling. Dieren die met placebo behandeld zijn, of met een lage dosering van een middel, of met een middel dat helemaal niet *in vivo* effectief is tegen de bacteriële verwekker, kunnen een klinisch beeld ontwikkelen en de humane eindpunten bereiken. Dit is niet altijd het geval, want sommige bacteriestammen leiden tot een heel gematigd klinisch beeld waarbij de humane eindpunten niet bereikt worden, ook niet in de placebo-behandelde groepen. (Deze dieren hebben dan wel een hoge bacteriële load zoals benodigd om wetenschappelijke conclusies te trekken, waardoor de vraagstelling wél beantwoord kan worden.)

De inschatting is dat ongeveer de helft van de studies zal worden uitgevoerd met stammen die altijd een gematigd klinisch beeld geven (muizen ondervinden matig ongerief), en de andere helft met stammen die in de placebo-behandelde en in de laag-gedoseerde muizen een ernstig klinisch beeld geven (muizen ondervinden kortdurend ernstig ongerief). Van deze laatste groep verwachten we dat ongeveer 30% van de muizen ernstig ongerief zal ondervinden (placebogroep en de laagst gedoseerde muizen). In totaal zal dus 15% van de muizen ernstig ongerief ondervinden.

Totaal:

Matig ongerief: 270 (fase 1) + 1.862 (PK-proeven) + 5.534 (exposure-respons proeven) = 7.666 muizen

Ernstig ongerief: 270 (fase 1) + 98 (PK-proeven) + 976 (exposure-respons proeven) = 1.344 muizen

Totaal: $7.666 + 1.344 = 9.010$ muizen

G. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welke keuzes daarbij zijn gemaakt.

Vervanging	<p>Voordat middelen in dieren getest worden, zijn ze reeds <i>in vitro</i> getest. Alleen de (combinaties van) middelen met potentie om <i>in vivo</i> werkzaam te kunnen zijn, zullen in dieren onderzocht worden.</p> <p>Op basis van de data die wordt verkregen uit het <i>in vivo</i> en het <i>in vitro</i> onderzoek kan de stap naar klinische studies worden gemaakt, omdat de exposure-respons relaties in dit model goed overeenkomen met de verwachte respons bij patiënten. Ook voor het opstellen of herzien van de productinformatie van middelen is deze data nodig. De European Medicines Agency (EMA) heeft het voornemen om de productinformatie van bestaande antibiotica de komende jaren te herzien onder andere aan de hand van informatie gegenereerd in diermodellen die relevant zijn voor de latere indicatie. Voor colistine is dit inmiddels gebeurd. Vervangen van deze dierproeven is daarom niet mogelijk.</p>
Vermindering	<p>Door de gestandaardiseerde opzet van de proeven kunnen de resultaten verkregen voor een middel (of combinatie) goed vergeleken worden met die voor een ander middel (of combinatie), verkregen in dit project, eerdere projecten, of beschreven in de literatuur. Ook is door de gekozen gestandaardiseerde opzet slechts een beperkt aantal onbehandelde controledieren nodig.</p> <p>Voor het bepalen van een standaard exposure-respons curve wordt het minimale aantal dieren gebruikt waarvan verwacht mag worden dat daarmee het effect kan worden beschreven, zonder de noodzaak tot veelvuldig herhalen van de proef. Dit laatste zou bovendien extra controledieren vragen.</p> <p>Door het hanteren van heldere GO/NO GO-criteria worden middelen die al in een vroeg stadium van het onderzoek blijken geen potentie te hebben om <i>in vivo</i> werkzaam te zijn niet verder onderzocht en wordt onnodig proefdiergebruik voorkomen. Experimentele middelen worden vaak voor 1 bacteriespecies ontwikkeld. Bij screening op vroege bacteriedodende activiteit (fase 2) worden dan niet meteen 4 bacteriestammen gebruikt voor infectie, maar eerst 1 stam. Als het middel dan geen activiteit vertoont, is dit een NO GO. Deze experimenten worden met kleine groepen (n=2) uitgevoerd, dit is voldoende om eventueel aanwezige vroege bacteriedodende activiteit te zien.</p> <p>Alle andere experimenten worden uitgevoerd met minimaal 2 en maximaal 3 muizen per groep. Het definitieve aantal dieren per groep wordt bepaald aan de hand van de te verwachten inter-individuele variatie. Bij kleine inter-individuele variatie kan volstaan worden met 2 muizen per groep; bij grotere variatie (ondanks de standaardisatie van het model) zijn 3 muizen per groep noodzakelijk. Wanneer 2 muizen per groep nodig zijn, dan zijn uiteraard ook in totaal per middel of per combinatie minder dieren nodig; de berekeningen zijn gemaakt op basis van 3 dieren per groep.</p> <p>Wanneer voor concentratie-bepaling van middelen kan volstaan met een kleine hoeveelheid plasma, dan wordt ook tijdens het experiment bloed afgenomen bij de muizen. Dit leidt tot een reductie van het aantal sectie-momenten, en dus tot reductie van het benodigd aantal proefdieren.</p> <p>In geval van nieuwe antibiotica is een comparator-antibioticum nodig als controle om het effect van het nieuwe antibioticum mee te vergelijken. De noodzaak voor deze controlegroep is er bij bestaande antibiotica niet altijd. Daarom kan deze groep in voorkomende gevallen vervallen, wat leidt tot een vermindering van het benodigd aantal dieren.</p>

	<p>In een aantal gevallen kunnen 2 verschillende bacteriestammen per muis gebruikt worden, 1 stam per dijspier. Dit gaat op voor stammen waarvan bekend is dat beide infecties geen invloed hebben op elkaars beloop. Alleen in die gevallen kan het benodigd aantal muizen gehalveerd worden, omdat per muis 2 bacteriestammen worden gebruikt.</p> <p>In geval het niet mogelijk is 2 verschillende bacteriestammen per muis te gebruiken, worden ook beide dijspieren geïnfecteerd, met dezelfde bacteriestam. Dit levert dan een duplo binnen een dier op, maar omdat de blootstelling aan het middel hetzelfde is in beide dijspieren (er wordt immers één muis behandeld), is dit geen onafhankelijke duplo. Dit levert daarmee geen vermindering van het aantal benodigde proefdieren op. Er wordt niet voor gekozen om in dit geval slechts 1 dijspier te infecteren. Een duplo binnen het dier levert – ondanks dat het geen onafhankelijke duplo is – meer informatie op uit 1 dier: het gemiddelde van de bacteriële load in de twee dijspieren kan gebruikt worden (in plaats van de load in een dijspier), wat de betrouwbaarheid van de data verhoogd.</p> <p>Deze extra informatie weegt ons inziens op tegen het beperkte extra ongerief dat een muis ondervindt ten gevolge van infectie in beide dijspieren ten opzichte van infectie in een dijspier. Bij infectie met sommige bacteriestammen is sprake van ontsteking van de achterpoot of –poten, waardoor de muizen deze niet meer goed gebruiken. Ze lopen wel, maar gebruiken daarvoor de voorpoten. Dieren worden dan direct geëuthanaseerd (vraag E) waardoor dit niet leidt tot meer ongerief dan wanneer één dijspier geïnfecteerd zou zijn en minder bruikbaar zou zijn. Bij infectie met andere stammen is de klinische infectie beperkt en lopen en klimmen en bewegen de muizen – ook met twee geïnfecteerde dijspieren – normaal. Hiermee is het ongerief door infectie van een of twee dijspieren beperkt en vergelijkbaar. Door het in acht nemen van de humane eindpunten is ons inziens het ongerief na infectie van beide dijspieren versus infectie van één dijspier slechts kortdurend hoger bij gebruik van stammen die resulteren in ontstoken achterpoten, en gelijk bij gebruik van stammen die beperkte klinische infectie geven.</p> <p>De proefopzet van de proeven wordt voorgelegd aan de IvD. Hierbij wordt het aantal dieren gedetailleerd verantwoord.</p> <p>Door het gebruik van computermodellen voor bepaling van het PK profiel en de exposure-respons relatie, zijn – op basis van jarenlange eigen ervaring en gepubliceerde literatuur – minimaal 2 dieren en maximaal 3 dieren per groep voldoende om met voldoende power de parameters te bepalen. (De uiteindelijke groepsgrootte hangt af van de verwachte inter-individuele variatie.) Vermindering van deze aantallen of vermindering van het aantal datapunten zou leiden tot onvoldoende power.</p>
Verfijning	<p>Voor de <i>in vivo</i> doseringen wordt rekening gehouden met hetgeen bekend is over toxiciteit en/of tolerantie van de middelen, de minimaal toxische dosis of de maximaal getolereerde dosis is de hoogste dosis die <i>in vivo</i> wordt getest voor het bepalen van exposure-response relaties.</p> <p>De geïntroduceerde infectie zal bij de hogere doseringen niet leiden tot een uitgebreide infectie.</p> <p>Dosering van cyclofosfamide via de intraperitoneale route is zo geoptimaliseerd dat ziekte door neutropenie zo minimaal mogelijk is.</p> <p>De ernst van de welzijnsaantasting wordt verder zoveel mogelijk beperkt door het in acht nemen van de humane eindpunten.</p> <p>Door dieren in groepen te huisvesten met gepaste kooiverrijking wordt de proef verder verfijnd.</p>

Zo veel als mogelijk is zal het werken met bacteriestammen die ernstig ongerief kunnen veroorzaken vermeden worden. Echter, soms is dit niet mogelijk vanwege de klinische relevantie van deze stammen.

In geval het niet mogelijk is 2 verschillende bacteriestammen per muis te gebruiken, worden ook beide dijspieren geïnfecteerd, met dezelfde bacteriestam. Dit levert dan een duplo binnen een dier op. Er wordt niet gekozen voor het gebruik van extra dieren die dan ieder individueel minder ongerief hebben, door slechts 1 dijspier te infecteren. Een duplo binnen het dier levert meer datapunten op, die waardevolle informatie oplevert.

Proeven waarin het PK profiel wordt bepaald zijn slechts van relatief korte duur, waardoor de ziekte nog niet veel progressie heeft gemaakt.

Voor nieuwe antibiotica, non-antibiotica en voor sommige oude antibiotica geldt dat onbekend is bij welk doseringsschema ze antibacterieel effectief zijn. Doseringsschema's die niet effectief blijken te zijn, zullen relatief meer ongerief kunnen veroorzaken dan succesvolle schema's. Omdat dit de vraagstelling van het onderzoek is, kan in de keuze van middelen en doseringsschema's, die gemaakt worden op basis van literatuur en verwachtingen, geen verdere verfijning plaatsvinden.

Alles wordt in het werk gesteld om de periode van ernstig ongerief zo kort mogelijk te houden, zoals beschreven in vraag E (humane eindpunten).

Ongerief wordt zo veel mogelijk geminimaliseerd door gebruik van adequate analgetica.

Hoewel we ons realiseren dat een doseringsschema met relatief korte intervallen tussen de dosering ongerief veroorzaakt, is er momenteel geen alternatief. Het gebruik van automatische pompjes (zoals ALZET pompjes) is niet mogelijk vanwege de instabiliteit van de meeste middelen. Daarnaast is dit voor combinaties van middelen – waarbij de doseringsfrequentie van het ene middel wel en het andere middel niet wordt gevarieerd – niet mogelijk. Middelen worden indien mogelijk wel gemengd in de spuit, zodat per dosismoment maar een keer toegediend hoeft te worden.

Zijn er nadelige milieueffecten te verwachten?

Nee

Ja > Benoem de te verwachten milieueffecten en geef aan welke maatregelen zijn genomen om deze tot een minimum te beperken.

H. Hergebruik

Worden er dieren ingezet die eerder in een andere dierproef zijn gebruikt?

Nee, ga verder met vraag I.

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico op) ernstig ongerief?

Nee

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

I. Herhaling

Geef voor wettelijk vereist onderzoek aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing, geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

N.v.t., dit betreft geen wettelijk vereist onderzoek.

J. Plaats waar de dierproef wordt uitgevoerd

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder Wod valt?

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

K. Bestemming van de dieren bij einde experiment

Worden de dieren gedood?

Nee > Beschrijf de bestemming van de dieren.

Ja > Geef aan waarom de dieren worden gedood.

Aan het eind van de proef worden de dieren geëuthanaseerd voor het verzamelen van bloed, dijspiereen en relevante organen en het verrichten van BAL. Uit deze materialen wordt het optimale bacterieel inoculum en de PK/PD relatie bepaald.

Indien dieren worden gedood, wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van Richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja > Betreft het een dodingsmethode die alleen onder specifieke voorwaarden mag worden toegepast?

Nee > Beschrijf de dodingsmethode

Cervicale dislocatie (onder isofluraan-anesthesie) of CO₂ verstikking.

De onderzoeksgroep is zeer ervaren met deze methode van doden. Het is een snelle methode met kortdurend lijden voor het proefdier. Na nekbreek kan BAL worden uitgevoerd en kunnen dijspiereen en relevante organen worden verzameld.

Ja > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Indien dieren worden gedood, maar niet in het kader van de proef, geef aan of herplaatsing is overwogen en waarom hiervan is afgezien.

De dieren worden alleen in het kader van de proeven gedood of om welzijnsproblemen te voorkomen door gebruik van humane eindpunten.



Bijlage

Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u in de 'Toelichting op de te gebruiken formulieren voor de aanvraag van een projectvergunning' op de website www.centralecommissiedierproeven.nl
- Of neem telefonisch contact op (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.

5.1 lid2h

1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.

5.1 lid2h

1.3 Vul het volgnummer en de titel van de dierproef in.

Volgnummer	Titel dierproef
2	Longmodel

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.3 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

Middelen en combinaties van middelen zullen volgens de gestandaardiseerde aanpak van het PK/PD onderzoek worden bestudeerd, in het dijspier- en/of het longmodel. In deze modellen wordt gebruik gemaakt van neutropene muizen, zoals ook in de richtlijnen van het EMA beschreven. Deze bijlage beschrijft het longmodel.

In de studies wordt met neutropene muizen gewerkt omdat de meeste pathogenen voor de mens – zoals *Pseudomonas aeruginosa* – niet pathogeen zijn voor de immuuncompetente muis. Het gebruik van een immuuncompetente muis geeft daarom een grote overschatting van het effect dat het middel bij de mens zou hebben. Daarnaast is ook de primaire vraag: wat is het effect van het middel zonder interferentie van een immuunsysteem?

Wanneer gewerkt gaat worden met nog niet eerder door de onderzoeksgroep gebruikte klinisch relevante bacteriestammen, zal het bestaande en in de literatuur uitgebreid beschreven longmodel voor deze stammen worden aangepast. De onderzoeksgroep heeft veel ervaring met een ruim aantal species, waaronder *Escherichia coli* en *Klebsiella pneumoniae*. Voor deze species is bekend dat een standaard inoculum leidt tot een reproduceerbare infectie. Voor een aantal andere species, zoals *Pseudomonas aeruginosa* en *Acinetobacter baumannii*, is bekend dat het geschikte inoculum voor een reproduceerbare infectie stam-afhankelijk is.

Fase 1. Aanpassen van de bestaande modellen

Indien nodig wordt het bestaande longmodel aangepast voor klinisch relevante bacteriestammen. Er zal bepaald worden welk inoculum leidt tot een reproduceerbare infectie.

Primaire uitkomstparameter: het ontstaan van een reproduceerbare infectie, waarbij de inter-individuele variatie beperkt is, waarbij de bacteriële load voldoende hoog is, maar die niet leidt tot ernstige sepsis.

GO: Wanneer een bacteriestam leidt tot een reproduceerbare infectie, zal verder gewerkt worden met deze stam.

Na deze aanpassing zal gestart worden met het daadwerkelijke PK/PD onderzoek.

Voor geheel nieuwe middelen zal gestart worden met fase 2. Voor alle andere middelen zal gestart worden met fase 3.

In alle gevallen gelden onderstaande entrée criteria voor fase 2 (nieuwe middelen) respectievelijk fase 3 (bestaande middelen):

- De geselecteerde bacteriespecies en antibioticum(combinatie) zijn relevant voor de verbetering van behandeling van klinisch relevante infecties die moeilijk behandelbaar zijn met de nu geregistreerde antibiotica in de toegepaste doseringsschema's.
- Uit *in vitro* onderzoek moet blijken dat het middel of het middel gecombineerd met een antibioticum activiteit vertoont tegen de geselecteerde bacterie, en
- Toxiciteits- en/of tolerantiegegevens moeten beschikbaar zijn.
- De uitkomst van deze studie moet richtinggevend zijn voor (latere) klinische vervolgstudies.

Fase 2. Screening op vroege bacteriedodende activiteit

Alleen voor geheel nieuwe middelen waarvan nog geen informatie is over de aanwezigheid van *in vivo* activiteit/effectiviteit worden screeningsexperimenten uitgevoerd naar de vroege bacteriedodende activiteit. Neutropene, geïnfecteerde muizen worden behandeld met het middel, per os of parenteraal, de route die het meest passend is op basis van verwachtingen aan de hand van bijvoorbeeld de structuur of antibioticum-klasse (meestal SC, IM, IV, IP of soms per maagsonde). Daarbij wordt het maximaal toe te dienen volume voor die route in acht genomen (Principles of Laboratory Animal Science revised edition, Van Zutphen 2001, tabel 16-1).

Primaire uitkomstparameter: bacteriële load in de longen in behandelde vs onbehandelde muizen.

GO: Als een nieuw middel:

1. vroege bacteriedodende of bacteriostatische activiteit vertoont, of
2. in combinatie met een ander middel waarschijnlijk bacteriedodende of bacteriostatische activiteit zal vertonen (bijvoorbeeld in geval van een antibioticum gecombineerd met remmers van beta-lactamase enzymen, waarvan de laatste meestal zelf geen activiteit hebben)

dan gaat dit middel door naar de volgende fase.

Door uitvoering van deze proef met een klein aantal dieren wordt een eerste indruk gekregen of het nieuwe middel *in vivo* werkzaam kan zijn. Als dit niet het geval is, hoeven geen uitgebreide PK en PD studies gedaan te worden. Dit voorkomt onnodig gebruik van proefdieren.

Fase 3: Exposure-respons relatie

In deze fase worden het *in vivo* PK profiel en de effectiviteit van middelen (met een vaste doseringsfrequentie of met verschillende doseringsfrequenties) bepaald en aan elkaar gerelateerd. De volgorde van deze experimenten is afhankelijk van de beschikbare informatie uit literatuur, eerder verkregen data en/of data beschikbaar van partners. Wanneer er bijvoorbeeld al concrete aanwijzingen zijn over het PK profiel van een middel, dan zal eerst naar de effectiviteit van het middel gekeken worden, en later alsnog naar het PK profiel (in hetzelfde proefdiermodel). Wanneer er al duidelijkheid is over de meest geschikte doseringsfrequentie van het middel, dan zal een dosis-fractioneringsstudie (met verschillende doseringsfrequenties van het middel) minder prioriteit hebben, en pas na bepaling van het PK profiel en de effectiviteit (met een vaste doseringsfrequentie van het middel) worden geconfirmeerd.

Na elke studie binnen deze fase volgt een GO/NO GO moment waarop bepaald wordt of het zinvol is om door te gaan met de andere studies in deze fase, of naar de volgende fase. De GO/NO GO-criteria zijn onderstaand per studie vermeld.

Studie A: Bepaling van het *in vivo* PK profiel

Voor alle (combinaties van) middelen wordt het PK profiel (concentraties van het middel in de tijd bij verschillende doses) bepaald. Neutropene, geïnfecteerde muizen worden éénmalig (of, in specifieke situaties, meerdere malen, maximaal 3 keer) behandeld, waarna op verschillende tijdstippen de muizen worden gedood om het concentratieverloop van het middel te bepalen.

Primaire uitkomstparameter: concentratie van het middel in de loop van de tijd.

GO: Verdere studies met dit middel worden alleen uitgevoerd als de PK studie aantoont dat het middel werkzaam zou kunnen zijn, bijvoorbeeld wanneer middelen een veelbelovend concentratiebeloop laten zien, zoals concentraties die lange tijd boven de minimaal remmende concentratie (MRC) blijven of een gunstige verhouding hebben tussen topspiegel en de MRC.

Op basis van de resultaten van de *in vitro* assays en van het (te verwachten of aangetoonde) PK profiel in het dier worden doseringsschema's gekozen voor studies naar de effectiviteit van middelen.

Studie B: Bepaling van de effectiviteit van middelen – en daarmee met behulp van het PK profiel expositie – als mono-behandeling

De exposure-respons relatie van de (combinatie van) middelen wordt bepaald. Hiervoor wordt de effectiviteit van de middelen als mono-behandeling bepaald. Neutropene, geïnfecteerde muizen worden behandeld met verschillende doseringsschema's met een vaste doseringsfrequentie.

Primaire uitkomstparameter: bacteriële load in de longen in behandelde vs onbehandelde muizen, en daarmee de bacteriostatische dosis (dosis waarbij geen uitgroei van de bacterie plaatsvindt) van het middel als mono-behandeling.

GO: Als een middel:

1. bacteriedodende of bacteriostatische activiteit vertoont, of
2. in combinatie met een ander middel waarschijnlijk bacteriedodende of bacteriostatische activiteit zal vertonen (bijvoorbeeld in geval van een antibioticum gecombineerd met remmers van beta-lactamase enzymen, waarvan de laatste meestal zelf geen activiteit hebben)

dan wordt verder gewerkt met dit middel.

Studie C: Dosis-fractioneringsstudie

De exposure-respons relatie van de (combinatie van) middelen wordt verder onderzocht. Hiervoor wordt een dosis-fractioneringsstudie uitgevoerd. Neutropene, geïnfecteerde muizen worden behandeld met verschillende doseringsschema's met verschillende doseringsfrequenties van een middel of combinatie van middelen.

Primaire uitkomstparameter: bacteriële load in de longen in behandelde vs onbehandelde muizen, en daarmee bepaling van de PK/PD index die de exposure-respons relatie het beste beschrijft.

GO: Als een middel:

1. bacteriedodende of bacteriostatische activiteit vertoont, of
2. in combinatie met een ander middel waarschijnlijk bacteriedodende of bacteriostatische activiteit zal vertonen (bijvoorbeeld in geval van een antibioticum gecombineerd met remmers van beta-lactamase enzymen, waarvan de laatste meestal zelf geen activiteit hebben)

dan wordt verder gewerkt met dit middel.

Fase 4: Validatie van de PK/PD voor de bepaling van de farmacodynamische target en de variatie daarin tussen stammen ter ondersteuning van breekpunt bepaling

Na deze fase 3-studies wordt de waarde van de PK/PD index gevalideerd voor een aantal andere bacteriestammen. Ook wordt in deze fase gekeken naar de variatie tussen stammen.

Het klinisch breekpunt is de grenswaarde van de MRC (Minimaal Remmende Concentratie) die medisch microbiologische laboratoria gebruiken om aan te geven of een bacterie gevoelig of resistent is voor een middel. De behandelende arts gebruikt dit om te beoordelen of een middel juist wel of juist niet aan een patiënt kan of moet worden voorgeschreven. Het is belangrijk dat de PD target van een middel daarom bepaald wordt op basis van studies met een voldoende uitgebreid panel aan relevante bacteriestammen voor dit middel, die het gehele klinische spectrum – van gevoelig naar ongevoelig/resistent, met of zonder resistentiemechanismen – vertegenwoordigen.

Primaire uitkomstparameter: bacteriële load in de longen in behandelde vs onbehandelde muizen, en daarmee validatie van de PK/PD index en bepaling van de PD target.

Fase 5: Effect van verschillende doseringsverhoudingen van twee middelen

Deze fase wordt alleen uitgevoerd voor combinaties van middelen. Er wordt een *in vivo* checkerboard experiment uitgevoerd. Neutropene, geïnfecteerde muizen worden behandeld met verschillende doseringsverhoudingen van twee middelen.

Primaire uitkomstparameter: bacteriële load in de longen in behandelde vs onbehandelde muizen, en daarmee het effect van verschillende doseringsverhoudingen van twee middelen.

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

In alle proeven zal infectie worden aangebracht onder adequate anesthesie. Ongerief wordt zo veel mogelijk geminimaliseerd door gebruik van adequate analgetica. Alle dieren in alle experimenten zullen deze analgesie ontvangen. Euthanasie zal plaatsvinden onder adequate anesthesie. Ongerief wordt gedurende het experiment geregistreerd op een score sheet, waarbij de humane eindpunt criteria worden meegenomen. Hiervoor worden de muizen gewogen (dag -4, dag -1, na infectie wanneer daar aanleiding toe is) en temperatuur (infrarood thermometer) wordt gemeten (na infectie wanneer daar aanleiding toe is). Gedurende alle studies worden de muizen nauwkeurig gemonitord, ten minste elke 8 uur. Wanneer het klinisch beeld daartoe aanleiding geeft zal deze frequentie worden verhoogd. Studies worden alleen uitgevoerd op werkdagen, zodat overdag monitoren eenvoudig is. Het moment van infectie wordt zodanig

gekozen dat de 'kritische periode' waarin muizen een klinisch beeld kunnen gaan vertonen zo veel mogelijk overdag (vroeg ochtend tot vroeg avond, waarbij onderzoekers aanwezig zijn) valt.

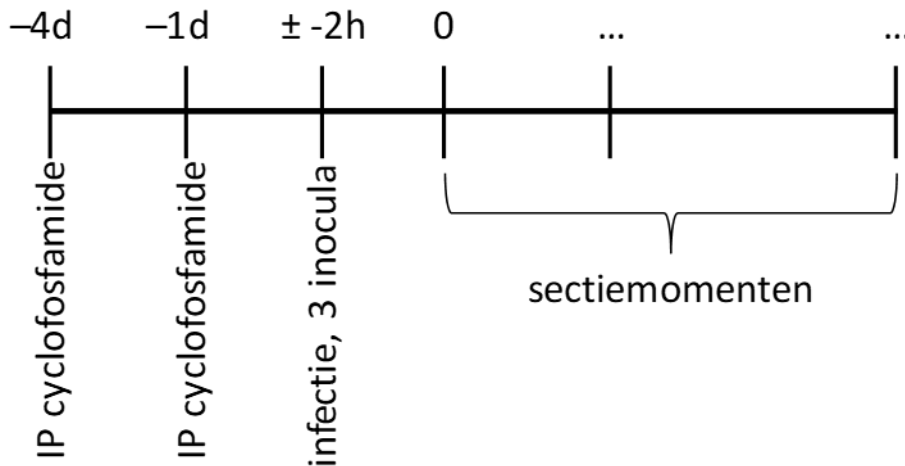
Muizen worden neutropeen gemaakt door voorbehandeling met cyclofosfamide (IP op dag -4 en dag -1 voor infectie).

Op dag 0 worden de muizen IN geïnfecteerd in de longen, 1 bacteriestam per muis.

Fase 1: Aanpassen van de bestaande modellen

Op dag 0 worden de neutropene muizen onder narcose geïnfecteerd in de longen met een van de drie bacteriële inocula. Op het moment dat normaliter behandeling wordt gestart (2 uur na infectie), op het moment dat normaliter behandeling wordt beëindigd (meestal 24 uur na start behandeling), en op een tussenliggend tijdstip (afhankelijk van de bacteriestam) worden groepen dieren gedood voor bepaling van de bacteriële load in de longen. Het inoculum dat leidt tot een reproduceerbare infectie wordt gekozen voor vervolgonderzoek.

Deze experimenten duren in het algemeen maximaal 26 uur (Figuur 1). In een beperkt aantal experimenten zal zo nodig ook na 48 en/of 72 uur een verificatie plaatsvinden. Dit kan bijvoorbeeld het geval zijn wanneer de bacteriestam minder snel dan verwacht blijkt te groeien.



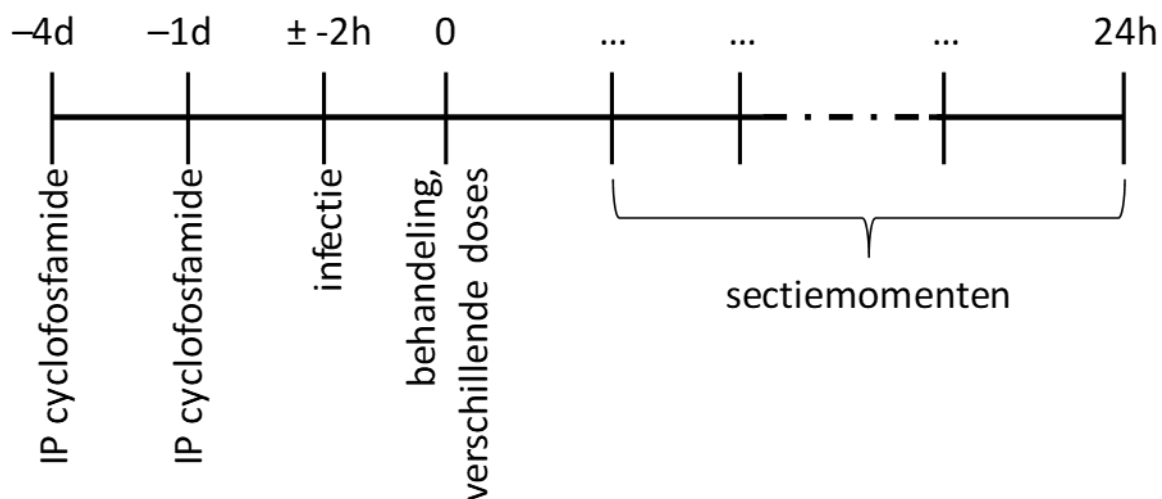
Figuur 1. Algemene opzet van 'Fase 1: Aanpassen van de bestaande modellen'.

Fase 2: Screening op vroege bacteriedodende activiteit

Neutropene, geïnfecteerde dieren worden éénmalig behandeld, dosisgroepen van enkele dieren met verschillende doses van het middel (maximaal 8). Behandeling met het middel is per os of parenteraal, de route die het meest passend is (meestal SC, IM, IV, IP of soms per maagsonde). Daarbij wordt het maximaal toe te dienen volume voor die route in acht genomen (Principles of Laboratory Animal Science revised edition, Van Zutphen 2001, tabel 16-1).

Enkele uren na deze toediening wordt op verschillende tijdstippen (maximaal 8) sectie verricht op de dieren om de vroege bacteriedodende activiteit te bepalen (Figuur 2).

Deze studies duren maximaal 26 uur (na start behandeling).



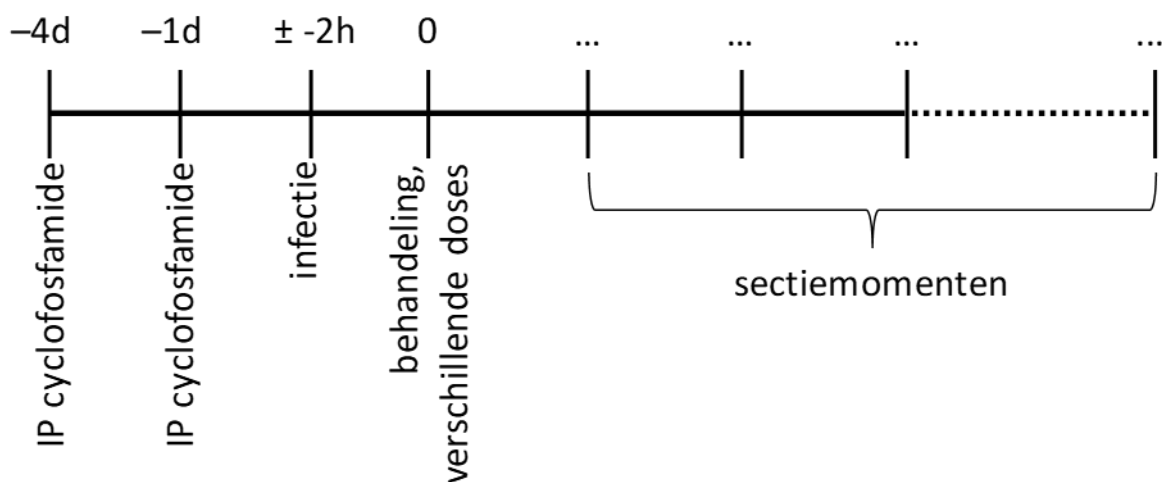
Figuur 2. Algemene opzet van 'Fase 2: Screening op vroege bacteriedodende activiteit'.

Fase 3: Exposure-respons relatie

Studie A: Bepaling van het *in vivo* PK profiel

Neutropene, geïnfecteerde dieren worden éénmalig (of, in specifieke situaties zoals zeer korte halfwaardetijd, meerdere malen, maximaal 3 keer) behandeld, verschillende dosisgroepen met verschillende doses van het middel (hoogste dosis niet hoger dan de drempelwaarde voor toxiciteit, maximaal 8 dosisgroepen). Op verschillende tijdstippen (maximaal 12) na de behandeling worden dieren gedood voor sectie om het concentratieverloop van het middel (PK profiel) in bloed en epithelial lining fluid (ELF) te bepalen (Figuur 3). Wanneer voor concentratie-bepaling van een middel kan worden volstaan met een kleine hoeveelheid plasma, dan wordt ook tijdens het experiment bloed afgenomen bij de muizen, waarbij het aantal sectie-momenten gereduceerd kan worden.

Deze studies duren over het algemeen niet langer dan 48 uur, maar in uitzonderlijke gevallen, bijvoorbeeld als de halfwaardetijd van het middel uitzonderlijk lang is, maximaal 7 dagen (na start behandeling).

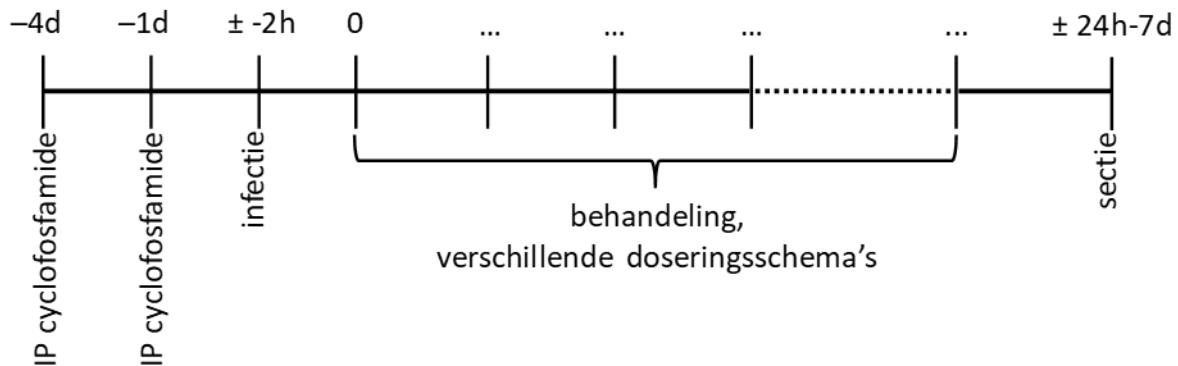


Figuur 3. Algemene opzet van 'Fase 3: Exposure-respons relatie. Studie A: Bepaling van het *in vivo* PK profiel'.

Studie B: Bepaling van de effectiviteit van middelen – en daarmee met behulp van het PK profiel expositie – als mono-behandeling

Neutropene, geïnfecteerde dieren (infectie door maximaal 8 bacteriestammen met verschillende gevoeligheden ofwel MRC's) worden behandeld met het middel als mono-behandeling gedurende 24 uur of maximaal 7 dagen. Er worden verschillende doses (maximaal 6) van het middel onderzocht (Figuur 4).

Deze studies duren meestal 24 uur en maximaal 7 dagen (na start behandeling). Het doseringsschema voor herhaalde toedieningen is mede afhankelijk van de verwachte halfwaardetijd van het middel en bedraagt maximaal 18 toedieningen per maximaal 7 dagen.

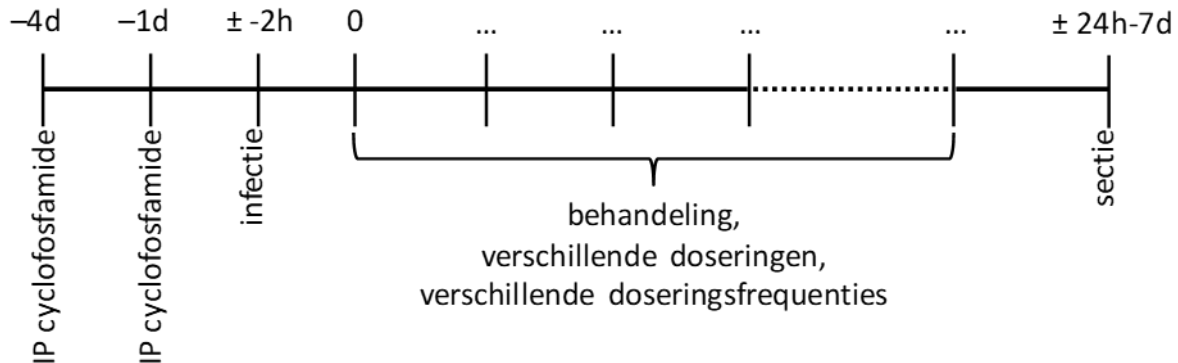


Figuur 4. Algemene opzet van 'Fase 3: Exposure-respons relatie. Studie B: Bepaling van de effectiviteit van middelen – en daarmee met behulp van het PK profiel expositie – als mono-behandeling'.

Studie C: Dosis-fractioneringsstudie

Neutropene, geïnfecteerde dieren (infectie door maximaal 4 verschillende bacteriestammen met verschillende gevoeligheden) worden behandeld met een (combinatie van) middelen waarbij de doseringsfrequentie varieert, maximaal 18 of 20 verschillende doseringsschema's, voor mono- respectievelijk combinatie-behandeling (Figuur 5).

Deze studies duren meestal 24 uur en maximaal 7 dagen (na start behandeling). Het doseringsschema voor herhaalde toedieningen is mede afhankelijk van de verwachte halfwaardetijd van het middel en bedraagt maximaal 18 toedieningen per maximaal 7 dagen.



Figuur 5. Algemene opzet van 'Fase 3: Exposure-respons relatie. Studie C: Dosis-fractioneringsstudie' en van 'Fase 4: Validatie van de PK/PD voor de bepaling van de farmacodynamische target en de variatie daarin tussen stammen ter ondersteuning van breekpunt bepaling'.

Fase 4: Validatie van de PK/PD voor de bepaling van de farmacodynamische target en de variatie daarin tussen stammen ter ondersteuning van breekpunt bepaling

Deze proef is in opzet hetzelfde als studie C (fase 3), maar wordt gedaan met andere bacteriestammen (maximaal 6), om zo te verifiëren of de waarde van de PK/PD index gevonden in fase 2 ook geldig is bij andere bacteriestammen met andere gevoeligheden en andere resistentiemechanismen (Figuur 5). Er worden maximaal 12 verschillende doseringsschema's bestudeerd.

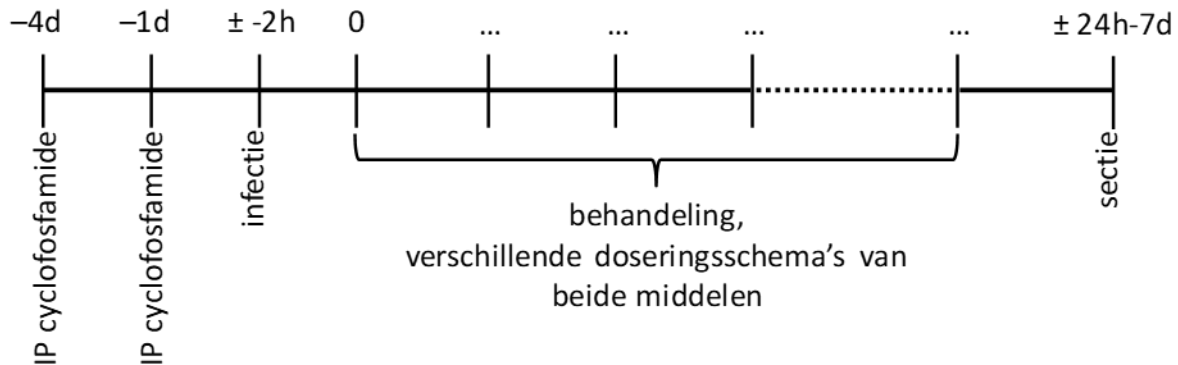
Deze studies duren meestal 24 uur en maximaal 7 dagen (na start behandeling). Het doseringsschema voor herhaalde toedieningen is mede afhankelijk van de verwachte halfwaardetijd van het middel en bedraagt maximaal 18 toedieningen per maximaal 7 dagen.

Fase 5: Effect van verschillende doseringsverhoudingen van twee middelen

In deze proef wordt een *in vivo* checkerboard assay gedaan, met verschillende doseringsschema's (maximaal 6) voor beide middelen (in totaal dus maximaal 6x6 doseringsschema's), voor verschillende bacteriestammen (maximaal 2). Verschil met de eerdere dosisfractioneringsstudies is dat in deze fase de

doseringschema's van beide middelen variëren, met juist hoge of lage concentraties van een van de middelen. Resultaten worden vergeleken met die van de *in vitro* checkerboard assays (Figuur 6).

Deze studies duren meestal 24 uur en maximaal 7 dagen (na start behandeling). Het doseringsschema voor herhaalde toedieningen is mede afhankelijk van de verwachte halfwaardetijd van de middelen en bedraagt maximaal 18 toedieningen per maximaal 7 dagen.



Figuur 6. Algemene opzet van 'Fase 5: Effect van verschillende doseringsverhoudingen van twee middelen'.

Geef aan welke overwegingen en statistische methoden worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken.

Voor het modelleren van het PK profiel zijn plasma- en ELF-concentraties nodig in de tijd. Uit jarenlange eigen ervaring en gepubliceerde literatuur is gebleken dat het PK profiel gemodelleerd kan worden op basis van minimaal 2-3 dieren per tijdstip. (Het precieze aantal dieren hangt af van de te verwachten inter-individuele variatie in de concentraties van de middelen.) Het aantal tijdstipen per dosis en de exacte tijdstipen wordt gebaseerd op het aantal vrijheidsgraden van de modelcurve en de te verwachten kinetiek van het middel en mogelijke te verwachten interacties. Dit zal per middel verschillen.

Voor het modelleren van de exposure-respons relatie wordt een E_{max} -model gebruikt met variabele helling (slope). Het benodigde aantal datapunten wordt gebaseerd op het aantal vrijheidsgraden (4 bij het E_{max} -model) en de te verwachten respons curve. Voor een goede curve fit zijn op basis hiervan minimaal 5 datapunten (dus 5 doseringsschema's) nodig (aantal vrijheidsgraden + 1): 1 datapunt op het maximale effect, 1 punt op het minimale effect en 3 punten voor het beschrijven van de helling. Echter, van tevoren is niet precies bekend bij welk doseringsschema het maximum of minimum effect optreedt. Er wordt daarom standaard bij 6 schema's gemeten. Dit is een balans tussen enerzijds te vaak een proef te moeten herhalen omdat er geen goede curvedescriptie kan worden bepaald (de punten op de effectcurve liggen te veel naar links of naar rechts ten opzichte van de EC_{50} en/of het bacteriostatische effect) en anderzijds standaard heel veel punten meten waarbij onnodig veel dieren worden gebruikt. Vanwege de biologische variatie in expositie en respons bij de individuele dieren moet elk datapunt in duplo of in triplo (afhankelijk van de te verwachten inter-individuele variatie) worden uitgevoerd. Daarnaast zijn per middel (of combinatie) infectiecontroles, groei-controles en comparator-antibioticum controles (behandeld met een middel waarvan het effect bekend is) nodig en single drug controles bij proeven met combinaties van middelen.

Voor de aanvang van de proef wordt de proefopzet in detail voorgelegd aan de IvD.

B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, levensstadia, geschatte aantallen per levensstadium, geslacht, genetische wijzigingen en, indien van belang voor het behalen van de doelstelling, de te gebruiken stam.

Volgnr.	Diersoort	Herkomst	Levensstadium	Aantal	Geslacht	Genetisch gewijzigd	Stam
1	Mus Musculus	Dieren gefokt voor onderzoek	Jong volwassen	9010	vrouwelijk	NVT	Bij voorkeur worden CD-1

							muizen gebruikt.
Onderbouw de bovengenoemde keuzes.							
Diersoort	<p>Standaardisatie van het model is belangrijk om resultaten onderling te kunnen vergelijken. In het longmodel dat in de literatuur beschreven is, wordt gebruik gemaakt van muizen. Het longmodel wordt (naast het dijspiermodel) veel toegepast, omdat de penetratie van middelen in de longen kan afwijken van die in het bloed, waardoor middelen bij longinfecties verminderd effectief kunnen zijn. Er worden neutropene muizen gebruikt om de pure interactie tussen de bacterie en het antibioticum te bepalen, zonder tussenkomst van het immuunsysteem. Dit model worden internationaal toegepast voor het bepalen van de PK/PD index en de PD target. Er is een directe correlatie tussen de PK/PD indexen in neutropene, geïnfecteerde muizen enerzijds en mensen anderzijds voor verschillende antibiotica 5.1 lid2h, 5.1 lid2e wat de hoge translationele waarde van dit model aangeeft.</p>						
Herkomst	<p>Standaardisatie, ook van de microbiologische status van het gebruikte proefdier, is belangrijk om resultaten onderling te kunnen vergelijken. De normale flora van de muis kan invloed hebben op het beloop van de infectie. Door muizen te betrekken van een geregistreerde proefdierleverancier wordt deze flora zo veel mogelijk gestandaardiseerd.</p>						
Levensstadia	<p>In het longmodel dat in de literatuur beschreven is, wordt gebruik gemaakt van jong volwassen (5-10 weken) muizen. Deze standaardisatie is belangrijk om resultaten onderling te kunnen vergelijken.</p>						
Aantal	<p>Fase 1-proeven moeten eenmalig worden uitgevoerd; als de modellen zijn aangepast dan kunnen (combinaties van) middelen getest worden in de fases 2-5.</p> <p>Het aantal te testen (combinaties van) middelen zal enerzijds afhangen van (combinaties van) middelen met potentie uit eigen <i>in vitro</i> onderzoek in het kader van wetenschappelijke onderzoeksprojecten en anderzijds van de interesse vanuit de farmaceutische industrie. Dit aantal is daarom niet geheel nauwkeurig in te schatten. Op basis van ervaring in de afgelopen jaren schatten we in dat we per 5 jaar maximaal 10 middelen als mono-behandeling en 5 combinaties van middelen gaan testen, waarvan een deel al in een vroeg stadium van het onderzoek zal afvallen ten gevolge van de GO/NO GO-criteria.</p> <p>Het totaal aantal dieren dat nodig zal zijn in 5 jaar hangt af van het succes van de (combinaties van) middelen. Wanneer een middel of combinatie in eerste proeven blijkt geen potentie te hebben om <i>in vivo</i> werkzaam te zijn, dan wordt dit middel niet verder <i>in vivo</i> onderzocht en wordt slechts een beperkt aantal dieren gebruikt. Wanneer een middel (of combinatie) wel succesvol is, dan worden alle proeven beschreven in fases 2-4 (voor mono-behandeling) of 2-5 (voor combinatie-behandeling) uitgevoerd. Dan zijn logischerwijs ook meer dieren nodig.</p> <p>In onderstaande berekeningen wordt uitgegaan van maximale aantallen. Wanneer de variatie binnen de groep naar verwachting kleiner is, dan kan worden volstaan met 2 dieren per groep, een kleiner aantal bacteriestammen en/of tijdstippen. Wanneer al enige informatie beschikbaar is over het doseringsschema (dosis en/of frequentie), dan kan in die gevallen eventueel worden volstaan met een beperkter aantal doseringsschema's. Voor de combinatie-behandelingen is uitgegaan van twee middelen die beide nog niet getest zijn als mono-behandeling. Uiteraard zullen er ook combinaties onderzocht worden van middelen waarvan we zelf (in eerder onderzoek of in het huidige project) het effect van mono-behandeling hebben onderzocht. In dat geval worden deze experimenten uiteraard niet herhaald, en wordt deze data gebruikt als input voor de experimenten met de combinatie. Er kan dan volstaan worden met een kleiner aantal groepen.</p> <p><u>Fase 1: Aanpassen van de bestaande modellen</u></p> <p>In geval gewerkt gaat worden met bacteriestammen waarmee de onderzoeksgroep nog geen ervaring heeft, zal het bestaande model voor deze stam worden aangepast. Dit wordt gedaan voor maximaal 10 bacteriestammen. Muizen worden geïnfecteerd met 3 verschillende inocula. Op 3 verschillende momenten wordt sectie verricht op de muizen om te zien of er een reproduceerbare infectie ontstaat. In verband met biologische variatie zullen 3 muizen per groep worden gebruikt. Daarnaast zal ook vaak een groep van 3</p>						

muizen worden behandeld met een controle-antibioticum ("comparator-drug") waarvan bekend is dat dit effectief zal zijn *in vivo*, om aan te tonen dat de infectie behandelbaar is. Voor maximaal 10 bacteriestammen zal op 3 verschillende sectiemomenten bij 3 verschillende inocula de bacteriële load in de longen worden bepaald en onderling vergeleken. Het aantal bacteriestammen dat zal worden bestudeerd hangt af van het aantal stammen waarvoor het bestaande model geoptimaliseerd moet worden. De 3 inocula zijn het 'standaard' inoculum, en 2 inocula daar om heen. De 3 sectiemomenten zijn het moment dat normaliter behandeling wordt gestart (2 uur na infectie), op het moment dat normaliter behandeling wordt beëindigd (meestal 24 uur na start behandeling), en op een tussenliggend tijdstip.

Voor deze proef zijn 540 muizen nodig:

10 bacteriestammen x 3 inocula x 3 sectiemomenten x (3 onbehandelde muizen + 3 controle-antibioticum controles)

Voor (succesvolle) middelen zijn de volgende proeven noodzakelijk:

Fase 2: Screening op vroege bacteriedodende activiteit

Voor nieuwe middelen wordt op vroege bacteriedodende activiteit gescreend voor maximaal 4 relevante bacteriestammen met verschillende gevoeligheden (om de variatie tussen stammen te bestuderen, aantal afhankelijk van het onderzochte middel), bij maximaal 8 verschillende doses en/of sectiemomenten (keuze voor meerdere doses en/of meerdere sectiemomenten afhankelijk van verwachting over de effectieve dosis en killingsnelheid), voor elke dosis 2 muizen (1 muis in onvoldoende i.v.m. biologische variatie, meer dan 2 is onnodig omdat het hier een screening betreft) en 6 controles (2 infectiecontroles waarop sectie wordt verricht bij start behandeling, 2 placebo-behandelde groeiconroles en 2 muizen behandeld met een comparator-antibioticum). (Een comparator-antibioticum is vooral van belang om het effect van voornamelijk nieuwe middelen te vergelijken met dat van een bestaand antibioticum.)

Voor maximaal 4 bacteriestammen wordt bij maximaal 8 verschillende doses en/of sectiemomenten de bacteriële load in de longen in behandelde muizen vergeleken met onbehandelde muizen. Het aantal bacteriestammen hangt af van de breedte van de MRC-verdeling. Van nature is de spreiding tussen de MRC's van de ene bacteriesoort groter dan van de andere, voor een middel. Wanneer die spreiding groot is (zoals bij *E. coli* en cefuroxim; 0.008-8 mg/l; 11 dilutiestappen tussen de laagste en de hoogste MRC), dan zullen 4 bacteriestammen nodig zijn, terwijl bij een kleinere spreiding (zoals bij *E. coli* en meropenem; 0.008-0.06 mg/l; 4 dilutiestappen tussen de laagste en de hoogste MRC) kan soms worden volstaan met minder dan 4 bacteriestammen. De keuze voor doses en/of sectiemomenten hangt af van de verwachte effectieve dosis en killingsnelheid. Bij een verwachte grote killingsnelheid zullen bijvoorbeeld 4 doses en 2 sectiemomenten per dosis worden bestudeerd, bij verwachte lage killingsnelheid bijvoorbeeld 2 doses en 4 sectiemomenten per dosis.

Voor mono-behandeling zijn 88 muizen nodig:

4 bacteriestammen x 8 (doses en/of sectiemomenten) x 2 muizen per groep
+
4 bacteriestammen x (2 infectiecontroles + 2 groeiconroles + 2 comparator-antibioticum controles)

Voor 10 middelen als mono-behandeling zijn theoretisch $10 \times 88 = 880$ muizen nodig.

Voor combinatie-behandeling zijn 88 muizen nodig:

Nieuwe middelen worden in het algemeen gecombineerd met bestaande middelen. Voor het bestaande middel zijn deze screeningsexperimenten niet nodig, wel voor het nieuwe middel.

4 bacteriestammen x 8 (doses en/of sectiemomenten) x 2 muizen per groep
+
4 bacteriestammen x (2 infectiecontroles + 2 groeiconroles + 2 comparator-antibioticum controles)

Voor 5 combinaties van middelen zijn theoretisch $5 \times 88 = 440$ muizen nodig.

Fase 3: Exposure-respons relatie; Studie A: Bepaling van het *in vivo* PK profiel

Voor het modelleren van het PK profiel van een middel of combinatie van middelen zijn plasma- en ELF-concentraties van de middelen nodig op voldoende tijdstippen (maximaal 12 voor het maken van een volledige PK curve) bij voldoende verschillende doses (meestal 6-8, maximaal 8 voor het maken van een volledige PK curve) in triplo (1 sample is onvoldoende i.v.m. biologische variatie, 2 samples kan voldoende zijn wanneer de verwachte biologische variatie beperkt is, meer dan 3 is onnodig omdat een hele PK-curve wordt gecreëerd). Tijdstippen worden gekozen aan de hand van beschikbare data over PK en PD in literatuur en/of uit eigen eerdere studies, en/of aan de hand van data van vergelijkbare middelen (bijvoorbeeld dezelfde antibioticum-klasse). Dit wordt gedaan voor 1 bacteriestam (het gaat erom dat de muis geïnfecteerd is; de verwachte verschillen in PK profiel tussen muizen geïnfecteerd met verschillende stammen is minimaal). Het concentratie-verloop van het middel in de tijd wordt bepaald. Uit ervaring weten we dat 12 tijdstippen hiervoor voldoende zijn. Soms kan ook volstaan worden met minder tijdstippen, wanneer bijvoorbeeld bekend is dat een middel snel uit het lichaam geklaard wordt en de concentraties snel onder de detectielimiet zullen komen. Het concentratie-verloop van maximaal 8 verschillende doses wordt bepaald. Dit aantal en de hoogte van de doses hangt af van de (verwachte) klinisch haalbare concentraties van het middel.

Voor mono-behandeling zijn 294 muizen nodig:

(1 bacteriestam x 12 tijdstippen x 8 doses x maximaal 3 muizen per groep)
+
(1 bacteriestam x (3 infectiecontroles + 3 groeicontroles))

Voor 10 middelen als mono-behandeling zijn theoretisch $10 \times 294 = 2.940$ muizen nodig.

Voor combinatie-behandeling zijn 588 muizen nodig:

2 middelen x 294 muizen per middel

Voor 5 combinaties van middelen zijn theoretisch $5 \times 588 = 2.940$ muizen nodig.

Fase 3: Exposure-respons relatie; Studie B: Bepaling van de effectiviteit van middelen – en daarmee met behulp van het PK profiel expositie – als mono-behandeling

Dit wordt gedaan voor maximaal 8 bacteriestammen met verschillende gevoeligheden (2 bacteriespecies, 4 stammen per species met goede, slechte en gemiddelde gevoeligheid, om inzicht te krijgen in de variatie tussen en binnen species, aantal afhankelijk van het onderzochte middel), bij 6 verschillende doses (4 vrijheidsgraden, dus minimaal $4+1=5$ doses; om te voorkomen dat een experiment herhaald moet worden, worden 6 doses gekozen), voor elke dosis maximaal 3 muizen en 9 controles (3 infectiecontroles, 3 groeicontroles, 3 comparator-antibioticum controles).

Voor maximaal 8 bacteriestammen wordt bij 6 verschillende doses de bacteriële load in de longen in behandelde muizen vergeleken met onbehandelde muizen. Het aantal bacteriestammen hangt af van de breedte van de MRC-verdeling (zie uitleg bij fase 2). Het aantal doses hangt af van het aantal vrijheidsgraden (4 bij het E_{max} -model). De hoogte van de doseringen zijn afhankelijk van het middel en het verwachte minimale en maximale effect.

Voor mono-behandeling zijn 216 muizen nodig:

(8 bacteriestammen x 6 doses x 3 muizen per groep)
+
(8 bacteriestammen x (3 infectiecontroles + 3 groeicontroles + 3 comparator-antibioticum controles))

Voor 10 middelen als mono-behandeling zijn theoretisch $10 \times 216 = 2.160$ muizen nodig.

Voor combinatie-behandeling zijn 432 muizen nodig:

2 middelen x 216 muizen per middel

Voor 5 combinaties van middelen zijn theoretisch $5 \times 432 = 2.160$ muizen nodig.

Fase 3: Exposure-respons relatie; Studie C: Dosis-fractioneringsstudie

Dit wordt gedaan voor 2 tot maximaal 4 (vaak andere dan in studie B gebruikte, aantal afhankelijk van het onderzochte middel) bacteriestammen met verschillende gevoeligheden (geeft inzicht in de variatie tussen stammen; eenzelfde hoeveelheid stammen als in studie B is niet nodig omdat de focus in dit experiment op de doseringsschema's ligt), in maximaal 18 (mono-behandeling) of 20 (combinatie-behandeling) verschillende doseringsschema's (verschillende doses in verschillende toedieningsfrequenties), voor elk schema maximaal 3 muizen en voor de hele proef maximaal 9 controles (3 infectiecontroles, 3 groeicontroles, 3 comparator-antibioticum controles). Bij combinatie-experimenten zijn bovendien maximaal 6 single-drug controles (3 single-drug controles van het ene en 3 van het andere middel) per combinatie van middelen.

Voor maximaal 4 bacteriestammen wordt bij maximaal 18 (mono-behandeling) of 20 (combinatie-behandeling) doseringsschema's de bacteriële load in de longen in behandelde muizen vergeleken met onbehandelde muizen. Het aantal bacteriestammen hangt af van de breedte van de MRC-verdeling (zie uitleg bij fase 2). Het aantal doseringsschema's bij mono-behandeling (maximaal 18; bijv. 6 doses in 3 frequenties) hangt af van de al beschikbare informatie en/of verwachting over effectieve dosis en toedieningsfrequentie. Bij combinatie-behandeling geldt hetzelfde, maar dan worden maximaal 20 doseringsschema's (bijv. 5 doses van middel A gecombineerd met middel B in 4 frequenties) bestudeerd. De hoogte van de doseringen zijn afhankelijk van het middel en het verwachte minimale en maximale effect.

Voor mono-behandeling zijn 504 muizen nodig:

(8 bacteriestammen x 18 doseringsschema's x 3 muizen per groep)

+

(8 bacteriestammen x (3 infectiecontroles + 3 groeicontroles + 3 comparator-antibioticum controles))

Voor 10 middelen als mono-behandeling zijn theoretisch $10 \times 504 = 5.040$ muizen nodig.

Voor combinatie-behandeling zijn 600 muizen nodig:

(8 bacteriestammen x 20 doseringsschema's x 3 muizen per groep)

+

(8 bacteriestammen x (3 infectiecontroles + 3 groeicontroles + 3 comparator-antibioticum controles))

+

(8 bacteriestammen x (3 single-drug controles middel 1 + 3 single-drug controles middel 2))

Voor 5 combinaties van middelen zijn theoretisch $5 \times 600 = 3.000$ muizen nodig.

Fase 4: Validatie van de PK/PD voor de bepaling van de farmacodynamische target en de variatie daarin tussen stammen ter ondersteuning van breekpunt bepaling

Dit wordt gedaan voor minimaal 4 tot maximaal 6 andere bacteriestammen dan de eerder gebruikte stammen (geeft, gecombineerd met data uit studies B en C, fase 2, een uitgebreid inzicht in de variatie tussen stammen, bij verschillende doseringsschema's; aantal afhankelijk van het onderzochte middel), in 12 verschillende doseringsschema's (bijv. 3 schema's voor het ene en 4 schema's voor het andere middel; gekozen wordt voor de meest belovende schema's uit studie B voor een uitgebreider stammenpanel), voor elk schema maximaal 3 muizen, 9 controles (3 infectiecontroles, 3 groeicontroles, 3 comparator-antibioticum controles) en voor combinaties van middelen bovendien maximaal 6 single-drug controles (3 single-drug controles van het ene en 3 van het andere middel). Voor maximaal 6 bacteriestammen wordt bij maximaal 12 doseringsschema's de bacteriële load in de longen in behandelde muizen vergeleken met onbehandelde muizen. Het aantal bacteriestammen hangt af van de breedte van de MRC-verdeling (zie uitleg bij fase 2). Het

aantal doseringsschema's (maximaal 12, bijv. 4 doses in 3 frequenties) hangt af van de al beschikbare informatie en/of verwachting over effectieve dosis en toedieningsfrequentie. De hoogte van de doseringen zijn afhankelijk van het middel en het verwachte minimale en maximale effect.

Voor mono-behandeling zijn 270 muizen nodig:

(6 bacteriestammen x 12 doseringsschema's x 3 muizen per groep)
+
(6 bacteriestammen x (3 infectiecontroles + 3 groeicontroles + 3 comparator-antibioticum controles))

Voor 10 middelen als mono-behandeling zijn theoretisch $10 \times 270 = 2.700$ muizen nodig.

Voor combinatie-behandeling zijn 306 muizen nodig:

(6 bacteriestammen x 12 doseringsschema's x 3 muizen per groep)
+
(6 bacteriestammen x (3 infectiecontroles + 3 groeicontroles + 3 comparator-antibioticum controles))
+
(6 bacteriestammen x (3 single-drug controles middel 1 + 3 single-drug controles middel 2))

Voor 5 combinaties van middelen zijn theoretisch $5 \times 306 = 1.530$ muizen nodig.

Fase 5: Effect van verschillende doseringsverhoudingen van twee middelen

Dit wordt gedaan voor 2 verschillende bacteriestammen (geeft, gecombineerd met de resultaten van experimenten uit fases 3 en 4 een vrijwel volledig inzicht in de variatie tussen stammen bij verschillende doseringsschema's; aantal afhankelijk van het onderzochte middel), in 6 verschillende doseringsschema's per middel (dus maximaal 6 schema's voor het ene en 6 schema's voor het andere middel; 4 vrijheidsgraden, dus minimaal 5 schema's; om te voorkomen dat een experiment herhaald moet worden, worden 6 schema's gekozen), voor elk schema maximaal 3 muizen. (Dit is een *in vivo* checkerboard assay.) De focus in dit experiment ligt op de doseringsschema's die voor een klein stammenpanel worden bestudeerd. Daarnaast zijn maximaal 18 infectiecontroles, 18 groeicontroles en 18 comparator-antibioticum controles nodig voor de hele proef. Voor 2 verschillende bacteriestammen wordt bij maximaal 36 verschillende doseringsschema's de bacteriële load in de longen in behandelde muizen vergeleken met onbehandelde muizen. Er wordt gekozen voor 2 verschillende bacteriestammen, waarmee aanvullend aan de resultaten van experimenten uit fases 3 en 4 een goed beeld van de variatie tussen stammen verkregen wordt. Het aantal doseringsschema's (maximaal 36; bijv. 6 schema's voor het ene en 6 schema's van het andere middel) hangt af van de al beschikbare informatie en/of verwachting over effectieve dosis en toedieningsfrequentie. De hoogte van de doseringen zijn afhankelijk van het middel en het verwachte minimale en maximale effect.

Voor combinatie-behandeling zijn 324 muizen nodig:

(2 bacteriestammen x 36 doseringsschema's x 3 muizen per groep)
+
(2 bacteriestammen x (18 infectiecontroles + 18 groeicontroles + 18 comparator-antibioticum controles))

Voor 5 combinaties van middelen zijn theoretisch $5 \times 324 = 1.620$ muizen nodig.

Voor één succesvol middel als mono-behandeling zijn in totaal maximaal $88+294+216+504+270= 1.372$ muizen nodig.

Voor één succesvolle combinatie van middelen zijn in totaal maximaal $88+588+432+600+306+324= 2.338$ muizen nodig.

	<p>Voor 10 middelen als mono-behandeling zijn theoretisch $10 \times 1.372 = 13.720$ muizen nodig. Voor 5 combinaties van middelen zijn theoretisch $5 \times 2.338 = 11.690$ muizen nodig. Echter, niet alle (combinaties van) middelen zullen even succesvol zijn en deze zullen in verschillende stadia van het <i>in vivo</i> onderzoek afvallen ten gevolge van de GO/NO GO-criteria. Op basis van ervaring weten we dat waarschijnlijk ongeveer 1/3 deel van het theoretisch aantal benodigde muizen nodig is. $(13.720 + 11.690) : 3 = 8.470$ muizen.</p> <p>We verwachten dat 2/3 deel van het theoretisch benodigde aantal muizen zal afvallen ten gevolge van de GO/NO GO-criteria en ook doordat er minder dan het maximaal aantal berekende dierproeven voor alle bacteriestammen, doseringsschema's en tijds punten nodig zullen zijn door bovenstaande overwegingen.</p> <p>In totaal zijn hiermee maximaal 540 (fase 1) + 8.470 (fases 2-5) = 9.010 muizen nodig.</p> <p>In dit totaal aantal van 9.010 muizen is al rekening gehouden met het feit dat middelen zullen afvallen (en dus niet alle fases doorlopen) ten gevolge van een NO GO-beslissing. Op basis van ervaring uit het verleden weten we dat ongeveer 1/3 deel van het theoretisch benodigde aantal dieren $(13.720 + 11.690 = 25.410)$ nodig zal zijn voor de PK/PD studies in fases 2-5, wat neerkomt op $(25.410 : 3 =) 8.470$. Het overige 2/3 deel zal afvallen.</p>
Geslacht	<p>Standaardisatie van het model is belangrijk om resultaten onderling te kunnen vergelijken. Er is meestal een directe correlatie tussen de PK/PD indexen in vrouwelijke proefdieren en mensen (vrouw én man) voor verschillende antibiotica. Wanneer studies worden uitgevoerd bij vrouwelijke muizen hoeven de resultaten daarom niet ook nog eens bij mannelijke muizen bevestigd te worden. Het gaat immers primair om de concentratie-effect relatie. (Nota bene, de doseringen om die concentraties te bereiken kunnen wel verschillend zijn tussen man en vrouw).</p> <p>In het in de literatuur beschreven longmodel wordt gebruik gemaakt van vrouwelijke muizen. Door in dit project ook vrouwelijke muizen te gebruiken kunnen resultaten vergeleken worden met eerder verkregen resultaten (literatuur en eigen data).</p> <p>Door voor de bepaling van het PK profiel alleen vrouwelijke dieren te gebruiken wordt een zeer gestandaardiseerd PK profiel bepaald met weinig variatie. Alleen bij een PK profiel met weinig variatie is het mogelijk de groepsgroottes in de proeven voor bepaling van de exposure-respons relatief klein te houden.</p> <p>Daarnaast zijn mannelijke muizen vanwege hun agressievere gedrag moeilijker in groepen te huisvesten.</p>
Genetisch gewijzigd	N.v.t.
Stam	Bij voorkeur worden CD-1 muizen gebruikt. Deze stam wordt ook in het longmodel beschreven in de literatuur gebruikt.

C. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

Ja

Nee > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

D. Pijn en welzijnsaantasting

Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?

Nee >

Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

De mogelijke pijn die veroorzaakt wordt door lokale ontsteking en ziekte zal worden geminimaliseerd door gebruik van adequate analgetica waarvan gebleken is dat zij niet interfereren met de infectie. Pijnbestrijding zal worden toegepast bij alle dieren in alle experimenten voordat gestart wordt met behandeling met de verschillende middelen. In verband met standaardisatie ontvangen alle dieren analgesie. Omdat op voorhand niet bekend is welke therapie effectief is (dit is de vraagstelling van het onderzoek) kan er niet alleen aan de niet of slecht behandelde muizen pijnbestrijding gegeven worden. De eerste injectie zal zijn vlak voor de eerste behandeling. De dosis wordt zodanig gekozen dat deze 12 uur effectief is en pijn door ontsteking en ziekte voorkomt. Op dat moment wordt een volgende injectie gegeven, wat elke 12 uur herhaald wordt tot aan het einde van de proef. Bij experimenten die langer duren dan 48 uur (maximaal 7 dagen) wordt in de eerste 48 uur pijnbestrijding worden toegepast. Na 48 uur wordt in overleg met de IvD al dan niet pijnbestrijding toegepast. Bij dieren waarbij na 48 uur nog steeds sprake is van (ernstige) pijn zullen de nadelige verschijnselen van een langere opiaat-behandeling minder prominent optreden. Dit zal per gebruikte bacteriestam worden afgewogen. Bij bacteriestammen die infectie veroorzaken die naar verwachting meer pijn oplevert, zal de pijnbestrijding ook na 48 uur worden toegepast. Bij stammen die infectie veroorzaken die naar verwachting minder pijn oplevert, zal pijnbestrijding na 48 uur niet meer worden toegepast.

Uit eerdere experimenten binnen onze onderzoeksgroep en andere onderzoeksgroepen is gebleken dat toepassing van analgetica niet interfereert met het PK profiel van de tot nu toe onderzochte middelen. We verwachten dat dit ook voor andere middelen niet het geval zal zijn. Theoretisch zou wel een controlegroep meegenomen moeten worden zonder analgesie om dit uit te sluiten. Omdat er inmiddels vele middelen zijn bestudeerd waarbij gebruik wordt gemaakt van deze vorm van pijnstilling (door onszelf in eerder onderzoek en door andere onderzoeksgroepen) vinden wij het aannemelijk dat deze vorm van analgesie ook niet met het PK profiel van andere middelen zal interfereren. Het zou bovendien – als er al interferentie zou zijn – een systematische afwijking betreffen van het PK profiel. Ook de dieren waar het PK profiel bij is bepaald hebben immers deze pijnstilling gehad. Een extra controlegroep zou om extra dieren vragen zonder dat dit ook maar enige bijdrage levert aan de uitkomst van de experimenten.

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Wanneer de infectie onbehandeld blijft of wanneer de behandeling niet effectief is, dan zullen de dieren benauwd worden en/of blauw gaan zien. Dit is in de afgelopen 5 jaar echter niet vastgesteld. In sommige gevallen zal de infectie dissemineren en ontaarden in een sepsis. In beide gevallen worden de dieren direct geëuthanaseerd. Wel willen we benadrukken dat de experimenten meestal maar 24 uur, soms 48 uur en maar bij uitzondering langer dan 48 uur (na start behandeling) duren. Deze klinische effecten komen in de meeste gevallen pas na 24 uur tot uiting.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Stress kan ontstaan door experimentele handelingen (hanteren, infecteren, injecties, euthanasie onder anesthesie). Ziekte kan ontstaan door de bacteriële infecties bij niet-effectieve doseringsschema's of bijwerkingen van de middelen.

Beschrijf welke maatregelen worden genomen om deze schadelijke effecten te voorkomen of waar mogelijk te minimaliseren.

Stress door experimentele handelingen kan niet worden voorkomen. Handelingen zullen alleen uitgevoerd worden door competente medewerkers die getraind zijn om met muizen te werken. Bij het bereiken van de humane eindpunten zal het dier worden geëuthanaseerd. Euthanasie vindt plaats onder anesthesie.

E. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

Nee > Ga verder met vraag F.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Dieren worden na infectie gemonitord, ten minste bij elke handeling, en indien nodig (wanneer de score zoals hieronder omschreven 5 of hoger is) wordt de frequentie verhoogd.

De dieren worden gescoord met 0, 1 of 2 op de volgende criteria:

criterium	0	1	3
Gewichtsverlies	Normaal	Licht afwijkend (-5% t.o.v. startgewicht)	Erg afwijkend (-10% t.o.v. startgewicht)
Temperatuurdaling	Normaal	Licht afwijkend (<35.5°C)	Erg afwijkend (<34°C)
Uitdroging	Niet aanwezig	Lichte uitdroging	Ernstige uitdroging
Donkere ogen	Niet aanwezig	Enigszins aanwezig	Zeer donkere ogen
Opstaande vacht	Niet aanwezig	Enigszins aanwezig	Zeer aanwezig

Deze scores worden per dag bij elkaar opgeteld. Per criterium wordt de hoogst gegeven score meegenomen in de optelsom. Voorbeeld: Een muis scoort op dag 1 één punt op 'gewichtsverlies'. Op dag 2 scoort dezelfde muis nul punten op dit criterium. In de optelsom op dag 2 zal dan toch één punt worden meegenomen.

Als deze totale score hoger dan 7 is, dan wordt het dier zonder uitstel geëuthanaseerd en bemonsterd. Wanneer een score van 7 (waarbij dus nog niet voldaan is aan 'hoger dan 7' voor euthanasie) meer dan 24 uur aanhoudt, wordt dit niet ook geaccepteerd, en wordt het dier uit proef gehaald.

Naast bovenstaand scoresysteem zijn er ook een aantal 'direct-uit-proef'-criteria:

- Gewichtsverlies groter dan 20% t.o.v. het startgewicht
- Gewichtsverlies groter dan 15% binnen 24 uur
- Rectale temperatuur lager dan 33°C
- Lethargie of hyperactiviteit door disseminatie van infectie naar de hersenen
- Tollen (bij infectie van de hersenen)

Benauwdheid zou in een longmodel een logisch criterium zijn om op te nemen. Echter, in onze ervaring uit benauwdheid in dit model zich niet zodanig dat dit zichtbaar is: muizen happen niet naar adem, er is geen afwijkende ademhaling en ook geen cyanose. Daarom is dit criterium niet in de lijst opgenomen.

Om wetenschappelijke conclusies te kunnen verbinden aan dit onderzoek is het noodzakelijk dat per studie een groep dieren (bijv. placebo-behandeling, behandeling met een lage dosering van een middel) een hoge bacteriële load krijgt, om een effectieve (bacteriedodende) dosering, dus met een lage bacteriële load, van een middel tegen af te kunnen zetten. Alleen op deze manier kan de dosering en de PK/PD index en target die nodig is voor bacteriostasis (geen bacteriegroei) en voor afdoding van de bacteriën bepaald worden. Deze groep dieren met een hoge bacteriële load kan (afhankelijk van de gebruikte bacteriestam, want niet alle bacteriestammen leiden tot een ernstige klinische infectie bij een hoge bacteriële load) leiden tot ernstig ongerief.

De duur van dit ernstig ongerief wordt zo veel als mogelijk bekort door het in acht nemen van de humane eindpunten. Kortdurend ernstig ongerief is noodzakelijk om wetenschappelijke conclusies te kunnen trekken uit dit onderzoek.

De humane eindpunten hebben daarom niet tot doel ernstig ongerief te voorkomen, maar om de duur en impact van het ernstig ongerief zo kortdurend mogelijk te houden. Afhankelijk van het klinisch beeld worden de muizen gemonitord, maar ten minste elke 8 uur, waardoor het ernstig ongerief nooit langer dan 8 uur duurt. Wanneer het klinisch beeld daartoe aanleiding geeft, dan zal de frequentie van monitoren worden verhoogd, om het ernstig ongerief zo kortdurend mogelijk te houden. Experimenten worden alleen uitgevoerd op werkdagen, zodat overdag monitoren eenvoudig is. Het tijdstip van infectie wordt zodanig gekozen dat de 'kritische periode' waarin muizen een klinisch beeld kunnen gaan vertonen zo veel mogelijk overdag (vroeg ochtend tot vroeg avond, waarbij onderzoekers aanwezig zijn) valt, om te realiseren dat het ongerief zo kortdurend mogelijk is.

In sommige gevallen is het dus noodzakelijk voor een experiment dat een groep dieren een relatief hoger (kortdurend ernstig) ongerief heeft. De humane eindpunt criteria worden hierbij wel altijd in acht genomen, maar hiermee is niet te voorkomen dat muizen in voorkomende gevallen toch ernstig ongerief ondervinden. Welke en hoeveel dieren dit zal betreffen, is van tevoren niet te voorspellen, omdat dit afhangt van de effectiviteit van een middel, hetgeen onderzocht wordt in het experiment. Dit zal voornamelijk gaan om dieren in experimenten waarbij de exposure-respons relatie wordt onderzocht, bij dieren die een lage dosis van het middel of een placebo-behandeling krijgen. Echter, bij niet-effectieve middelen zullen ook dieren die een hogere dosis van het middel krijgen hoger ongerief ondervinden.

Zoals in vraag F aangegeven, verwachten we dat in fase 1 -studies 50% (n=270), in PK-proeven 5% (n=98) en in exposure-respons proeven 15% (n=976) van de dieren de humane eindpunten zal bereiken.

Het is belangrijk dat voorkomen wordt dat de eindpunt criteria al (te) scherp worden gedefinieerd, waardoor het wetenschappelijk eindpunt niet zou worden bereikt en het doel van de proef niet wordt gerealiseerd.

Bij termineren van de dieren voordat het ongerief hoog wordt kan de vraagstelling niet worden beantwoord. Voor de vraagstelling is het van groot belang dat het doseringsschema kan worden afgemaakt. Dit schema wordt opgesteld aan de hand van gegevens uit literatuur en op basis van resultaten van onze eigen *in vitro* experimenten. Het schema wordt niet langer gemaakt dat strikt noodzakelijk is. Als er doseringsschema's of tijdstippen missen doordat dieren voortijdig geëthanaseerd worden, dan kan de exposure-response relatie (farmacodynamische index en farmacodynamische target) niet of minder nauwkeurig worden berekend. Daardoor zullen de proeven met een aangepast doseringsschema moeten worden herhaald en zijn ook opnieuw de bijbehorende controledieren nodig. Bij een groep dieren zal dit dus mogelijk leiden tot relatief hoger ongerief (kortdurend ernstig ongerief), maar het voorkomt wel dat proeven herhaald moeten worden.

Welk percentage van de dieren loopt per diersoort kans deze criteria te halen?

Ziekte komt in de meeste gevallen pas na 24 uur tot uiting. Bij proeven in fase 1 blijven dieren onbehandeld, en dieren waarbij het inoculum te hoog worden hebben een grotere kans het humane eindpunt te bereiken. Ingeschat is dat bij maximaal de helft van de dieren het humane eindpunt wordt bereikt.

Voor fase 1: maximaal 50%
Dit percentage is in vraag F verder toegelicht.

Proeven waarbij het PK profiel (fase 3, studie A) wordt bepaald duren over het algemeen niet langer dan 24 uur (na start behandeling) en voor het grootste aantal groepen korter, waardoor de kans op het bereiken van de humane eindpunten klein is.

Voor PK-proeven (fase 3, studie A): 5%
Dit percentage is in vraag F verder toegelicht.

Proeven waarbij de exposure-respons relatie wordt bepaald (fase 2, fase 3 studie B en C, fase 4, fase 5) duren meestal 24 uur (na start behandeling), maar in sommige gevallen langer dan 48 uur, maximaal 7 dagen na start therapie. In die gevallen kan het voorkomen – afhankelijk van de effectiviteit van de (combinatie van) middelen – dat de humane eindpunten bereikt worden.

Voor exposure-respons proeven (fase 2, fase 3 studie B en C, fase 4, fase 5): 15%
Dit percentage is in vraag F verder toegelicht.

F. Classificatie van ongerief

Benoem de experiment gebonden factoren die bijdragen aan het ongerief en geef voor elk van deze factoren aan hoe het ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig'. Geef per diersoort en behandelgroep het cumulatieve ongerief aan in percentages van het totale aantal dieren.

Het ongerief ten gevolge van de experimentele handelingen is voor alle dieren ingeschat op matig:

Dag -4 en -1: IP cyclofosfamide, wegen

T = ± -2h: IN infectie in de longen onder isofluraan anesthesie

T = 0: behandeling, meestal SC

T = ...: behandeling, meestal SC, frequentie afhankelijk van doseringsschema, maximaal 18 toedieningen per maximaal 7 dagen; bij aanleiding wegen en temperaturen (infrarood thermometer)

Daarnaast kan er ongerief zijn ten gevolge van de infectie. Bij (te) lage inocula, bij middelen die succesvol blijken, bij middelen zonder bijwerkingen en bij groepen waarbij sectie vroeg na start behandeling plaatsvindt zal het ongerief ten gevolge van infectie minder hoog zijn. Echter, bij welke inocula en middelen dit het geval is, is van tevoren niet te voorspellen; dit is de onderzoeksvraag.

Bij dieren die de humane eindpunten niet bereiken is het totale ongerief ingeschat op matig; bij dieren die de humane eindpunten wel bereiken is het totale ongerief nu ingeschat op ernstig. Naar

verwachting ondervindt 50% van de dieren in fase 1-studies (Aanpassen van de bestaande modellen), 5% van de dieren in PK proeven (fase 3, studie A) en 15% van de dieren in exposure-respons proeven (fase 2, fase 3 studie B en C, fase 4, fase 5) ernstig ongerief, en bereikt de humane eindpunten. Het is belangrijk om zo veel mogelijk te voorkomen dat het doseringsschema niet kan worden afgemaakt, omdat de exposure-respons relatie dan niet of minder nauwkeurig kan worden berekend. Bij termineren van de dieren voordat het ongerief hoog wordt kan de vraagstelling niet worden beantwoord, zoals beargumenteerd in het antwoord op vraag E (Humane eindpunten).

In absolute aantallen geldt onderstaande beredeneerde schatting:

Fase 1: Aanpassen van de bestaande modellen

Bij deze proeven zal maximaal 50% van de muizen (n=270) de humane eindpunten bereiken ten gevolge van te hoge inocula. Bij deze muizen is het totale ongerief ingeschat op ernstig. Bij de overige 50% (=270 muizen) zal het inoculum te laag of goed zijn; bij deze muizen is het totale ongerief ingeschat op maximaal matig.

Het percentage van 50% van de muizen dat (kortdurend) ernstig ongerief zal ondervinden is gebaseerd op de inschatting dat het inoculum óf te hoog is (50% van de gevallen, leidend tot ernstig ongerief) óf laag of goed (50% van de gevallen, leidend tot matig ongerief.) Met deze proeven is nog geen eerdere ervaring opgedaan. Deze inschatting is daarom aan de voorzichtige kant, waarbij 50% ernstig ongerief wellicht een overschatting is: het inoculum dat als eerst wordt gebruikt is een redelijk en beredeneerd inoculum, waarvan we verwachten dat dit het juiste inoculum zou kunnen zijn, en dat dus niet leidt tot ernstig ongerief.

PK-proeven (fase 3, studie A):

5% van de dieren in PK-experimenten ondervindt ernstig ongerief (inschatting o.b.v. ervaringen in het verleden met dergelijke experimenten). In deze experimenten worden per middel maximaal 294 muizen gebruikt (voor een combinatie komt dit dus neer op $2 \times 294 = 588$ muizen). Voor 10 succesvolle mono-behandelingen en 5 combinatie-behandelingen zouden dit $10 \times 294 + 5 \times 588 = 5.880$ muizen zijn. 1/3 van het totaal aantal muizen is nodig i.v.m. uitval ten gevolge van de GO/NO GO criteria: $5.880 : 3 = 1.960$ muizen. 5% hiervan zal ernstig ongerief ondervinden: $1.960 \times 0,05 = 98$ muizen die ernstig ongerief ondervinden. De overige dieren ($1.960 - 98 = 1.862$ muizen) ondervinden matig ongerief.

Het percentage van 5% van de muizen dat (kortdurend) ernstig ongerief zal ondervinden is gebaseerd op ervaringen in het verleden met dit soort studies. (Een inschatting op basis van retrospectieve beoordeling van de voorgaande vergunning is ons inziens niet realistisch. De gebruikte (combinaties van) middelen en hun te onderzoeken effectiviteit bepalen hoeveel muizen een klinisch beeld ontwikkelen en hoeveel muizen de humane eindpunten bereiken en dus kortdurend ernstig ongerief ondervinden. In het huidige project worden andere, effectievere en/of minder succesvolle (combinaties van) middelen gebruikt dan in het voorgaande project, waardoor een inschatting op basis van de voorgaande vergunning een over- of onderschatting kan geven.)

De meeste studies duren maximaal 24 uur, maar op het grootste deel van de muizen zal sectie worden verricht al vroeg na infectie. Dit is het meest interessante stuk van de concentratie-tijd curve (PK curve), en daarom worden in dit stuk de meeste data verzameld. Door sectie te verrichten al vroeg na infectie ontwikkelen de meeste dieren geen klinisch beeld en bereiken ze de humane eindpunten niet.

Bij middelen met een lange halfwaardetijd duren de studies langer dan 24 uur en is het eerste deel van de PK curve wat meer uitgesmeerd. De kans dat hier dieren een klinisch beeld en eventueel ernstig ongerief ontwikkelen is iets groter dan bij 24-uurs studies, maar nog steeds zal dit een kleine groep dieren zijn; die dieren waarop relatief laat na infectie sectie plaatsvindt.

Exposure-respons proeven (fase 2, fase 3 studie B en C, fase 4, fase 5):

15% van de dieren in PK/PD-experimenten ondervindt ernstig ongerief (inschatting o.b.v. ervaringen in het verleden met dergelijke experimenten). In deze experimenten worden per mono-behandeling maximaal 88 (fase 2) + 216 (fase 3 studie B) + 504 (fase 3 studie C) + 270 (fase 4) = 1.078 muizen gebruikt; per combinatie-behandeling maximaal 88 (fase 2) + 432 (fase 3 studie B) + 600 (fase 3 studie C) + 306 (fase 4) + 324 (fase 5) = 1.750 muizen. Voor 10 succesvolle mono-behandelingen en 5 combinatie-behandelingen zouden dit $10 \times 1.078 + 5 \times 1.750 = 19.530$ muizen zijn. 1/3 van het totaal aantal muizen is nodig i.v.m. uitval ten gevolge van de GO/NO GO criteria: $19.530 : 3 = 6.510$ muizen. 15% hiervan zal ernstig ongerief ondervinden: $6.510 \times 0,15 = 976$ muizen die ernstig ongerief ondervinden. De overige dieren ($6.510 - 976 = 5.534$ muizen) ondervinden matig ongerief.

Het percentage van 15% van de muizen dat (kortdurend) ernstig ongerief zal ondervinden is gebaseerd op ervaringen in het verleden met dit soort studies. (Een inschatting op basis van retrospectieve beoordeling van de voorgaande vergunning is ons inziens niet realistisch. De gebruikte (combinaties van) middelen en hun te onderzoeken effectiviteit bepalen hoeveel muizen een klinisch beeld ontwikkelen en hoeveel muizen de humane eindpunten bereiken en dus kortdurend ernstig ongerief ondervinden. In het huidige project

worden andere, effectievere en/of minder succesvolle (combinaties van) middelen gebruikt dan in het voorgaande project, waardoor een inschatting op basis van de voorgaande vergunning een over- of onderschatting kan geven.)

De meeste studies duren 24 uur na start behandeling. Dieren die met placebo behandeld zijn, of met een lage dosering van een middel, of met een middel dat helemaal niet *in vivo* effectief is tegen de bacteriële verwekker, kunnen een klinisch beeld ontwikkelen en de humane eindpunten bereiken. Dit is niet altijd het geval, want sommige bacteriestammen leiden tot een heel gematigd klinisch beeld waarbij de humane eindpunten niet bereikt worden, ook niet in de placebo-behandelde groepen. (Deze dieren hebben dan wel een hoge bacteriële load zoals benodigd om wetenschappelijke conclusies te trekken, waardoor de vraagstelling wél beantwoord kan worden.)

De inschatting is dat ongeveer de helft van de studies zal worden uitgevoerd met stammen die altijd een gematigd klinisch beeld geven (muizen ondervinden matig ongerief), en de andere helft met stammen die in de placebo-behandelde en in de laag-gedoseerde muizen een ernstig klinisch beeld geven (muizen ondervinden kortdurend ernstig ongerief). Van deze laatste groep verwachten we dat ongeveer 30% van de muizen ernstig ongerief zal ondervinden (placebogroep en de laagst gedoseerde muizen). In totaal zal dus 15% van de muizen ernstig ongerief ondervinden.

Totaal:

Matig ongerief: 270 (fase 1) + 1.862 (PK-proeven) + 5.534 (exposure-respons proeven) = 7.666 muizen
Ernstig ongerief: 270 (fase 1) + 98 (PK-proeven) + 976 (exposure-respons proeven) = 1.344 muizen

Totaal: 7.666 + 1.344 = 9.010 muizen

G. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welke keuzes daarbij zijn gemaakt.

Vervanging	<p>Voordat middelen in dieren getest worden, zijn ze reeds <i>in vitro</i> getest. Alleen de (combinaties van) middelen met potentie om <i>in vivo</i> werkzaam te kunnen zijn, zullen in dieren onderzocht worden.</p> <p>Op basis van de data die wordt verkregen uit het <i>in vivo</i> en het <i>in vitro</i> onderzoek kan de stap naar klinische studies worden gemaakt, omdat de exposure-respons relaties in dit model goed overeenkomen met de verwachte respons bij patiënten. Ook voor het opstellen of herzien van de productinformatie van middelen is deze data nodig. De European Medicines Agency (EMA) heeft het voornemen om de productinformatie van bestaande antibiotica de komende jaren te herzien onder andere aan de hand van informatie gegenereerd in diermodellen die relevant zijn voor de latere indicatie. Voor colistine is dit inmiddels gebeurd. Vervangen van deze dierproeven is daarom niet mogelijk.</p>
Vermindering	<p>Door de gestandaardiseerde opzet van de proeven kunnen de resultaten verkregen voor een middel (of combinatie) goed vergeleken worden met die voor een ander middel (of combinatie), verkregen in dit project, eerdere projecten, of beschreven in de literatuur. Ook is door de gekozen gestandaardiseerde opzet slechts een beperkt aantal onbehandelde controledieren nodig.</p> <p>Voor het bepalen van een standaard exposure-respons curve wordt het minimale aantal dieren gebruikt waarvan verwacht mag worden dat daarmee het effect kan worden beschreven, zonder de noodzaak tot veelvuldig herhalen van de proef. Dit laatste zou bovendien extra controledieren vragen.</p> <p>Door het hanteren van heldere GO/NO GO-criteria worden middelen die al in een vroeg stadium van het onderzoek blijken geen potentie te hebben om <i>in vivo</i> werkzaam te zijn niet verder onderzocht en wordt onnodig proefdiergebruik voorkomen. Experimentele middelen worden vaak voor 1 bacteriespecies ontwikkeld. Bij screening op vroege bacteriedodende activiteit (fase 2) worden dan niet meteen 4</p>

	<p>bacteriestammen gebruikt voor infectie, maar eerst 1 stam. Als het middel dan geen activiteit vertoont, is dit een NO GO. Deze experimenten worden met kleine groepen (n=2) uitgevoerd, dit is voldoende om eventueel aanwezige vroege bacteriedodende activiteit te zien.</p> <p>Alle andere experimenten worden uitgevoerd met minimaal 2 en maximaal 3 muizen per groep. Het definitieve aantal dieren per groep wordt bepaald aan de hand van de te verwachten inter-individuele variatie. Bij kleine inter-individuele variatie kan volstaan worden met 2 muizen per groep; bij grotere variatie (ondanks de standaardisatie van het model) zijn 3 muizen per groep noodzakelijk. Wanneer 2 muizen per groep nodig zijn, dan zijn uiteraard ook in totaal per middel of per combinatie minder dieren nodig; de berekeningen zijn gemaakt op basis van 3 dieren per groep.</p> <p>Wanneer voor concentratie-bepaling van middelen kan volstaan met een kleine hoeveelheid plasma, dan wordt ook tijdens het experiment bloed afgenomen bij de muizen. Dit leidt tot een reductie van het aantal sectie-momenten, en dus tot reductie van het benodigd aantal proefdieren.</p> <p>In geval van nieuwe antibiotica is een comparator-antibioticum nodig als controle om het effect van het nieuwe antibioticum mee te vergelijken. De noodzaak voor deze controlegroep is er bij bestaande antibiotica niet altijd. Daarom kan deze groep in voorkomende gevallen vervallen, wat leidt tot een vermindering van het benodigd aantal dieren.</p> <p>De proefopzet van de proeven wordt voorgelegd aan de IvD. Hierbij wordt het aantal dieren gedetailleerd verantwoord.</p> <p>Door het gebruik van computere modellen voor bepaling van het PK profiel en de exposure-respons relatie, zijn – op basis van jarenlange eigen ervaring en gepubliceerde literatuur – minimaal 2 dieren en maximaal 3 dieren per groep voldoende om met voldoende power de parameters te bepalen. (De uiteindelijke groeps grootte hangt af van de verwachte inter-individuele variatie.) Vermindering van deze aantallen of vermindering van het aantal datapunten zou leiden tot onvoldoende power.</p>
Verfijning	<p>Voor de <i>in vivo</i> doseringen wordt rekening gehouden met hetgeen bekend is over toxiciteit en/of tolerantie van de middelen, de minimaal toxische dosis of de maximaal getolereerde dosis is de hoogste dosis die <i>in vivo</i> wordt getest voor het bepalen van exposure-response relaties.</p> <p>De geïntroduceerde infectie zal bij de hogere doseringen niet leiden tot een uitgebreide infectie.</p> <p>Dosering van cyclofosfamide via de intraperitoneale route is zo geoptimaliseerd dat ziekte door neutropenie zo minimaal mogelijk is.</p> <p>De ernst van de welzijnsaantasting wordt verder zoveel mogelijk beperkt door het in acht nemen van de humane eindpunten.</p> <p>Door dieren in groepen te huisvesten met gepaste kooiverrijking wordt de proef verder verfijnd.</p> <p>Zo veel als mogelijk is zal het werken met bacteriestammen die ernstig ongerief kunnen veroorzaken vermeden worden. Echter, soms is dit niet mogelijk vanwege de klinische relevantie van deze stammen.</p> <p>Proeven waarin het PK profiel wordt bepaald zijn slechts van relatief korte duur, waardoor de ziekte nog niet veel progressie heeft gemaakt.</p> <p>Voor nieuwe antibiotica, non-antibiotica en voor sommige oude antibiotica geldt dat onbekend is bij welk doseringsschema ze antibacterieel effectief zijn. Doseringsschema's die niet effectief blijken te zijn, zullen relatief meer ongerief</p>

kunnen veroorzaken dan succesvolle schema's. Omdat dit de vraagstelling van het onderzoek is, kan in de keuze van middelen en doseringsschema's, die gemaakt worden op basis van literatuur en verwachtingen, geen verdere verfijning plaatsvinden.

Alles wordt in het werk gesteld om de periode van ernstig ongerief zo kort mogelijk te houden, zoals beschreven in vraag E (humane eindpunten).

Ongerief wordt zo veel mogelijk geminimaliseerd door gebruik van adequate analgetica.

Hoewel we ons realiseren dat een doseringsschema met relatief korte intervallen tussen de dosering ongerief veroorzaakt, is er momenteel geen alternatief. Het gebruik van automatische pompjes (zoals ALZET pompjes) is niet mogelijk vanwege de instabiliteit van de meeste middelen. Daarnaast is dit voor combinaties van middelen – waarbij de doseringsfrequentie van het ene middel wel en het andere middel niet wordt gevarieerd – niet mogelijk. Middelen worden indien mogelijk wel gemengd in de spuit, zodat per dosismoment maar een keer toegediend hoeft te worden.

Zijn er nadelige milieueffecten te verwachten?

Nee

Ja > Benoem de te verwachten milieueffecten en geef aan welke maatregelen zijn genomen om deze tot een minimum te beperken.

H. Hergebruik

Worden er dieren ingezet die eerder in een andere dierproef zijn gebruikt?

Nee, ga verder met vraag I.

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico op) ernstig ongerief?

Nee

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

I. Herhaling

Geef voor wettelijk vereist onderzoek aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing, geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

N.v.t., dit betreft geen wettelijk vereist onderzoek.

J. Plaats waar de dierproef wordt uitgevoerd

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder Wod valt?

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

K. Bestemming van de dieren bij einde experiment

Worden de dieren gedood?

Nee > Beschrijf de bestemming van de dieren.

Ja > Geef aan waarom de dieren worden gedood.

Aan het eind van de proef worden de dieren geëuthanaseerd voor het verzamelen van bloed, longen en andere relevante organen en het verrichten van BAL. Uit deze materialen wordt het optimale bacterieel inoculum en de PK/PD relatie bepaald.

Indien dieren worden gedood, wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van Richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja > Betreft het een dodingsmethode die alleen onder specifieke voorwaarden mag worden toegepast?

Nee > Beschrijf de dodingsmethode

Cervicale dislocatie (onder isofluraan-anesthesie) of CO₂ verstikking.

De onderzoeksgroep is zeer ervaren met deze methode van doden. Het is een snelle methode met kortdurend lijden voor het proefdier. Na nekbreuk kan BAL worden uitgevoerd en kunnen longen en relevante organen worden verzameld.

Ja > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Indien dieren worden gedood, maar niet in het kader van de proef, geef aan of herplaatsing is overwogen en waarom hiervan is afgezien.

De dieren worden alleen in het kader van de proeven gedood of om welzijnsproblemen te voorkomen door gebruik van humane eindpunten.

Van: 5.1 lid2e
Verzonden: maandag 29 augustus 2022 14:02
Aan: Info-zbo
Onderwerp: RE: Aanhouden AVD 5.1 lid2h 202215947

Categorieën: Dossier: 5.1 lid2e

Ha 5.1 lid2e

Nette mail van 5.1 lid2h. Zullen we even bellen om samen te bepalen hoe te reageren en/of de vraag aan 5.1 lid2h aan te passen?

En als antwoord op je andere mail: Ja, ik ben morgen ook op kantoor!

Groeten, 5.1 lid2e

Van: 5.1 lid2e **Namens** Info-zbo
Verzonden: maandag 29 augustus 2022 12:33
Aan: 5.1 lid2e
Onderwerp: FW: Aanhouden AVD 5.1 lid2h 202215947

Ha 5.1 lid2e

Ik kreeg deze reactie van 5.1 lid2h op vragen die wij aan de aanvrager hebben gesteld in de vorige vergadering. Het is misschien handig dat jij hier ook van weet, we hadden het tijdens het vorige clusteroverleg kort over het stellen van deze vraag. De aanvraag komt pas 23-09 weer in vergadering omdat de onderzoeker momenteel met verlof is. Ik zal dan deze reactie van de DEC ook verwerken in de aanvullende adviesnota.

Groeten 5.1 lid2e

Medewerker behandelen en ontwikkelen
Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag
.....

T: 0800 7890789
E: info@zbo-ccd.nl

Van: 5.1 lid2h
Verzonden: maandag 29 augustus 2022 11:51
Aan: info@zbo-ccd.nl
Onderwerp: RE: Aanhouden AVD 5.1 lid2h 202215947

Geachte CCD,

Op 15 augustus jl. hebben wij van U een e-mail ontvangen met daarin aanvullende vragen die U aan de indiener heeft gesteld.

Wij kunnen ons niet aan de indruk onttrekken dat één van deze vragen mogelijk geïnitieerd is door een opmerking die wij in ons advies hadden opgenomen.

Onze opmerking had betrekking op de mogelijke positieve bijdrage aan de afweging van het in vervolgaanvragen vermelden van voor de afweging relevante opbrengsten en beschrijvingen van aantallen tot dan toe uitgevoerde experimenten en gebruikte aantallen dieren.

Nog afgezien van het feit dat wij voor dit betreffende project een afweging resulterend in een positief advies hebben kunnen maken was het een algemene opmerking die niet specifiek op dit project betrekking had.

Deze opmerking was vooral ingegeven door de situatie dat de CCD bezig is aan de herziening van een aantal handreikingen en het misschien te overwegen zou zijn een zinsnede van deze strekking daarin op te gaan nemen. Onze opmerking had, wanneer dit relevant zou kunnen zijn voor de afweging, betrekking op alle vervolgaanvragen. Wij hebben ons terdege gerealiseerd dat dit niet een verkapte manier zou moeten worden om in geval van projecten waarin sprake is van ernstig ongerief, zoals in het betreffende project, de termijnen voor de wettelijk voorgeschreven 'Beoordeling achteraf' te omzeilen of al een voorschot op dit beoordelingstraject te nemen.

Met vriendelijke groet,

5.1 lid2h

P.S.

Excuses. Door drukke werkzaamheden en vakanties is deze reactie wat verlaat.

Van: info@zbo-ccd.nl <info@zbo-ccd.nl>

Verzonden: maandag 15 augustus 2022 10:19

Aan: 5.1 lid2h ; 5.1 lid2e

CC: 5.1 lid2e ; 5.1 lid2h

Onderwerp: Aanhouden AVD 5.1 lid2h 202215947

Geachte 5.1 lid2e ,

Op 25-03-2022 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Nieuwe (combinatie)therapieën tegen infecties door multiresistente en moeilijk behandelbare bacteriën 2" met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202215947. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In dit bericht leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

Wij hebben de volgende informatie van u nodig om uw aanvraag verder te kunnen beoordelen:

Onduidelijkheden

Uw aanvraag is afgelopen vrijdag besproken in de CCD vergadering. Naar aanleiding van de gevoerde discussie wil de commissie u nog aanvullende vragen stellen:

- De studie is een vervolg op een eerder door de CCD toegewezen project. Kunt u iets toelichten over hoeveel dieren er toen zijn gebruikt in hoeveel verschillende experimenten, wat het ongerief was en waar de resultaten toe geleid hebben (niet alleen in de zin van doorontwikkeling van nieuwe behandelstrategieën maar ook ten aanzien van verfijning van de modellen).
- Verder is de commissie geïnteresseerd in uw motivering voor de gebruikte diersoort en diermodellen, hierbij rekening houdend met de translationele waarde van de modellen. Kunt u hiervoor nog verdere onderbouwing geven?

Zonder deze aanvullende informatie kan de beslissing nadelig voor u uitvallen omdat de gegevens onvolledig of onduidelijk zijn.

Opsturen binnen veertien dagen

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van dit bericht op. U kunt dit aanleveren via NetFTP.

Uw aanvraag zal 2 september opnieuw worden besproken in de CCD vergadering. Wij verzoeken u uiterlijk 25 augustus de ontbrekende informatie in te dienen.

Wanneer een beslissing

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Mocht u vragen hebben, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

5.1 lid2e
www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag
.....

T: 0800 789 0789
E: info@zbo-ccd.nl

Dit bericht kan informatie bevatten die niet voor u is bestemd. Indien u niet de geadresseerde bent of dit bericht abusievelijk aan u is gezonden, wordt u verzocht dat aan de afzender te melden en het bericht te verwijderen.

De Staat aanvaardt geen aansprakelijkheid voor schade, van welke aard ook, die verband houdt met risico's verbonden aan het elektronisch verzenden van berichten.

This message may contain information that is not intended for you. If you are not the addressee or if this message was sent to you by mistake, you are requested to inform the sender and delete the message.
The State accepts no liability for damage of any kind resulting from the risks inherent in the electronic transmission of messages.

Van: 5.1 lid2e
Verzonden: dinsdag 30 augustus 2022 16:47
Aan: 5.1 lid2e); 5.1 lid2e
CC: 5.1 lid2e
Onderwerp: RE: schriftelijke ronde

Beste 5.1 lid2e

Ik ben het eens met jouw evaluatie van de antwoorden van de aanvrager. En dus ook met het advies dat dit project vergund kan worden.

Vriendelijke groet,

5.1 lid2e

Van: 5.1 lid2e
Verzonden: dinsdag 30 augustus 2022 15:59
Aan: 5.1 lid2e
CC: 5.1 lid2e
Onderwerp: schriftelijke ronde

Beste 5.1 lid2e ,

Vorige vergadering was er een aanvraag aangehouden die terug in vergadering moest. Dit was dossier 30 in de map van 12 augustus. De aanvrager was met verlof en kon pas gisteren de antwoorden indienen. Er is met 5.1 lid2e overleg geweest en gezien de aard van de vragen en de termijn wil ik jullie vragen of jullie toch over de mail toestemming kunnen geven voor vergunnen. De vragen gingen over gebruikte dieren en ongerief in de voorgaande vergunning en de onderbouwing van de diersoort.

De vragen en antwoorden van de aanvrager zijn als volgt:

Onduidelijkheden:

- De studie is een vervolg op een eerder door de CCD toegewezen project. Kunt u iets toelichten over hoeveel dieren er toen zijn gebruikt in hoeveel verschillende experimenten, wat het ongerief was en waar de resultaten toe geleid hebben (niet alleen in de zin van doorontwikkeling van nieuwe behandelstrategieën maar ook ten aanzien van verfijning van de modellen).

Antwoord:

In totaal zijn in het voorgaande project 5237 muizen gebruikt in een groot aantal studies, waarvan 5078 muizen matig en 159 muizen ernstig ongerief hebben ondervonden.

Dit is toegevoegd in het projectvoorstel (vraag 3.1, Wat is er al gedaan?).

Een retrospectieve evaluatie van het voorgaande project is momenteel in voorbereiding. Hierin zullen nadere details over de uitgevoerde studies volgen.

Een inschatting van benodigde aantallen dieren en verwacht ongerief op basis van retrospectieve beoordeling van de voorgaande vergunning is ons inziens niet realistisch. De gebruikte (combinaties van) middelen en hun te onderzoeken effectiviteit bepalen hoeveel muizen een klinisch beeld ontwikkelen en hoeveel muizen de humane eindpunten bereiken en dus kortdurend ernstig ongerief ondervinden. In het huidige project worden andere, effectievere en/of minder succesvolle (combinaties van) middelen gebruikt dan in het voorgaande project, waardoor een inschatting op basis van de voorgaande vergunning een over- of onderschatting kan geven.

Deze tekst staat vermeld in beide bijlagen (vraag F).

In de voorgaande vergunning hebben we veel verschillende experimenten gedaan voor 10 bestaande middelen als mono-behandeling, 4 combinaties van bestaande middelen, en voor 1 nieuw middel en verschillende analogen daarvan. Resultaten van enkele studies worden gebruikt als input voor klinische studies die gepland staan.

Naast deze wetenschappelijke en maatschappelijke resultaten zijn de gebruikte modellen in de afgelopen jaren ook verder verfijnd. Er is veel ervaring opgebouwd met de modellen en het infectieverloop na inoculatie van verschillende bacteriespecies en -stammen. Deze ervaring heeft ertoe geleid dat wij als onderzoekers steeds preciezer kunnen inschatten of en wanneer de humane eindpunten bereikt zullen worden binnen de duur van het experiment, waardoor de periode van ernstig ongerief zo kort mogelijk gehouden kan worden. Ook duurden alle studies maximaal 24 uur na start van de behandeling (26 uur na infectie); de halfwaardetijden van de middelen die we hebben onderzocht was niet zodanig lang dat langduriger experimenten (>24 uur na start behandeling) noodzakelijk waren. Hierdoor is de periode van ongerief zo kort mogelijk gehouden. De doseringsfrequentie van de gebruikte middelen is waar mogelijk gekozen op basis van literatuur en aannames op basis van gegevens van vergelijkbare middelen, waardoor zeer frequent doseren (elke 2 uur gedurende 24 uur) slechts in een beperkt aantal gevallen nodig is geweest.

- Verder is de commissie geïnteresseerd in uw motivering voor de gebruikte diersoort en diermodellen, hierbij rekening houdend met de translationele waarde van de modellen. Kunt u hiervoor nog verdere onderbouwing geven?

Antwoord:

Het dijspier- en het longmodel in de neutropene muis zijn modellen die worden aanbevolen in de richtlijnen van het European Medicines Agency (EMA) en zijn internationaal geaccepteerd voor het bepalen van de PK/PD index en de PD target, om doseringen in klinische studies te bepalen. Resultaten behaald in deze modellen worden door het EMA geaccepteerd in het dossier in voorbereiding op klinische studies. Het dijspiermodel is een veelgebruikt en zeer gestandaardiseerd model dat gebruikt wordt om infecties in de weke delen te simuleren. Het longmodel wordt ook veel toegepast, omdat de penetratie van middelen in de longen kan afwijken van die in het bloed, waardoor middelen bij longinfecties verminderd effectief kunnen zijn. Er worden neutropene muizen gebruikt om de pure interactie tussen de bacterie en het antibioticum te bepalen, zonder tussenkomst van het immuunsysteem. De modellen worden internationaal toegepast voor het bepalen van de PK/PD index en de PD target.

Voor de modellen is een directe correlatie tussen de PK/PD indexen in neutropene, geïnfecteerde muizen enerzijds en mensen anderzijds voor verschillende antibiotica **5.1 lid2h, 5.1 lid2e**, wat de hoge translationele waarde van de modellen aangeeft.

Bovenstaande stond gedeeltelijk al vermeld in het projectvoorstel (vraag 3.1). De translationele waarde is extra benadrukt in beide bijlagen (vraag B, diersoort).

Naar aanleiding van de vragen heeft de DEC ook nog een reactie gegeven:

Geachte CCD,

Op 15 augustus jl. hebben wij van U een e-mail ontvangen met daarin aanvullende vragen die U aan de indiener heeft gesteld.

Wij kunnen ons niet aan de indruk onttrekken dat één van deze vragen mogelijk geïnitieerd is door een opmerking die wij in ons advies hadden opgenomen.

Onze opmerking had betrekking op de mogelijke positieve bijdrage aan de afweging van het in vervolgaanvragen vermelden van voor de afweging relevante opbrengsten en beschrijvingen van aantallen tot dan toe uitgevoerde experimenten en gebruikte aantallen dieren.

Nog afgezien van het feit dat wij voor dit betreffende project een afweging resulterend in een positief advies hebben kunnen maken was het een algemene opmerking die niet specifiek op dit project betrekking had.

Deze opmerking was vooral ingegeven door de situatie dat de CCD bezig is aan de herziening van een aantal handreikingen en het misschien te overwegen zou zijn een zinsnede van deze strekking daarin op te gaan nemen.

Onze opmerking had, wanneer dit relevant zou kunnen zijn voor de afweging, betrekking op alle vervolgaanvragen. Wij hebben ons terdege gerealiseerd dat dit niet een verkapt manier zou moeten worden om in geval van projecten waarin

sprake is van ernstig ongerief, zoals in het betreffende project, de termijnen voor de wettelijk voorgeschreven 'Beoordeling achteraf' te omzeilen of al een voorschot op dit beoordelingstraject te nemen.

Met vriendelijke groet,

De DEC **5.1 lid2h**

5.2 lid1

Met vriendelijke groeten,

5.1 lid2e

Medewerker behandelen en ontwikkelen

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag
.....

T: 0800 7890789

E: info@zbo-ccd.nl

Van: 5.1 lid2e
Verzonden: dinsdag 30 augustus 2022 18:13
Aan: 5.1 lid2e
CC: 5.1 lid2e
Onderwerp: RE: schriftelijke ronde

Beste 5.1 lid2e ,

Mbt onderstaande vragen en antwoorden wil ik twee punten noemen:

- 1) De aanvrager stelt dat hij/zij *'en/of minder succesvolle (combinaties van) middelen'* wil testen. Dit lijkt mij toch niet acceptabel. Eerst maar eens uitzoeken hoe het kan dat deze middelen minder succesvol zijn! Misschien bedoelt de aanvrager iets anders, maar dan dient dat opgehelderd te worden.
- 2) Het is niet bedoeling dat de CCD vragen stelt omdat zij *'geïnteresseerd'* is in iets wetenschappelijks, de aanpak van een experiment oid (*verder is de commissie geïnteresseerd in uw motivering voor de gebruikte diersoort en diermodellen*), dat verwijt men ons wel en dan gaan wij ons boekje te buiten. Wij kunnen slechts vragen stellen, die voor ons wezenlijke informatie geven, zodat we de morele afweging kunnen maken tussen datgene wat er met x # dieren wordt gedaan en de mogelijke baten daarvan. Mijn advies is dan ook om de vraag standaard te formuleren als: kunt u onderbouwen waarom u voor de betreffende diersoort(en) en de betreffende diermodel(len) heeft gekozen?

Vriendelijke groet,

5.1 lid2e

From: 5.1 lid2e
Sent: Tuesday, August 30, 2022 3:59 PM
To: 5.1 lid2e 5.1 lid2e
Cc: 5.1 lid2e
Subject: schriftelijke ronde

Beste 5.1 lid2e ,

Vorige vergadering was er een aanvraag aangehouden die terug in vergadering moest. Dit was dossier 30 in de map van 12 augustus. De aanvrager was met verlof en kon pas gisteren de antwoorden indienen. Er is met 5.1 lid2e overleg geweest en gezien de aard van de vragen en de termijn wil ik jullie vragen of jullie toch over de mail toestemming kunnen geven voor vergunnen. De vragen gingen over gebruikte dieren en ongerief in de voorgaande vergunning en de onderbouwing van de diersoort.

De vragen en antwoorden van de aanvrager zijn als volgt:

Onduidelijkheden:

- De studie is een vervolg op een eerder door de CCD toegewezen project. Kunt u iets toelichten over hoeveel dieren er toen zijn gebruikt in hoeveel verschillende experimenten, wat het ongerief was en waar de resultaten toe geleid hebben (niet alleen in de zin van doorontwikkeling van nieuwe behandelstrategieën maar ook ten aanzien van verfijning van de modellen).

Antwoord:

In totaal zijn in het voorgaande project 5237 muizen gebruikt in een groot aantal studies, waarvan 5078 muizen matig en 159 muizen ernstig ongerief hebben ondervonden.

Dit is toegevoegd in het projectvoorstel (vraag 3.1, Wat is er al gedaan?).

Een retrospectieve evaluatie van het voorgaande project is momenteel in voorbereiding. Hierin zullen nadere details over de uitgevoerde studies volgen.

Een inschatting van benodigde aantallen dieren en verwacht ongerief op basis van retrospectieve beoordeling van de voorgaande vergunning is ons inziens niet realistisch. De gebruikte (combinaties van) middelen en hun te onderzoeken effectiviteit bepalen hoeveel muizen een klinisch beeld ontwikkelen en hoeveel muizen de humane eindpunten bereiken en dus kortdurend ernstig ongerief ondervinden. In het huidige project worden andere, effectievere en/of minder succesvolle (combinaties van) middelen gebruikt dan in het voorgaande project, waardoor een inschatting op basis van de voorgaande vergunning een over- of onderschatting kan geven.

Deze tekst staat vermeld in beide bijlagen (vraag F).

In de voorgaande vergunning hebben we veel verschillende experimenten gedaan voor 10 bestaande middelen als mono-behandeling, 4 combinaties van bestaande middelen, en voor 1 nieuw middel en verschillende analogen daarvan. Resultaten van enkele studies worden gebruikt als input voor klinische studies die gepland staan.

Naast deze wetenschappelijke en maatschappelijke resultaten zijn de gebruikte modellen in de afgelopen jaren ook verder verfijnd. Er is veel ervaring opgebouwd met de modellen en het infectieverloop na inoculatie van verschillende bacteriespecies en -stammen. Deze ervaring heeft ertoe geleid dat wij als onderzoekers steeds preciezer kunnen inschatten of en wanneer de humane eindpunten bereikt zullen worden binnen de duur van het experiment, waardoor de periode van ernstig ongerief zo kort mogelijk gehouden kan worden. Ook duurden alle studies maximaal 24 uur na start van de behandeling (26 uur na infectie); de halfwaardetijden van de middelen die we hebben onderzocht was niet zodanig lang dat langduriger experimenten (>24 uur na start behandeling) noodzakelijk waren. Hierdoor is de periode van ongerief zo kort mogelijk gehouden. De doseringsfrequentie van de gebruikte middelen is waar mogelijk gekozen op basis van literatuur en aannames op basis van gegevens van vergelijkbare middelen, waardoor zeer frequent doseren (elke 2 uur gedurende 24 uur) slechts in een beperkt aantal gevallen nodig is geweest.

- Verder is de commissie geïnteresseerd in uw motivering voor de gebruikte diersoort en diermodellen, hierbij rekening houdend met de translationele waarde van de modellen. Kunt u hiervoor nog verdere onderbouwing geven?

Antwoord:

Het dijspier- en het longmodel in de neutropene muis zijn modellen die worden aanbevolen in de richtlijnen van het European Medicines Agency (EMA) en zijn internationaal geaccepteerd voor het bepalen van de PK/PD index en de PD target, om doseringen in klinische studies te bepalen. Resultaten behaald in deze modellen worden door het EMA geaccepteerd in het dossier in voorbereiding op klinische studies. Het dijspiermodel is een veelgebruikt en zeer gestandaardiseerd model dat gebruikt wordt om infecties in de weke delen te simuleren. Het longmodel wordt ook veel toegepast, omdat de penetratie van middelen in de longen kan afwijken van die in het bloed, waardoor middelen bij longinfecties verminderd effectief kunnen zijn. Er worden neutropene muizen gebruikt om de pure interactie tussen de bacterie en het antibioticum te bepalen, zonder tussenkomst van het immuunsysteem. De modellen worden internationaal toegepast voor het bepalen van de PK/PD index en de PD target.

Voor de modellen is een directe correlatie tussen de PK/PD indexen in neutropene, geïnfecteerde muizen enerzijds en mensen anderzijds voor verschillende antibiotica **5.1 lid2h, 5.1 lid2e** wat de hoge translationele waarde van de modellen aangeeft.

Bovenstaande stond gedeeltelijk al vermeld in het projectvoorstel (vraag 3.1). De translationele waarde is extra benadrukt in beide bijlagen (vraag B, diersoort).

Naar aanleiding van de vragen heeft de DEC ook nog een reactie gegeven:

Geachte CCD,

Op 15 augustus jl. hebben wij van U een e-mail ontvangen met daarin aanvullende vragen die U aan de indiener heeft gesteld.

Wij kunnen ons niet aan de indruk onttrekken dat één van deze vragen mogelijk geïnitieerd is door een opmerking die wij in ons advies hadden opgenomen.

Onze opmerking had betrekking op de mogelijke positieve bijdrage aan de afweging van het in vervolgaanvragen vermelden van voor de afweging relevante opbrengsten en beschrijvingen van aantallen tot dan toe uitgevoerde experimenten en gebruikte aantallen dieren.

Nog afgezien van het feit dat wij voor dit betreffende project een afweging resulterend in een positief advies hebben kunnen maken was het een algemene opmerking die niet specifiek op dit project betrekking had.

Deze opmerking was vooral ingegeven door de situatie dat de CCD bezig is aan de herziening van een aantal handreikingen en het misschien te overwegen zou zijn een zinsnede van deze strekking daarin op te gaan nemen. Onze opmerking had, wanneer dit relevant zou kunnen zijn voor de afweging, betrekking op alle vervolgaanvragen. Wij hebben ons terdege gerealiseerd dat dit niet een verkapte manier zou moeten worden om in geval van projecten waarin sprake is van ernstig ongerief, zoals in het betreffende project, de termijnen voor de wettelijk voorgeschreven 'Beoordeling achteraf' te omzeilen of al een voorschot op dit beoordelingstraject te nemen.

Met vriendelijke groet,

5.1 lid2h

5.2 lid1

Met vriendelijke groeten,

5.1 lid2e

Medewerker behandelen en ontwikkelen
Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag
.....

T: 0800 7890789
E: info@zbo-ccd.nl

Van: 5.1 lid2e
Verzonden: donderdag 1 september 2022 15:51
Aan: 5.1 lid2e 5.1 lid2e
CC: 5.1 lid2e
Onderwerp: RE: schriftelijke ronde

Beste allen,

5.1 lid2e dank voor jouw reactie. Zo zie je maar dat zaken op een verschillende manier gelezen, dan wel geïnterpreteerd kunnen worden.

Jij geeft aan dat je het bezwaarlijk vindt om nu voor een derde maal een vraag te stellen, omdat we ook niet willen dat de DEC dat doet. Voor de DEC gaat dat inderdaad op, om te voorkomen dat men 'meeschrijft'. Hier vindt ik het principiële anders liggen; wij geven een vergunning af, dan moet het volstrekt duidelijk zijn wat er vergunt wordt. Hier betreft het een onduidelijkheid, die mogelijk kan leiden tot onnodig inzet van dieren met ongerief als gevolg. Dus ik ben van mening dat er toch om een opheldering moet worden gevraagd.

Vriendelijke groet,
Tot morgen,

5.1 lid2e

From: 5.1 lid2e
Sent: Wednesday, August 31, 2022 9:50 AM
To: 5.1 lid2e
Cc: 5.1 lid2e
Subject: RE: schriftelijke ronde

Beste 5.1 lid2e ,

Bedankt voor jullie snelle reactie. Ten aanzien van de punten van 5.1 lid2e

1) ik heb het kennelijk anders gelezen dan jij. De aanvrager geeft aan dat de aantallen van de vorige keer niet makkelijk als basis gebruikt kunnen worden voor de nieuwe aanvraag. Daarbij geeft aanvrager inderdaad aan dat middelen succesvoller of minder succesvol kunnen zijn. Ik heb hierin gelezen "wanneer middelen minder succesvol blijken wordt een no-go ingelast waardoor de vervolgstudies niet gedaan worden". Al staat dit er natuurlijk niet letterlijk.

In ieder geval zie ik er wel tegenop een 3^e keer vragen te stellen, wij zeggen ook altijd tegen de DEC's dat ze maximaal 2 vragenrondes mogen houden. Maar wanneer je dit noodzakelijk acht kan ik de vraag nog wel stellen.

2) Ik begrijp je punt, ik zal voortaan andere bewoording gebruiken bij het stellen van vragen.

Mocht je willen overleggen dan kan je me natuurlijk bellen, ik zit van 10.00-11.00 in overleg en van 14.30 tot 15.30 maar de rest van de dag ben ik denk ik redelijk bereikbaar.

Vriendelijke groeten,
5.1 lid2e

Medewerker behandelen en ontwikkelen
Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag
.....

T: 0800 7890789
E: info@zbo-ccd.nl

Van: 5.1 lid2e

Verzonden: dinsdag 30 augustus 2022 18:13

Aan: 5.1 lid2e

CC: 5.1 lid2e

Onderwerp: RE: schriftelijke ronde

Beste 5.1 lid2e ,

Mbt onderstaande vragen en antwoorden wil ik twee punten noemen:

- 1) De aanvrager stelt dat hij/zij 'en/of minder succesvolle (combinaties van) middelen' wil testen. Dit lijkt mij toch niet acceptabel. Eerst maar eens uitzoeken hoe het kan dat deze middelen minder succesvol zijn! Misschien bedoelt de aanvrager iets anders, maar dan dient dat opgehelderd te worden.
- 2) Het is niet bedoeling dat de CCD vragen stelt omdat zij 'geïnteresseerd' is in iets wetenschappelijks, de aanpak van een experiment oid (*verder is de commissie geïnteresseerd in uw motivering voor de gebruikte diersoort en diermodellen*), dat verwijt men ons wel en dan gaan wij ons boekje te buiten. Wij kunnen slechts vragen stellen, die voor ons wezenlijke informatie geven, zodat we de morele afweging kunnen maken tussen datgene wat er met x # dieren wordt gedaan en de mogelijke baten daarvan. Mijn advies is dan ook om de vraag standaard te formuleren als: kunt u onderbouwen waarom u voor de betreffende diersoort(en) en de betreffende diermodel(len) heeft gekozen?

Vriendelijke groet,

5.1 lid2e

From: 5.1 lid2e

Sent: Tuesday, August 30, 2022 3:59 PM

To: 5.1 lid2e ; 5.1 lid2e

Cc: 5.1 lid2e

Subject: schriftelijke ronde

Beste 5.1 lid2e

Vorige vergadering was er een aanvraag aangehouden die terug in vergadering moest. Dit was dossier 30 in de map van 12 augustus. De aanvrager was met verlof en kon pas gisteren de antwoorden indienen. Er is met 5.1 lid2e overleg geweest en gezien de aard van de vragen en de termijn wil ik jullie vragen of jullie toch over de mail toestemming kunnen geven voor vergunnen. De vragen gingen over gebruikte dieren en ongerief in de voorgaande vergunning en de onderbouwing van de diersoort.

De vragen en antwoorden van de aanvrager zijn als volgt:

Onduidelijkheden:

- De studie is een vervolg op een eerder door de CCD toegewezen project. Kunt u iets toelichten over hoeveel dieren er toen zijn gebruikt in hoeveel verschillende experimenten, wat het ongerief was en waar de resultaten toe geleid hebben (niet alleen in de zin van doorontwikkeling van nieuwe behandelstrategieën maar ook ten aanzien van verfijning van de modellen).

Antwoord:

In totaal zijn in het voorgaande project 5237 muizen gebruikt in een groot aantal studies, waarvan 5078 muizen matig en 159 muizen ernstig ongerief hebben ondervonden.

Dit is toegevoegd in het projectvoorstel (vraag 3.1, Wat is er al gedaan?).

Een retrospectieve evaluatie van het voorgaande project is momenteel in voorbereiding. Hierin zullen nadere details over de uitgevoerde studies volgen.

Een inschatting van benodigde aantallen dieren en verwacht ongerief op basis van retrospectieve beoordeling van de voorgaande vergunning is ons inziens niet realistisch. De gebruikte (combinaties van) middelen en hun te onderzoeken effectiviteit bepalen hoeveel muizen een klinisch beeld ontwikkelen en hoeveel muizen de humane eindpunten bereiken en dus kortdurend ernstig ongerief ondervinden. In het huidige project worden andere, effectievere en/of minder succesvolle (combinaties van) middelen gebruikt dan in het voorgaande project, waardoor een inschatting op basis van de voorgaande vergunning een over- of onderschatting kan geven. Deze tekst staat vermeld in beide bijlagen (vraag F).

In de voorgaande vergunning hebben we veel verschillende experimenten gedaan voor 10 bestaande middelen als mono-behandeling, 4 combinaties van bestaande middelen, en voor 1 nieuw middel en verschillende analogen daarvan. Resultaten van enkele studies worden gebruikt als input voor klinische studies die gepland staan.

Naast deze wetenschappelijke en maatschappelijke resultaten zijn de gebruikte modellen in de afgelopen jaren ook verder verfijnd. Er is veel ervaring opgebouwd met de modellen en het infectieverloop na inoculatie van verschillende bacteriespecies en -stammen. Deze ervaring heeft ertoe geleid dat wij als onderzoekers steeds preciezer kunnen inschatten of en wanneer de humane eindpunten bereikt zullen worden binnen de duur van het experiment, waardoor de periode van ernstig ongerief zo kort mogelijk gehouden kan worden. Ook duurden alle studies maximaal 24 uur na start van de behandeling (26 uur na infectie); de halfwaardetijden van de middelen die we hebben onderzocht was niet zodanig lang dat langduriger experimenten (>24 uur na start behandeling) noodzakelijk waren. Hierdoor is de periode van ongerief zo kort mogelijk gehouden. De doseringsfrequentie van de gebruikte middelen is waar mogelijk gekozen op basis van literatuur en aannames op basis van gegevens van vergelijkbare middelen, waardoor zeer frequent doseren (elke 2 uur gedurende 24 uur) slechts in een beperkt aantal gevallen nodig is geweest.

- Verder is de commissie geïnteresseerd in uw motivering voor de gebruikte diersoort en diermodellen, hierbij rekening houdend met de translationele waarde van de modellen. Kunt u hiervoor nog verdere onderbouwing geven?

Antwoord:

Het dijspier- en het longmodel in de neutropene muis zijn modellen die worden aanbevolen in de richtlijnen van het European Medicines Agency (EMA) en zijn internationaal geaccepteerd voor het bepalen van de PK/PD index en de PD target, om doseringen in klinische studies te bepalen. Resultaten behaald in deze modellen worden door het EMA geaccepteerd in het dossier in voorbereiding op klinische studies. Het dijspiermodel is een veelgebruikt en zeer gestandaardiseerd model dat gebruikt wordt om infecties in de weke delen te simuleren. Het longmodel wordt ook veel toegepast, omdat de penetratie van middelen in de longen kan afwijken van die in het bloed, waardoor middelen bij longinfecties verminderd effectief kunnen zijn. Er worden neutropene muizen gebruikt om de pure interactie tussen de bacterie en het antibioticum te bepalen, zonder tussenkomst van het immuunsysteem. De modellen worden internationaal toegepast voor het bepalen van de PK/PD index en de PD target.

Voor de modellen is een directe correlatie tussen de PK/PD indexen in neutropene, geïnfecteerde muizen enerzijds en mensen anderzijds voor verschillende antibiotica **5.1 lid2h, 5.1 lid2e** wat de hoge translationele waarde van de modellen aangeeft.

Bovenstaande stond gedeeltelijk al vermeld in het projectvoorstel (vraag 3.1). De translationele waarde is extra benadrukt in beide bijlagen (vraag B, diersoort).

Naar aanleiding van de vragen heeft de DEC ook nog een reactie gegeven:

Geachte CCD,

Op 15 augustus jl. hebben wij van U een e-mail ontvangen met daarin aanvullende vragen die U aan de indiener heeft gesteld.

Wij kunnen ons niet aan de indruk onttrekken dat één van deze vragen mogelijk geïnitieerd is door een opmerking die wij in ons advies hadden opgenomen.

Onze opmerking had betrekking op de mogelijke positieve bijdrage aan de afweging van het in vervolgaanvragen vermelden van voor de afweging relevante opbrengsten en beschrijvingen van aantallen tot dan toe uitgevoerde experimenten en gebruikte aantallen dieren.

Nog afgezien van het feit dat wij voor dit betreffende project een afweging resulterend in een positief advies hebben kunnen maken was het een algemene opmerking die niet specifiek op dit project betrekking had.

Deze opmerking was vooral ingegeven door de situatie dat de CCD bezig is aan de herziening van een aantal handreikingen en het misschien te overwegen zou zijn een zinsnede van deze strekking daarin op te gaan nemen. Onze opmerking had, wanneer dit relevant zou kunnen zijn voor de afweging, betrekking op alle vervolgaanvragen. Wij hebben ons terdege gerealiseerd dat dit niet een verkapte manier zou moeten worden om in geval van projecten waarin sprake is van ernstig ongerief, zoals in het betreffende project, de termijnen voor de wettelijk voorgeschreven 'Beoordeling achteraf' te omzeilen of al een voorschot op dit beoordelingstraject te nemen.

Met vriendelijke groet,

5.1 lid2h

5.2 lid1

Met vriendelijke groeten,

5.1 lid2e

Medewerker behandelen en ontwikkelen

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag
.....

T: 0800 7890789

E: info@zbo-ccd.nl

Van: 5.1 lid2e
Verzonden: vrijdag 2 september 2022 08:52
Aan: 5.1 lid2e
Onderwerp: RE: schriftelijke ronde

Ha 5.1 lid2e
Ik geloof dat we deze optie al hadden besproken. Graag nog een derde vragenronde dus en hopelijk daarmee spoedige afhandeling na akkoord van 5.1 lid2e Akkoord 5.1 lid2e heb je in principe al, maar graag wel mee blijven nemen in de mailwisseling.
Succes! 5.1 lid2e

Van: 5.1 lid2e
Verzonden: donderdag 1 september 2022 15:51
Aan: 5.1 lid2e
CC: 5.1 lid2e
Onderwerp: RE: schriftelijke ronde

Beste allen,

5.1 lid2e dank voor jouw reactie. Zo zie je maar dat zaken op een verschillende manier gelezen, dan wel geïnterpreteerd kunnen worden.
Jij geeft aan dat je het bezwaarlijk vindt om nu voor een derde maal een vraag te stellen, omdat we ook niet willen dat de DEC dat doet. Voor de DEC gaat dat inderdaad op, om te voorkomen dat men 'meeschrijft'.
Hier vindt ik het principiële anders liggen; wij geven een vergunning af, dan moet het volstrekt duidelijk zijn wat er vergunt wordt. Hier betreft het een onduidelijkheid, die mogelijk kan leiden tot onnodig inzet van dieren met ongerief als gevolg. Dus ik ben van mening dat er toch om een opheldering moet worden gevraagd.

Vriendelijke groet,
Tot morgen,

5.1 lid2e

From: 5.1 lid2e
Sent: Wednesday, August 31, 2022 9:50 AM
To: 5.1 lid2e
Cc: 5.1 lid2e
Subject: RE: schriftelijke ronde

Beste 5.1 lid2e,

Bedankt voor jullie snelle reactie. Ten aanzien van de punten van 5.1 lid2e:

1) ik heb het kennelijk anders gelezen dan jij. De aanvrager geeft aan dat de aantallen van de vorige keer niet makkelijk als basis gebruikt kunnen worden voor de nieuwe aanvraag. Daarbij geeft aanvrager inderdaad aan dat middelen succesvoller of minder succesvol kunnen zijn. Ik heb hierin gelezen "wanneer middelen minder succesvol blijken wordt een no-go ingelast waardoor de vervolgstudies niet gedaan worden". Al staat dit er natuurlijk niet letterlijk.

In ieder geval zie ik er wel tegenop een 3^e keer vragen te stellen, wij zeggen ook altijd tegen de DEC's dat ze maximaal 2 vragenrondes mogen houden. Maar wanneer je dit noodzakelijk acht kan ik de vraag nog wel stellen.

2) Ik begrijp je punt, ik zal voortaan andere bewoording gebruiken bij het stellen van vragen.

Mocht je willen overleggen dan kan je me natuurlijk bellen, ik zit van 10.00-11.00 in overleg en van 14.30 tot 15.30 maar de rest van de dag ben ik denk ik redelijk bereikbaar.

Vriendelijke groeten,

5.1 lid2e

Medewerker behandelen en ontwikkelen

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag
.....

T: 0800 7890789

E: info@zbo-ccd.nl

Van: 5.1 lid2e

Verzonden: dinsdag 30 augustus 2022 18:13

Aan: 5.1 lid2e

CC: 5.1 lid2e

Onderwerp: RE: schriftelijke ronde

Beste 5.1 lid2e ,

Mbt onderstaande vragen en antwoorden wil ik twee punten noemen:

- 1) De aanvrager stelt dat hij/zij 'en/of minder succesvolle (combinaties van) middelen' wil testen. Dit lijkt mij toch niet acceptabel. Eerst maar eens uitzoeken hoe het kan dat deze middelen minder succesvol zijn! Misschien bedoelt de aanvrager iets anders, maar dan dient dat opgehelderd te worden.
- 2) Het is niet bedoeling dat de CCD vragen stelt omdat zij 'geïnteresseerd' is in iets wetenschappelijks, de aanpak van een experiment oid (*verder is de commissie geïnteresseerd in uw motivering voor de gebruikte diersoort en diermodellen*), dat verwijt men ons wel en dan gaan wij ons boekje te buiten. Wij kunnen slechts vragen stellen, die voor ons wezenlijke informatie geven, zodat we de morele afweging kunnen maken tussen datgene wat er met x # dieren wordt gedaan en de mogelijke baten daarvan. Mijn advies is dan ook om de vraag standaard te formuleren als: kunt u onderbouwen waarom u voor de betreffende diersoort(en) en de betreffende diermodel(len) heeft gekozen?

Vriendelijke groet,

5.1 lid2e

From: 5.1 lid2e

Sent: Tuesday, August 30, 2022 3:59 PM

To: 5.1 lid2e

Cc: 5.1 lid2e

Subject: schriftelijke ronde

Beste 5.1 lid2e ,

Vorige vergadering was er een aanvraag aangehouden die terug in vergadering moest. Dit was dossier 30 in de map van 12 augustus. De aanvrager was met verlof en kon pas gisteren de antwoorden indienen. Er is met 5.1 lid2e overleg geweest en gezien de aard van de vragen en de termijn wil ik jullie vragen of jullie toch over de mail toestemming kunnen geven voor vergunnen. De vragen gingen over gebruikte dieren en ongerief in de voorgaande vergunning en de onderbouwing van de diersoort.

De vragen en antwoorden van de aanvrager zijn als volgt:

Onduidelijkheden:

- De studie is een vervolg op een eerder door de CCD toegewezen project. Kunt u iets toelichten over hoeveel dieren er toen zijn gebruikt in hoeveel verschillende experimenten, wat het ongerief was en waar de resultaten toe geleid hebben (niet alleen in de zin van doorontwikkeling van nieuwe behandelstrategieën maar ook ten aanzien van verfijning van de modellen).

Antwoord:

In totaal zijn in het voorgaande project 5237 muizen gebruikt in een groot aantal studies, waarvan 5078 muizen matig en 159 muizen ernstig ongerief hebben ondervonden.

Dit is toegevoegd in het projectvoorstel (vraag 3.1, Wat is er al gedaan?).

Een retrospectieve evaluatie van het voorgaande project is momenteel in voorbereiding. Hierin zullen nadere details over de uitgevoerde studies volgen.

Een inschatting van benodigde aantallen dieren en verwacht ongerief op basis van retrospectieve beoordeling van de voorgaande vergunning is ons inziens niet realistisch. De gebruikte (combinaties van) middelen en hun te onderzoeken effectiviteit bepalen hoeveel muizen een klinisch beeld ontwikkelen en hoeveel muizen de humane eindpunten bereiken en dus kortdurend ernstig ongerief ondervinden. In het huidige project worden andere, effectievere en/of minder succesvolle (combinaties van) middelen gebruikt dan in het voorgaande project, waardoor een inschatting op basis van de voorgaande vergunning een over- of onderschatting kan geven.

Deze tekst staat vermeld in beide bijlagen (vraag F).

In de voorgaande vergunning hebben we veel verschillende experimenten gedaan voor 10 bestaande middelen als mono-behandeling, 4 combinaties van bestaande middelen, en voor 1 nieuw middel en verschillende analogen daarvan. Resultaten van enkele studies worden gebruikt als input voor klinische studies die gepland staan.

Naast deze wetenschappelijke en maatschappelijke resultaten zijn de gebruikte modellen in de afgelopen jaren ook verder verfijnd. Er is veel ervaring opgebouwd met de modellen en het infectieverloop na inoculatie van verschillende bacteriespecies en -stammen. Deze ervaring heeft ertoe geleid dat wij als onderzoekers steeds preciezer kunnen inschatten of en wanneer de humane eindpunten bereikt zullen worden binnen de duur van het experiment, waardoor de periode van ernstig ongerief zo kort mogelijk gehouden kan worden. Ook duurden alle studies maximaal 24 uur na start van de behandeling (26 uur na infectie); de halfwaardetijden van de middelen die we hebben onderzocht was niet zodanig lang dat langduriger experimenten (>24 uur na start behandeling) noodzakelijk waren. Hierdoor is de periode van ongerief zo kort mogelijk gehouden. De doseringsfrequentie van de gebruikte middelen is waar mogelijk gekozen op basis van literatuur en aannames op basis van gegevens van vergelijkbare middelen, waardoor zeer frequent doseren (elke 2 uur gedurende 24 uur) slechts in een beperkt aantal gevallen nodig is geweest.

- Verder is de commissie geïnteresseerd in uw motivering voor de gebruikte diersoort en diermodellen, hierbij rekening houdend met de translationele waarde van de modellen. Kunt u hiervoor nog verdere onderbouwing geven?

Antwoord:

Het dijspier- en het longmodel in de neutropene muis zijn modellen die worden aanbevolen in de richtlijnen van het European Medicines Agency (EMA) en zijn internationaal geaccepteerd voor het bepalen van de PK/PD index en de PD target, om doseringen in klinische studies te bepalen. Resultaten behaald in deze modellen worden door het EMA geaccepteerd in het dossier in voorbereiding op klinische studies. Het dijspiermodel is een veelgebruikt en zeer gestandaardiseerd model dat gebruikt wordt om infecties in de weke delen te simuleren. Het longmodel wordt ook veel toegepast, omdat de penetratie van middelen in de longen kan afwijken van die in het bloed, waardoor middelen bij longinfecties verminderd effectief kunnen zijn. Er worden neutropene muizen gebruikt om de pure interactie tussen de bacterie en het antibioticum te bepalen, zonder tussenkomst van het immuunsysteem. De modellen worden internationaal toegepast voor het bepalen van de PK/PD index en de PD target.

Voor de modellen is een directe correlatie tussen de PK/PD indexen in neutropene, geïnfecteerde muizen enerzijds en mensen anderzijds voor verschillende antibiotica **5.1 lid2h, 5.1 lid2e** wat de hoge translationele waarde van de modellen aangeeft.

Bovenstaande stond gedeeltelijk al vermeld in het projectvoorstel (vraag 3.1). De translationele waarde is extra benadrukt in beide bijlagen (vraag B, diersoort).

Naar aanleiding van de vragen heeft de DEC ook nog een reactie gegeven:

Geachte CCD,

Op 15 augustus jl. hebben wij van U een e-mail ontvangen met daarin aanvullende vragen die U aan de indiener heeft gesteld.

Wij kunnen ons niet aan de indruk onttrekken dat één van deze vragen mogelijk geïnitieerd is door een opmerking die wij in ons advies hadden opgenomen.

Onze opmerking had betrekking op de mogelijke positieve bijdrage aan de afweging van het in vervolgaanvragen vermelden van voor de afweging relevante opbrengsten en beschrijvingen van aantallen tot dan toe uitgevoerde experimenten en gebruikte aantallen dieren.

Nog afgezien van het feit dat wij voor dit betreffende project een afweging resulterend in een positief advies hebben kunnen maken was het een algemene opmerking die niet specifiek op dit project betrekking had.

Deze opmerking was vooral ingegeven door de situatie dat de CCD bezig is aan de herziening van een aantal handreikingen en het misschien te overwegen zou zijn een zinsnede van deze strekking daarin op te gaan nemen. Onze opmerking had, wanneer dit relevant zou kunnen zijn voor de afweging, betrekking op alle vervolgaanvragen. Wij hebben ons terdege gerealiseerd dat dit niet een verkapte manier zou moeten worden om in geval van projecten waarin sprake is van ernstig ongerief, zoals in het betreffende project, de termijnen voor de wettelijk voorgeschreven 'Beoordeling achteraf' te omzeilen of al een voorschot op dit beoordelingstraject te nemen.

Met vriendelijke groet,

5.1 lid2h

5.2 lid1

Met vriendelijke groeten,

5.1 lid2e

Medewerker behandelen en ontwikkelen
Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag
.....

T: 0800 7890789
E: info@zbo-ccd.nl

Van: info@zbo-ccd.nl
Verzonden: vrijdag 2 september 2022 16:30
Aan: 5.1 lid2h 5.1 lid2e
CC: 5.1 lid2e 5.1 lid2h
Onderwerp: Aanhouden AVD 5.1 lid2h 202215947

Geachte 5.1 lid2e,

Op 25-03-2022 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Nieuwe (combinatie)therapieën tegen infecties door multiresistente en moeilijk behandelbare bacteriën 2" met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202215947. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In dit bericht leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

Wij hebben de volgende informatie van u nodig om uw aanvraag verder te kunnen beoordelen:

Onduidelijkheden

Wij hebben maandag 29 augustus uw antwoorden in goede orde ontvangen. In uw antwoord op de eerste vraag stond een zin die onduidelijkheid schepte, namelijk: "In het huidige project worden andere, effectievere en/of minder succesvolle (combinaties van) middelen gebruikt dan in het voorgaande project, waardoor een inschatting op basis van de voorgaande vergunning een over- of onderschatting kan geven."

Dit geeft de indruk dat u therapieën gaat testen waarvan op voorhand bekend is dat deze minder succesvol zullen zijn. Kunt u hier een toelichting op geven?

Zonder deze aanvullende informatie kan de beslissing nadelig voor u uitvallen omdat de gegevens onvolledig of onduidelijk zijn.

Opsturen binnen veertien dagen

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van dit bericht op. U kunt dit aanleveren via NetFTP.

Wanneer een beslissing

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Mocht u vragen hebben, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

5.1 lid2e
www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag
.....

T: 0800 789 0789
E: info@zbo-ccd.nl

Van: 5.1 lid2e
Verzonden: donderdag 8 september 2022 20:07
Aan: Info-zbo; 5.1 lid2e
CC: 5.1 lid2e
Onderwerp: RE: schriftelijke ronde

Categorieën: Dossier: 5.1 lid2e

Beste allen,

De eerste zin van het antwoord is voor mij voldoende borging dat slechts middelen of combinaties van middelen, die potentieel effectief zijn, worden getest. In het derde tekstblok van het antwoord geeft men ook helder aan, dat men eerst middelen dan wel combinaties van middelen *in vitro* zal testen op potentiële werkzaamheid. Alleen de potentieel werkzame combinaties van middelen gaan door naar de *in vivo* fase.

Nog steeds is de tekst in het tweede blok erg verwarrend. Door de nadere uitleg is het geen belemmering om dit project te vergunnen.

Dank voor de inzet 5.1 lid2e de vergunning kan verleend worden.

Vriendelijke groet,

5.1 lid2e

From: 5.1 lid2e **On Behalf Of** Info-zbo
Sent: Wednesday, September 7, 2022 2:05 PM
To: 5.1 lid2e
Cc: 5.1 lid2e
Subject: RE: schriftelijke ronde

Beste 5.1 lid2e ,

In navolging op 5.1 lid2e reactie op de eerdere antwoorden van de aanvrager (zie mail hieronder) heb ik de onderzoekers gevraagd om opheldering. Hieronder de gestelde vraag en het antwoord van de onderzoekers:

Onduidelijkheden

Wij hebben maandag 29 augustus uw antwoorden in goede orde ontvangen. In uw antwoord op de eerste vraag stond een zin die onduidelijkheid schepte, namelijk: "In het huidige project worden andere, effectievere en/of minder succesvolle (combinaties van) middelen gebruikt dan in het voorgaande project, waardoor een inschatting op basis van de voorgaande vergunning een over- of onderschatting kan geven."

Dit geeft de indruk dat u therapieën gaat testen waarvan op voorhand bekend is dat deze minder succesvol zullen zijn. Kunt u hier een toelichting op geven?

Antwoord:

De hierboven genoemde indruk is onterecht, graag nemen wij ieder misverstand weg: wij zullen in het project juist die middelen en combinaties van middelen gaan testen waarvan op voorhand wordt ingeschat dat deze *in vivo* effectief kunnen zijn.

Deze zin was ter verduidelijking in de voorgaande brief gekopieerd vanuit vraag F (beide bijlagen): "Een inschatting op basis van retrospectieve beoordeling van de voorgaande vergunning is ons inziens niet realistisch. De gebruikte (combinaties van) middelen en hun te onderzoeken effectiviteit bepalen hoeveel muizen een klinisch beeld ontwikkelen en hoeveel muizen de humane eindpunten bereiken en dus kortdurend ernstig ongerief ondervinden. In het huidige

project worden andere, effectievere en/of minder succesvolle (combinaties van) middelen gebruikt dan in het voorgaande project, waardoor een inschatting op basis van de voorgaande vergunning een over- of onderschatting kan geven.”

Hiermee hebben wij aan willen geven dat, inherent aan de vraagstelling van het project, de effectiviteit van (combinaties van) middelen zal worden onderzocht, en dat het benodigde aantal dieren en verwacht ongerief afhangt van de mate van effectiviteit van de middelen.

Voordat gestart wordt met het testen van de effectiviteit van middelen *in vivo* (vanaf fase 2, zoals omschreven in de strategie 3.4.1 in het projectvoorstel) moet uit *in vitro* onderzoek blijken dat het middel of het middel gecombineerd met een antibioticum activiteit vertoont tegen de geselecteerde bacterie (entrée criterium 2). Dit geeft aan dat we aanwijzingen moeten hebben dat een middel succesvol zou kunnen zijn voordat de effectiviteit *in vivo* onderzocht wordt. Ten behoeve van de ethische toetsing moet rekening worden gehouden met de mogelijke uitkomsten van dergelijke studies, inclusief de impact op de dieren. Het project waar deze projectvergunningaanvraag op volgt laat zien dat de onderliggende aannames en inschattingen hieromtrent valide waren en zijn.

Hiermee hopen wij de zorgen van de CCD weggenomen te hebben.

5.1 lid2e kan je hiermee akkoord gaan?

5.1 lid2e je was vorige keer al akkoord dus ik neem aan dat dit nog steeds zo is. Ik neem je wel even mee in de communicatie.

Met vriendelijke groeten,

5.1 lid2e

Medewerker behandelen en ontwikkelen

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag

T: 0800 7890789

E: info@zbo-ccd.nl

Van: 5.1 lid2e

Verzonden: donderdag 1 september 2022 15:51

Aan: 5.1 lid2e

CC: 5.1 lid2e

Onderwerp: RE: schriftelijke ronde

Beste allen,

5.1 lid2e dank voor jouw reactie. Zo zie je maar dat zaken op een verschillende manier gelezen, dan wel geïnterpreteerd kunnen worden.

Jij geeft aan dat je het bezwaarlijk vindt om nu voor een derde maal een vraag te stellen, omdat we ook niet willen dat de DEC dat doet. Voor de DEC gaat dat inderdaad op, om te voorkomen dat men 'meeschrijft'.

Hier vindt ik het principieel anders liggen; wij geven een vergunning af, dan moet het volstrekt duidelijk zijn wat er vergunt wordt. Hier betreft het een onduidelijkheid, die mogelijk kan leiden tot onnodig inzet van dieren met ongerief als gevolg. Dus ik ben van mening dat er toch om een opheldering moet worden gevraagd.

Vriendelijke groet,

Tot morgen,

5.1 lid2e

From: 5.1 lid2e

Sent: Wednesday, August 31, 2022 9:50 AM

To: 5.1 lid2e

Cc: 5.1 lid2e

Subject: RE: schriftelijke ronde

Beste 5.1 lid2e,

Bedankt voor jullie snelle reactie. Ten aanzien van de punten van 5.1 lid2e

1) ik heb het kennelijk anders gelezen dan jij. De aanvrager geeft aan dat de aantallen van de vorige keer niet makkelijk als basis gebruikt kunnen worden voor de nieuwe aanvraag. Daarbij geeft aanvrager inderdaad aan dat middelen succesvoller of minder succesvol kunnen zijn. Ik heb hierin gelezen "wanneer middelen minder succesvol blijken wordt een no-go ingelast waardoor de vervolgstudies niet gedaan worden". Al staat dit er natuurlijk niet letterlijk.

In ieder geval zie ik er wel tegenop een 3^e keer vragen te stellen, wij zeggen ook altijd tegen de DEC's dat ze maximaal 2 vragenrondes mogen houden. Maar wanneer je dit noodzakelijk acht kan ik de vraag nog wel stellen.

2) Ik begrijp je punt, ik zal voortaan andere bewoording gebruiken bij het stellen van vragen.

Mocht je willen overleggen dan kan je me natuurlijk bellen, ik zit van 10.00-11.00 in overleg en van 14.30 tot 15.30 maar de rest van de dag ben ik denk ik redelijk bereikbaar.

Vriendelijke groeten,

5.1 lid2e

Medewerker behandelen en ontwikkelen

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag

T: 0800 7890789

E: info@zbo-ccd.nl

Van: 5.1 lid2e

Verzonden: dinsdag 30 augustus 2022 18:13

Aan: 5.1 lid2e

CC: 5.1 lid2e

Onderwerp: RE: schriftelijke ronde

Beste 5.1 lid2e

Mbt onderstaande vragen en antwoorden wil ik twee punten noemen:

- 1) De aanvrager stelt dat hij/zij 'en/of minder succesvolle (combinaties van) middelen' wil testen. Dit lijkt mij toch niet acceptabel. Eerst maar eens uitzoeken hoe het kan dat deze middelen minder succesvol zijn! Misschien bedoelt de aanvrager iets anders, maar dan dient dat opgehelderd te worden.
- 2) Het is niet bedoeling dat de CCD vragen stelt omdat zij 'geïnteresseerd' is in iets wetenschappelijks, de aanpak van een experiment oid (*verder is de commissie geïnteresseerd in uw motivering voor de gebruikte diersoort en diermodellen*), dat verwijt men ons wel en dan gaan wij ons boekje te buiten. Wij kunnen slechts vragen stellen, die voor ons wezenlijke informatie geven, zodat we de morele afweging kunnen maken tussen datgene wat er met x # dieren wordt gedaan en de mogelijke baten daarvan. Mijn advies is dan ook om de vraag standaard te formuleren als: kunt u onderbouwen waarom u voor de betreffende diersoort(en) en de betreffende diermodel(len) heeft gekozen?

Vriendelijke groet,

5.1 lid2e

From: 5.1 lid2e
Sent: Tuesday, August 30, 2022 3:59 PM
To: 5.1 lid2e
Cc: 5.1 lid2e
Subject: schriftelijke ronde

Beste 5.1 lid2e ,

Vorige vergadering was er een aanvraag aangehouden die terug in vergadering moest. Dit was dossier 30 in de map van 12 augustus. De aanvrager was met verlof en kon pas gisteren de antwoorden indienen. Er is met 5.1 lid2e overleg geweest en gezien de aard van de vragen en de termijn wil ik jullie vragen of jullie toch over de mail toestemming kunnen geven voor vergunnen. De vragen gingen over gebruikte dieren en ongerief in de voorgaande vergunning en de onderbouwing van de diersoort. De vragen en antwoorden van de aanvrager zijn als volgt:

Onduidelijkheden:

- De studie is een vervolg op een eerder door de CCD toegewezen project. Kunt u iets toelichten over hoeveel dieren er toen zijn gebruikt in hoeveel verschillende experimenten, wat het ongerief was en waar de resultaten toe geleid hebben (niet alleen in de zin van doorontwikkeling van nieuwe behandelstrategieën maar ook ten aanzien van verfijning van de modellen).

Antwoord:

In totaal zijn in het voorgaande project 5237 muizen gebruikt in een groot aantal studies, waarvan 5078 muizen matig en 159 muizen ernstig ongerief hebben ondervonden.

Dit is toegevoegd in het projectvoorstel (vraag 3.1, Wat is er al gedaan?).

Een retrospectieve evaluatie van het voorgaande project is momenteel in voorbereiding. Hierin zullen nadere details over de uitgevoerde studies volgen.

Een inschatting van benodigde aantallen dieren en verwacht ongerief op basis van retrospectieve beoordeling van de voorgaande vergunning is ons inziens niet realistisch. De gebruikte (combinaties van) middelen en hun te onderzoeken effectiviteit bepalen hoeveel muizen een klinisch beeld ontwikkelen en hoeveel muizen de humane eindpunten bereiken en dus kortdurend ernstig ongerief ondervinden. In het huidige project worden andere, effectievere en/of minder succesvolle (combinaties van) middelen gebruikt dan in het voorgaande project, waardoor een inschatting op basis van de voorgaande vergunning een over- of onderschatting kan geven. Deze tekst staat vermeld in beide bijlagen (vraag F).

In de voorgaande vergunning hebben we veel verschillende experimenten gedaan voor 10 bestaande middelen als mono-behandeling, 4 combinaties van bestaande middelen, en voor 1 nieuw middel en verschillende analogen daarvan. Resultaten van enkele studies worden gebruikt als input voor klinische studies die gepland staan.

Naast deze wetenschappelijke en maatschappelijke resultaten zijn de gebruikte modellen in de afgelopen jaren ook verder verfijnd. Er is veel ervaring opgebouwd met de modellen en het infectieverloop na inoculatie van verschillende bacteriespecies en -stammen. Deze ervaring heeft ertoe geleid dat wij als onderzoekers steeds preciezer kunnen inschatten of en wanneer de humane eindpunten bereikt zullen worden binnen de duur van het experiment, waardoor de periode van ernstig ongerief zo kort mogelijk gehouden kan worden. Ook duurden alle studies maximaal 24 uur na start van de behandeling (26 uur na infectie); de halfwaardetijden van de middelen die we hebben onderzocht was niet zodanig lang dat langduriger experimenten (>24 uur na start behandeling) noodzakelijk waren. Hierdoor is de periode van ongerief zo kort mogelijk gehouden. De doseringsfrequentie van de gebruikte middelen is waar mogelijk gekozen op basis van literatuur en aannames op basis van gegevens van vergelijkbare middelen, waardoor zeer frequent doseren (elke 2 uur gedurende 24 uur) slechts in een beperkt aantal gevallen nodig is geweest.

- Verder is de commissie geïnteresseerd in uw motivering voor de gebruikte diersoort en diermodellen, hierbij rekening houdend met de translationele waarde van de modellen. Kunt u hiervoor nog verdere onderbouwing geven?

Antwoord:

Het dijspier- en het longmodel in de neutropene muis zijn modellen die worden aanbevolen in de richtlijnen van het European Medicines Agency (EMA) en zijn internationaal geaccepteerd voor het bepalen van de PK/PD index en de PD target, om doseringen in klinische studies te bepalen. Resultaten behaald in deze modellen worden door het EMA geaccepteerd in het dossier in voorbereiding op klinische studies. Het dijspiermodel is een veelgebruikt en zeer gestandaardiseerd model dat gebruikt wordt om infecties in de weke delen te simuleren. Het longmodel wordt ook veel toegepast, omdat de penetratie van middelen in de longen kan afwijken van die in het bloed, waardoor middelen bij longinfecties verminderd effectief kunnen zijn. Er worden neutropene muizen gebruikt om de pure interactie tussen de bacterie en het antibioticum te bepalen, zonder tussenkomst van het immuunsysteem. De modellen worden internationaal toegepast voor het bepalen van de PK/PD index en de PD target.

Voor de modellen is een directe correlatie tussen de PK/PD indexen in neutropene, geïnfecteerde muizen enerzijds en mensen anderzijds voor verschillende antibiotica **5.1 lid2h, 5.1 lid2e** wat de hoge translationele waarde van de modellen aangeeft.

Bovenstaande stond gedeeltelijk al vermeld in het projectvoorstel (vraag 3.1). De translationele waarde is extra benadrukt in beide bijlagen (vraag B, diersoort).

Naar aanleiding van de vragen heeft de DEC ook nog een reactie gegeven:

Geachte CCD,

Op 15 augustus jl. hebben wij van U een e-mail ontvangen met daarin aanvullende vragen die U aan de indiener heeft gesteld.

Wij kunnen ons niet aan de indruk onttrekken dat één van deze vragen mogelijk geïnitieerd is door een opmerking die wij in ons advies hadden opgenomen.

Onze opmerking had betrekking op de mogelijke positieve bijdrage aan de afweging van het in vervolgaanvragen vermelden van voor de afweging relevante opbrengsten en beschrijvingen van aantallen tot dan toe uitgevoerde experimenten en gebruikte aantallen dieren.

Nog afgezien van het feit dat wij voor dit betreffende project een afweging resulterend in een positief advies hebben kunnen maken was het een algemene opmerking die niet specifiek op dit project betrekking had.

Deze opmerking was vooral ingegeven door de situatie dat de CCD bezig is aan de herziening van een aantal handreikingen en het misschien te overwegen zou zijn een zinsnede van deze strekking daarin op te gaan nemen. Onze opmerking had, wanneer dit relevant zou kunnen zijn voor de afweging, betrekking op alle vervolgaanvragen. Wij hebben ons terdege gerealiseerd dat dit niet een verkapte manier zou moeten worden om in geval van projecten waarin sprake is van ernstig ongerief, zoals in het betreffende project, de termijnen voor de wettelijk voorgeschreven 'Beoordeling achteraf' te omzeilen of al een voorschot op dit beoordelingstraject te nemen.

Met vriendelijke groet,

5.1 lid2h

5.2 lid1

Met vriendelijke groeten,

5.1 lid2e

Medewerker behandelen en ontwikkelen
Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag

.....
T: 0800 7890789
E: info@zbo-ccd.nl



Advies aan CCD

Datum 09 september 2022
 Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD202215947

Instelling: 5.1 lid2h
 Onderzoeker: 5.1 lid2e
 Project: Nieuwe (combinatie)therapieën tegen infecties door multiresistente en moeilijk behandelbare bacteriën 2
 Aanvraagnummer: AVD202215947
 Betreft: Nieuwe aanvraag
 Categorieën: Translationeel of toegepast onderzoek

1 Inzicht in aanvraag en de eventuele knelpunten en risico's

Proces	De volgende vragen zijn gesteld aan de aanvrager: - U gebruikt in de NTS nog moeilijke termen en voor leken onbekende afkortingen als "intraperitoneaal", "cyclofosfamide", "in-vitro", "IvD". Kunt u de tekst nog een keer doorlopen en beter afstemmen op een algemeen publiek? - Ook de titel is voor een algemeen publiek onduidelijk, kunt u deze aanpassen? Hierbij is het ook niet duidelijk waarom er een 2 achter staat.			
Naam proef	Diersoort	Stam	Aantal dieren	Herkomst
3.4.3.1. Dijspiermodel				
	Muizen (Mus musculus)		9.010	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn
3.4.3.2. Longmodel				
	Muizen (Mus musculus)		9.010	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn

Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

3.4.3.1. Dijspiermodel

Muizen (*Mus musculus*)

Citaat: Standaardisatie van het model is belangrijk om resultaten onderling te kunnen vergelijken. Er is meestal een directe correlatie tussen de PK/PD indexen in vrouwelijke proefdieren en mensen (vrouw én man) voor verschillende antibiotica. Wanneer studies worden uitgevoerd bij vrouwelijke muizen hoeven de resultaten daarom niet ook nog eens bij mannelijke muizen bevestigd te worden. Het gaat immers primair om de concentratie-effect relatie. (Nota bene, de doseringen om die concentraties te bereiken kunnen wel verschillend zijn tussen man en vrouw). In het in de literatuur beschreven dijspiermodel wordt gebruik gemaakt van vrouwelijke muizen. Door in dit project ook vrouwelijke muizen te gebruiken kunnen resultaten vergeleken worden met eerder verkregen resultaten (literatuur en eigen data). Door voor de bepaling van het PK profiel alleen vrouwelijke dieren te gebruiken wordt een zeer gestandaardiseerd PK profiel bepaald met weinig variatie. Alleen bij een PK profiel met weinig variatie is het mogelijk de groepsgroottes in de proeven voor bepaling van de exposure-respons relatief klein te houden. Daarnaast zijn mannelijke muizen vanwege hun agressievere gedrag moeilijker in groepen te huisvesten.

3.4.3.2. Longmodel

Muizen (*Mus musculus*)

Zie 3.4.3.1.

Locatie uitvoering experimenten	<ul style="list-style-type: none">- Alle proeven vinden plaats in een instelling van een vergunninghouder.- Er zijn geen problemen bekend met de vergunninghouder.
--	---

2 DEC advies

DEC-advies	<p>Citaten uit het DEC advies:</p> <p>C11 (ongerief): De indieners hebben duidelijk gemaakt dat het voor het behalen van de doelstellingen in een aantal gevallen het bereiken van een situatie met ernstig ongerief onvermijdelijk is. De humane eindpunten zijn zodanig geformuleerd dat deze situatie nooit langer dan 8 uur zal duren.</p> <p>Bij het aanpassen van de beide bestaande modellen zal maximaal 50% van de 540 dieren worden geconfronteerd met een humaan eindpunt resulterend in ernstig ongerief.</p> <p>Op basis van de resultaten uit het voorafgaande onderzoek is de verwachting dat in de PK experimenten (in elk model 10 monobehandelingen en 5 combinatie-behandelingen) 33% van de dieren</p>
-------------------	--

(3920) zal uitvallen. Hiervan zal 5% (196 dieren) geconfronteerd worden met ernstig ongerief. Voor alle overige dieren is sprake van matig ongerief.

Voor de exposure-respons experimenten is op basis van de ervaringen met dit type experimenten in het verleden de inschatting dat ongeveer de helft van de studies zal worden uitgevoerd met stammen die een gematigd klinisch beeld geven (muizen ondervinden maximaal matig ongerief). De andere helft van de experimenten zal uitgevoerd worden met stammen die in de placebo-behandelde en in de laag-gedoseerde muizen een ernstig klinisch beeld geven. De verwachting is dat in beide modellen 15% van de dieren (totaal 1952 dieren) geconfronteerd zal worden met ernstig ongerief.

Voor de overige dieren is sprake van matig ongerief.

Het ongerief is gegeven de inherente onzekerheid rond de uiteindelijk te gebruiken bacteriestammen en de te testen middelen herleidbaar ingeschat en geclassificeerd. Omdat de wetenschappelijke eindpunten alleen bereikt kunnen worden wanneer de dieren het volledige doseringsschema kunnen afmaken is de kans op ernstig ongerief bij dieren waarbij de testmiddelen niet werken of die een controle middel krijgen onvermijdelijk.

C13 (humane eindpunten): Er wordt voor het toepassen van de humane eindpunten een scoringsysteem toegepast. Dit is specifiek toegespitst op de in dit project voorgestelde type experimenten. Tijdens de experimenten worden de dieren dagelijks met behulp van dit scoringsysteem gemonitord.

De indieners hebben aangegeven dat om wetenschappelijke conclusies te kunnen trekken het noodzakelijk is dat per studie een groep dieren een hoge bacteriële load krijgt, om een effectieve (bacteriedodende) dosering van een middel te kunnen bepalen. Alleen op deze manier kunnen de dosering en de PK/PD index die nodig is voor bacteriostasis (geen bacteriegroei) en voor afdoding van de bacteriën bepaald worden. In deze groep dieren met een hoge bacteriële load kan dit leiden tot een ernstige klinische infectie resulterend in ernstig ongerief.

De duur van dit ernstig ongerief wordt beperkt door het humane eindpunt 'maximaal 8 uur ernstig ongerief'. Op basis van deze strategie/criteria valt voor de betreffende dieren het wetenschappelijke eindpunt dus samen met het humane eindpunt. Aangegeven is dat deze periode met ernstig ongerief noodzakelijk is om wetenschappelijke conclusies te kunnen trekken uit dit onderzoek.

C18 (geslachten): De experimenten worden uitgevoerd in vrouwelijke dieren. Hierdoor wordt een zeer gestandaardiseerd PK profiel bepaald met weinig variatie. Alleen dan is het mogelijk de groeps groottes in de

proeven voor bepaling van de exposure-respons relatief klein te houden. Er is meestal een directe correlatie tussen de PK/PD indexen in vrouwelijke proefdieren en mensen (vrouw én man) voor verschillende antibiotica.

In het in de literatuur beschreven dijspiermodel wordt ook gebruik gemaakt van vrouwelijke muizen. Door in dit project ook vrouwelijke muizen te gebruiken kunnen resultaten vergeleken worden met eerder verkregen resultaten (literatuur en eigen data).

Om de microbiële status van de dieren in alle experimenten constant te houden worden alle dieren betrokken van een geregistreerd fok en toeleveringsbedrijf. Er ontstaan door de keuze voor vrouwelijke dieren lokaal dan ook geen fokoverschotten.

De commissie acht de keuzes voor het exclusief gebruik van vrouwelijke dieren voldoende onderbouwd.

Ethische afweging van de DEC:

1) Rechtvaardigt het belang van de op basis van gestandaardiseerde PK/PD informatie in twee modellen verzamelde kennis over doseringen en toedieningswijzen van 10 middelen als mono-behandeling en 5 combinaties van middelen in mensen, de aantasting van het welzijn en de integriteit van maximaal 18020 muizen (80% matig en 20% ernstig ongerief)?

2) Het welzijn van de aangevraagde 18020 muizen wordt matig (voor 80% van de dieren) of ernstig (voor 20% van de dieren) aangetast. Het ongerief wordt bepaald door de ziekteverschijnselen na de bacteriële besmettingen. Bij de dieren met een hoge bacteriële load kan dit leiden tot een ernstige klinische infectie resulterend in ernstig ongerief. Dit is noodzakelijk voor het behalen van de beoogde doelen.

Dieren worden gedood voor analyse als onderdeel van de dierproef. De integriteit wordt aangetast door het instrumentele gebruik als proefdier, het ziek maken in het kader van de proef, de huisvesting in een proefdierfaciliteit en het doden aan het eind van de proef. Het belang van de proefdieren om gevrijwaard te blijven van deze aantasting van hun welzijn en integriteit, is groot.

Voor de maatschappij is het belang van de beschikbaarheid van optimale behandelingsstrategieën voor bestaande of nieuwe antibiotica of combinatiepreparaten die beschermen tegen nieuwe (resistente) bacterievarianten groot. Hiermee kunnen ziekte, sterfte en economische en maatschappelijke schade worden voorkomen.

Voor de aanvrager is er sprake van een klinisch, een toegepast wetenschappelijk en een economische belang. Het project sluit aan bij de missie van de instelling, het bevorderen van gezondheid bij de mens. Een economisch belang (bijvoorbeeld het verkrijgen van onderzoeksgelden) is

vanuit ethisch gezichtspunt niet bezwaarlijk en staat bij deze studies ook niet voorop. De aanvrager zal het in dit geval vooral van belang achten te handelen in overeenstemming met de missie van de instelling.

De resultaten uit het onderzoek (een onderbouwd doseringsvoorstel voor de behandeling van een bepaalde bacteriële infectie met nieuwe of bestaande antibiotica) zullen als dossier aan de EMA worden aangeboden in voorbereiding op klinische studies naast de gebruikelijke wetenschappelijke communicatie via publicaties in wetenschappelijke tijdschriften en met de partners in dit onderzoek.

Voor de farmaceutische industrie kunnen de resultaten mogelijk helpen bij de ontwikkeling en het op de markt brengen van nieuwe antibioticaproducten om de resistentie tegen bestaande antibiotica te omzeilen. Dit dient tevens een maatschappelijk belang.

3) De DEC is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager, van het belang van de doelstelling van het project: het ontwikkelen van onderbouwde toedieningsprotocollen voor bestaande en nieuw ontwikkelde antibiotica.

De project levert mede door de kwaliteit en positie van de aanvrager een directe bijdrage aan de kliniek, de maatschappij, de wetenschap en uiteindelijk mogelijk de industrie.

Met inzicht in de optimale toedieningsprocedures en eventuele resistentie tegen bestaande en nieuwe antibiotica kan uiteindelijk de maatschappij beter beschermd worden en kan de industrie met een grotere kans meer gerichtere (en dus effectievere) antibiotica (of combinatiepreparaten) produceren.

De commissie is van mening dat het belang van de doelstellingen voor met name de kliniek en de samenleving, voldoende zwaar wegen om het schaden van de belangen van de proefdieren in de vorm van de evidente aantasting van hun integriteit en aantasting van het welzijn te rechtvaardigen.

De DEC is van mening dat het project goed is opgezet en dat binnen de looptijd van het project de gekozen strategie en de experimentele aanpak kunnen leiden tot betrouwbare uitkomsten.

De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er voor de voorgestelde dierproeven geen geschikte vervangingsalternatieven zijn, dat het doel niet met minder dieren behaald kan worden, dat de gebruikte aanpak de meest verfijnde is en dat voorkomen wordt dat mens, dier en milieu onbedoelde negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven.

De DEC is van oordeel dat het belang van de doelstellingen de aantasting van de integriteit en de onvermijdelijke nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren, rechtvaardigt.

De DEC heeft extern advies ingewonnen bij

- de aanvrager is om aanvullingen gevraagd

De DEC heeft de aanvrager vragen gesteld over:

- Onderbouwing beschrijving en aantallen dieren met ernstig ongerief
- Overwegingen (bijv. medisch, wetenschappelijk, beschikbaarheid nieuw middel?) om nieuw middel te gaan testen.
- Wanneer noodzaak om EMA richtlijnen te volgen
- Onderbouwing aantallen te testen componenten
- Nadere beschrijving doelstelling (bepalentoepassing/concentraties in klinische trials)
- Beschrijving van de belangen die in het geding zijn (eigen afdeling, samenwerkende partners)
- Testen van combi preparaten
- Onderbouwing gebruik neutropene muizen
- Beschrijving go/nogo in de strategie
- Beschrijving onderbouwing van de strategie
- Onderbouwing infectie van beide dijbeenspieren in zelfde muis
- Nadere toelichting breekpuntbepalingen
- Onderbouwing experimentele parameters en aantallen dieren in verschillende fases van experimentele strategie (maximum scenario)
- Ernstige pijn (humaan eindpunt, toepassing van pijnstilling?)
- Nadere toelichting/onderbouwing scoringsschema (ongerief consequenties, humane eindpunten)
- Beschrijving en onderbouwing van de aantallen dieren met risico op ernstig ongerief en de beschrijving en onderbouwing van de humane eindpunten die hierbij gehanteerd worden.
- Tekstuele aanpassingen
- NTS: vervangen 'euthanasie' en 'hoger ongerief' (hoger dan ernstig kan niet)

Citaat DEC: Het heeft de commissie een aantal besprekronde gekost om op alle vragen die in de eerste ronde al waren gesteld duidelijke antwoorden te krijgen. Speciaal de onderbouwing van de noodzaak van het doormaken van ernstig ongerief bij een substantieel aantal dieren heeft een aantal besprekronde gekost. Vooral omdat dit een belangrijk aspect in de afweging is geweest.

Alle antwoorden zijn verwerkt in de aanvraag.

Het DEC advies is Verlenen onder voorwaarden

	<p>Het uitgebrachte advies is niet gebaseerd op consensus. Citaat: Het uitgebrachte advies is gebaseerd op een meerderheidsstandpunt. Het minderheidsstandpunt had niet betrekking op het belang van het onderzoek, maar richtte zich op de belangen en waarden van de in dit project opgevoerde dieren waarvan een aanzienlijk deel geconfronteerd wordt met een risico op ernstig ongerief.</p> <p>De volgende dilemma's zijn gesignaleerd door de DEC: Citaat: De DEC ervaart het als een bezwaar dat op het moment van de beoordeling van een vervolgproject als dit het voorgaande project nog niet afgesloten is en er dus ook nog geen rapportage voor een beoordeling achteraf beschikbaar is. Deze kan nu dus niet betrokken worden in de afweging van het vervolgproject. Verder zijn er geen knelpunten of dilemma's geconstateerd - zowel binnen als buiten de context van het project - die de verantwoordelijkheid en competentie van de DEC overstijgen.</p>
--	--

3 Kwaliteit DEC advies

Kwaliteit DEC-advies	
	<p>Het DEC advies is helder en volledig. Er is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die zijn gesteld. Bij de beantwoording van de C vragen gebruikt u een heldere onderbouwing. De ethische afweging volgt op een logische manier uit de antwoorden op de C vragen.</p> <p>Met de weergaven van het minderheidsstandpunt en het aangekaarte dilemma geeft u op een heldere manier inzicht in de discussies die binnen de DEC zijn gevoerd bij de bespreking van deze aanvraag.</p> <p>De CCD is het eens met uw oordeel bij C18 dat het gebruik van alleen vrouwtjes voldoende beargumenteerd is. De opmerking dat er lokaal geen fokoverschotten ontstaan door het gebruik van vrouwtjes is voor de afweging verder niet relevant, aangezien er bij de leverancier waarschijnlijk wel fokoverschotten ontstaan doordat mogelijk niet voor alle mannetjes een evengrote vraag is op dat moment.</p> <p>In uw ethische afweging spreekt u van 20% ernstig ongerief terwijl in de NTS en de bijlagen 15% wordt vermeld. De CCD gaat ervan uit dat dit een verschrijving is en de ethische afweging niet anders uitvalt wanneer er wordt uitgegaan van 15% ernstig ongerief.</p>

4 Inhoudelijke beoordeling

<p>Doelstelling Doelstelling</p>	<p>Citaat: De doelen van dit project zijn:</p> <p>A. Het aanpassen van het bestaande dijspier- en longmodel voor nog niet eerder door onze onderzoeksgroep gebruikte klinisch relevante bacteriestammen. Voor een aantal species waarmee onze onderzoeksgroep veel ervaring heeft, zoals <i>Escherichia coli</i> en <i>Klebsiella pneumoniae</i>, is bekend dat een standaard inoculum leidt tot een reproduceerbare infectie. Voor een aantal andere species, zoals <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en <i>Acinetobacter baumannii</i>, is bekend dat het geschikte inoculum voor een reproduceerbare infectie wel sterk afhankelijk is van de stam waarmee men infecteert. Voor dit soort stammen is een voorafgaande inoculum-finding studie belangrijk.</p> <p>B. Het bestuderen van de exposure-response relatie (PK/PD) van (combinaties van) middelen (bestaande en/of nieuwe en/of non-antibiotica) bij multiresistente en moeilijk behandelbare bacteriële infecties om inzicht te verkrijgen in de vraag welke dosering, in welke frequentie en via welke route en hoe lang toegediend moet worden. Deze informatie kan worden gebruikt voor het opzetten van klinische trials.</p> <p>Het uiteindelijke doel is: Inzicht in de exposure-response relaties van deze (combinaties van) middelen zal uiteindelijk leiden tot verbetering en optimalisering van de behandeling van multiresistente en moeilijk behandelbare bacteriële infecties.</p> <p>(...)</p>
---	--

Wetenschappelijk en maatschappelijk belang	<p>Citaat: Sociale relevantie</p> <p>Door de wereldwijd toenemende mate van resistentie van bacteriën is behandeling van patiënten met infecties veroorzaakt door deze multiresistente bacteriën niet altijd meer goed mogelijk, met soms zelfs overlijden tot gevolg. Vanwege deze problematiek wordt er gezocht naar wegen om enerzijds behandeling van dergelijke multiresistente en moeilijk behandelbare infecties toch mogelijk te maken en om anderzijds resistentievorming te voorkomen of te omzeilen. Door het bestuderen van de exposure-respons relatie van (combinaties van) middelen in het in vivo dijspier- en/of longinfectiemodel kan het beste doseringsschema van (combinaties van) middelen voor latere klinische studies in patiënten met multiresistente en moeilijk behandelbare infecties bepaald worden. Zo hopen wij de behandeling van infecties door multiresistente en moeilijk behandelbare bacteriën te kunnen verbeteren en te optimaliseren.</p> <p>Wetenschappelijke relevantie</p> <p>Er zijn wel methoden ontwikkeld om de PK/PD relaties van antimicrobiële middelen te bestuderen, maar methoden om het in vivo effect van non-antibiotica en combinaties te bepalen zijn niet beschikbaar. In dit project worden deze methoden ontwikkeld en verder geoptimaliseerd. Door studies uit te voeren in zowel het dijspier- als het longmodel kunnen we bovendien de doseringsschema's bij verschillende soorten infecties onderzoeken. Door het ontwikkelen van computermodellen op basis van de resultaten van de experimenten wordt getracht het effect van de (combinaties van) middelen steeds beter te kunnen voorspellen.</p>
Onderbouwing wetenschappelijk en maatschappelijk belang	Het belang is voldoende uitgewerkt en onderbouwd.
<p>Wetenschappelijke kwaliteit</p> <p>Kwaliteit aanvrager/ onderzoeksgroep en onderzoek</p>	<p>Citaat C7 van het DEC advies: De kennis en kunde van de aanvrager en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd. De aanvrager, een ervaren onderzoeksorganisatie, beschikt over uitgebreide ervaring met dit soort studies en over de daarvoor benodigde voorzieningen. De commissie is ervan overtuigd dat de ervaring en expertise bij de aanvrager ertoe zullen leiden dat de directe doelstellingen en de einddoelstelling haalbaar zijn, dat er zorgvuldig met de dieren gewerkt zal worden en dat er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden.</p> <p>Het Secretariaat heeft geen aanleiding te twijfelen aan de kwaliteit van de aanvragers of het onderzoek.</p>

3V's

Vervanging	
	<p>3.4.3.1. Dijspiermodel: Citaat: Voordat middelen in dieren getest worden, zijn ze reeds in vitro getest. Alleen de (combinaties van) middelen met potentie om in vivo werkzaam te kunnen zijn, zullen in dieren onderzocht worden.</p> <p>Op basis van de data die wordt verkregen uit het in vivo en het in vitro onderzoek kan de stap naar klinische studies worden gemaakt, omdat de exposure-respons relaties in dit model goed overeenkomen met de verwachte respons bij patiënten. Ook voor het opstellen of herzien van de productinformatie van middelen is deze data nodig. De European Medicines Agency (EMA) heeft het voornemen om de productinformatie van bestaande antibiotica de komende jaren te herzien onder andere aan de hand van informatie gegenereerd in diermodellen die relevant zijn voor de latere indicatie. Voor colistine is dit inmiddels gebeurd. Vervangen van deze dierproeven is daarom niet mogelijk.</p>
	<p>3.4.3.2. Longmodel: Zie 3.4.3.1.</p>
Verminderen	
	<p>3.4.3.1. Dijspiermodel: Citaat: Door de gestandaardiseerde opzet van de proeven kunnen de resultaten verkregen voor een middel (of combinatie) goed vergeleken worden met die voor een ander middel (of combinatie), verkregen in dit project, eerdere projecten, of beschreven in de literatuur. Ook is door de gekozen gestandaardiseerde opzet slechts een beperkt aantal onbehandelde controledieren nodig.</p> <p>Voor het bepalen van een standaard exposure-respons curve wordt het minimale aantal dieren gebruikt waarvan verwacht mag worden dat daarmee het effect kan worden beschreven, zonder de noodzaak tot veelvuldig herhalen van de proef. Dit laatste zou bovendien extra controledieren vragen.</p> <p>Door het hanteren van heldere GO/NO GO-criteria worden middelen die al in een vroeg stadium van het onderzoek blijken geen potentie te hebben om in vivo werkzaam te zijn niet verder onderzocht en wordt onnodig proefdiergebruik voorkomen. Experimentele middelen worden vaak voor 1 bacteriespecies ontwikkeld. Bij screening op vroege bacteriedodende activiteit (fase 2) worden dan niet meteen 4 bacteriestammen gebruikt voor infectie, maar eerst 1 stam. Als het middel dan geen activiteit vertoont, is dit een NO GO. Deze experimenten worden met kleine groepen (n=2) uitgevoerd, dit is voldoende om eventueel aanwezige vroege bacteriedodende activiteit te zien.</p> <p>Alle andere experimenten worden uitgevoerd met minimaal 2 en maximaal 3 muizen per groep. Het definitieve aantal dieren per groep wordt bepaald aan de hand van de te verwachten inter-individuele variatie. Bij kleine inter-individuele variatie kan volstaan worden met 2</p>

muizen per groep; bij grotere variatie (ondanks de standaardisatie van het model) zijn 3 muizen per groep noodzakelijk. Wanneer 2 muizen per groep nodig zijn, dan zijn uiteraard ook in totaal per middel of per combinatie minder dieren nodig; de berekeningen zijn gemaakt op basis van 3 dieren per groep.

Wanneer voor concentratie-bepaling van middelen kan volstaan met een kleine hoeveelheid plasma, dan wordt ook tijdens het experiment bloed afgenomen bij de muizen. Dit leidt tot een reductie van het aantal sectie-momenten, en dus tot reductie van het benodigd aantal proefdieren.

In geval van nieuwe antibiotica is een comparator-antibioticum nodig als controle om het effect van het nieuwe antibioticum mee te vergelijken. De noodzaak voor deze controlegroep is er bij bestaande antibiotica niet altijd. Daarom kan deze groep in voorkomende gevallen vervallen, wat leidt tot een vermindering van het benodigd aantal dieren.

In een aantal gevallen kunnen 2 verschillende bacteriestammen per muis gebruikt worden, 1 stam per dijspier. Dit gaat op voor stammen waarvan bekend is dat beide infecties geen invloed hebben op elkaars beloop. Alleen in die gevallen kan het benodigd aantal muizen gehalveerd worden, omdat per muis 2 bacteriestammen worden gebruikt.

In geval het niet mogelijk is 2 verschillende bacteriestammen per muis te gebruiken, worden ook beide dijspieren geïnfecteerd, met dezelfde bacteriestam. Dit levert dan een duplo binnen een dier op, maar omdat de blootstelling aan het middel hetzelfde is in beide dijspieren (er wordt immers één muis behandeld), is dit geen onafhankelijke duplo. Dit levert daarmee geen vermindering van het aantal benodigde proefdieren op. Er wordt niet voor gekozen om in dit geval slechts 1 dijspier te infecteren. Een duplo binnen het dier levert – ondanks dat het geen onafhankelijke duplo is – meer informatie op uit 1 dier: het gemiddelde van de bacteriële load in de twee dijspieren kan gebruikt worden (in plaats van de load in een dijspier), wat de betrouwbaarheid van de data verhoogd.

Deze extra informatie weegt ons inziens op tegen het beperkte extra ongerief dat een muis ondervindt ten gevolge van infectie in beide dijspieren ten opzichte van infectie in een dijspier. Bij infectie met sommige bacteriestammen is sprake van ontsteking van de achterpoot of -poten, waardoor de muizen deze niet meer goed gebruiken. Ze lopen wel, maar gebruiken daarvoor de voorpoten. Dieren worden dan direct geëuthanaseerd (vraag E) waardoor dit niet leidt tot meer ongerief dan wanneer één dijspier geïnfecteerd zou zijn en minder bruikbaar zou zijn. Bij infectie met andere stammen is de klinische infectie beperkt en lopen en klimmen en bewegen de muizen – ook met twee geïnfecteerde dijspieren – normaal. Hiermee is het ongerief door infectie van een of twee dijspieren beperkt en vergelijkbaar. Door het in acht nemen van de humane eindpunten is ons inziens het ongerief na infectie van beide

	<p>dijspieren versus infectie van één dijspier slechts kortdurend hoger bij gebruik van stammen die resulteren in ontstoken achterpoten, en gelijk bij gebruik van stammen die beperkte klinische infectie geven.</p> <p>De proefopzet van de proeven wordt voorgelegd aan de IvD. Hierbij wordt het aantal dieren gedetailleerd verantwoord.</p> <p>Door het gebruik van computermodellen voor bepaling van het PK profiel en de exposure-respons relatie, zijn – op basis van jarenlange eigen ervaring en gepubliceerde literatuur – minimaal 2 dieren en maximaal 3 dieren per groep voldoende om met voldoende power de parameters te bepalen. (De uiteindelijke groeps grootte hangt af van de verwachte inter-individuele variatie.) Vermindering van deze aantallen of vermindering van het aantal datapunten zou leiden tot onvoldoende power.</p>
	<p>3.4.3.2. Longmodel: Zie 3.4.3.1. met extra voor deze bijlage: In geval van nieuwe antibiotica is een comparator-antibioticum nodig als controle om het effect van het nieuwe antibioticum mee te vergelijken.</p> <p>De noodzaak voor deze controlegroep is er bij bestaande antibiotica niet altijd. Daarom kan deze groep in voorkomende gevallen vervallen, wat leidt tot een vermindering van het benodigd aantal dieren.</p>
Verfijnen	
	<p>3.4.3.1. Dijspiermodel: Citaat: Voor de in vivo doseringen wordt rekening gehouden met hetgeen bekend is over toxiciteit en/of tolerantie van de middelen, de minimaal toxische dosis of de maximaal getolereerde dosis is de hoogste dosis die in vivo wordt getest voor het bepalen van exposure-response relaties.</p> <p>De geïntroduceerde infectie zal bij de hogere doseringen niet leiden tot een uitgebreide infectie.</p> <p>Dosering van cyclofosfamide via de intraperitoneale route is zo geoptimaliseerd dat ziekte door neutropenie zo minimaal mogelijk is.</p> <p>De ernst van de welzijnsaantasting wordt verder zoveel mogelijk beperkt door het in acht nemen van de humane eindpunten.</p> <p>Door dieren in groepen te huisvesten met gepaste kooiverrijking wordt de proef verder verfijnd.</p> <p>Zo veel als mogelijk is zal het werken met bacteriestammen die ernstig ongerief kunnen veroorzaken vermeden worden. Echter, soms is dit niet mogelijk vanwege de klinische relevantie van deze stammen.</p> <p>In geval het niet mogelijk is 2 verschillende bacteriestammen per muis te gebruiken, worden ook beide dijspieren geïnfecteerd, met dezelfde bacteriestam. Dit levert dan een duplo binnen een dier op. Er wordt niet gekozen voor het gebruik van extra dieren die dan ieder individueel minder ongerief hebben, door slechts 1 dijspier te infecteren. Een duplo binnen het dier levert meer datapunten op, die waardevolle informatie oplevert.</p>

	<p>Proeven waarin het PK profiel wordt bepaald zijn slechts van relatief korte duur, waardoor de ziekte nog niet veel progressie heeft gemaakt.</p> <p>Voor nieuwe antibiotica, non-antibiotica en voor sommige oude antibiotica geldt dat onbekend is bij welk doseringsschema ze antibacterieel effectief zijn. Doseringsschema's die niet effectief blijken te zijn, zullen relatief meer ongerief kunnen veroorzaken dan succesvolle schema's. Omdat dit de vraagstelling van het onderzoek is, kan in de keuze van middelen en doseringsschema's, die gemaakt worden op basis van literatuur en verwachtingen, geen verdere verfijning plaatsvinden.</p> <p>Alles wordt in het werk gesteld om de periode van ernstig ongerief zo kort mogelijk te houden, zoals beschreven in vraag E (humane eindpunten).</p> <p>Ongerief wordt zo veel mogelijk geminimaliseerd door gebruik van adequate analgetica.</p> <p>Hoewel we ons realiseren dat een doseringsschema met relatief korte intervallen tussen de dosering ongerief veroorzaakt, is er momenteel geen alternatief. Het gebruik van automatische pompjes (zoals ALZET pompjes) is niet mogelijk vanwege de instabiliteit van de meeste middelen. Daarnaast is dit voor combinaties van middelen – waarbij de doseringsfrequentie van het ene middel wel en het andere middel niet wordt gevarieerd – niet mogelijk. Middelen worden indien mogelijk wel gemengd in de spuit, zodat per dosismoment maar een keer toegediend hoeft te worden.</p>
	3.4.3.2. Longmodel: Zie 3.4.3.1.

Hergebruik	Er is geen sprake van hergebruik van dieren.
-------------------	--

Naam proef	Worden de dieren gedood?	Doden volgens richtlijn?
3.4.3.1. Dijspiermodel	Ja	volgens de richtlijn.
3.4.3.2. Longmodel	Ja	volgens de richtlijn.

Naam proef		
3.4.3.1. Dijspiermodel	HEP: 50% in de fase 1 proeven, 5-15% in de andere proeven. Gemiddeld 15% over alle dieren.	Citaat: Dieren worden na infectie gemonitord, ten minste bij elke handeling, en indien nodig (wanneer de score zoals hieronder omschreven 5 of hoger is) wordt de frequentie verhoogd. De dieren worden gescoord met 0, 1 of 2 op de volgende criteria: criterium

		<p>Gewichtsverlies Normaal 0 - 5% 1 -10% 2</p> <p>Temperatuurdaling Normaal 0 <35.5°C 1 <34°C 2</p> <p>Uitdroging Niet aanwezig 0 Lichte uitdroging 1 Ernstige uitdroging 2</p> <p>Donkere ogen Niet aanwezig 0 Enigszins aanwezig 1 Zeer donkere ogen 2</p> <p>Opstaande vacht Niet aanwezig 0 Enigszins aanwezig 1 Zeer aanwezig 2</p> <p>Deze scores worden per dag bij elkaar opgeteld. Per criterium wordt de hoogst gegeven score meegenomen in de optelsom. Voorbeeld: Een muis scoort op dag 1 één punt op 'gewichtsverlies'. Op dag 2 scoort dezelfde muis nul punten op dit criterium. In de optelsom op dag 2 zal dan toch één punt worden meegenomen. Als deze totale score hoger dan 7 is, dan wordt het dier zonder uitstel geëuthanaseerd en bemonsterd. Wanneer een score van 7 (waarbij dus nog niet voldaan is aan 'hoger dan 7' voor euthanasie) meer dan 24 uur aanhoudt, wordt dit niet ook geaccepteerd, en wordt het dier uit proef gehaald.</p> <p>Naast bovenstaand scoresysteem zijn er ook een aantal 'direct-uit-proef'-criteria:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Gewichtsverlies groter dan 20% t.o.v. het startgewicht • Gewichtsverlies groter dan 15% binnen 24 uur
--	--	---

		<ul style="list-style-type: none"> • Rectale temperatuur lager dan 33°C • Lethargie of hyperactiviteit door disseminatie van infectie naar de hersenen • Tollen (bij infectie van de hersenen) • Wanneer dieren de achterpoten niet meer goed gebruiken en voortbewegen met alleen de voorpoten
Muizen (Mus musculus)	Ongerief: 15,0% Ernstig 85,0% Matig	
3.4.3.2. Longmodel	HEP: 50% in de fase 1 proeven, 5-15% in de andere proeven. Gemiddeld 15% over alle dieren.	Zie 3.4.3.1. Additioneel citaat: Benauwdheid zou in een longmodel een logisch criterium zijn om op te nemen. Echter, in onze ervaring uit benauwdheid in dit model zich niet zodanig dat dit zichtbaar is: muizen happen niet naar adem, er is geen afwijkende ademhaling en ook geen cyanose. Daarom is dit criterium niet in de lijst opgenomen.
Muizen (Mus musculus)	Ongerief: 15,0% Ernstig 85,0% Matig	

5 Samenvatting

5.2 lid1

Het aangevraagde project is een vervolg op **5.1 lid2h**. In dit project zijn verschillende bestaande middelen en combinaties van bestaande middelen onderzocht, waarvan de analyse nog loopt. Er is ook 1 nieuw middel onderzocht, waarvan de input gebruikt zal gaan worden voor geplande klinische studies.

Voor het onderzoek zullen uitsluitend vrouwtjes worden gebruikt om zo min mogelijk variatie te krijgen in de resultaten en omdat vrouwtjes minder agressief zijn en makkelijker sociaal te huisvesten. De DEC vindt dit voldoende onderbouwd. **5.2 lid1**

Naar schatting zal 15% van de dieren ernstig ongerief ervaren gedurende maximaal 8 uur. **5.2 lid1**

. Vanwege het cumulatief ernstige ongerief in het projectvoorstel, wordt een voorwaarde in de vorm van een beoordeling achteraf aan de vergunning verbonden.

6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning

5.2 lid1



Beoordeling achteraf

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk mei 2028 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

De ingangsdatum van de vergunning kan niet voor de verzenddatum van de beschikking zijn en zal indien van toepassing aangepast worden. Dit is ook het geval bij een voorgenomen besluit.

7 Concept beschikking voor akkoord CCD

Naam van het project	Nieuwe therapiën in de behandeling van infecties veroorzaakt door moeilijk te behandelen bacteriën.
NTS-identificatiecode	NTS-NL-066023 v.1
Nationale identificatiecode van de NTS <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	NTS202215947
Land	Nederland
Taal	nl
Indiening bij EU <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	ja
Duur van het project, uitgedrukt in maanden.	60
Trefwoorden	bacterie infectie resistentie antibioticum optimale dosering
Doel(en) van het project	Omzettinggericht en toegepast onderzoek: Besmettelijke ziekten van de mens

DOELSTELLINGEN EN VERWACHTE VOORDELEN VAN HET PROJECT

<p>Beschrijf de doelstellingen van het project (bijvoorbeeld het aanpakken van bepaalde wetenschappelijke onduidelijkheden, of wetenschappelijke of klinische behoeften).</p>	<p>Wereldwijd neemt het aantal infecties veroorzaakt door moeilijk behandelbare bacteriën (multiresistente bacteriën) toe. Optimale behandeling van deze patiënten met antibiotica is daardoor vaak niet meer mogelijk, met soms zelfs overlijden tot gevolg. Er moet daarom gezocht worden naar alternatieve behandelingen. Van oude antibiotica is vaak maar weinig bekend over de meest optimale dosering, met name over de frequentie en wijze van toediening en over de indicaties (infecties) waarbij het middel gebruikt kan worden. Daarnaast is van een aantal niet-antibiotica ook beschreven dat zij werkzaam zijn tegen bacteriële infecties, maar die werkzaamheid is vaak niet uitgebreid onderzocht. Ook zijn er niet-antibiotica die ontwikkeling van resistentie kunnen remmen. Door deze middelen met antibiotica te combineren, kunnen antibiotica die anders onwerkzaam zouden zijn, toch wel bruikbaar blijven. Daarom onderzoeken we in dit project of oude antibiotica, niet-antibiotica en ook nieuwe antibiotica, en combinaties hiervan, werkzaam zijn in de behandeling van infecties veroorzaakt door moeilijk behandelbare bacteriën. Hiermee komt informatie beschikbaar over de blootstelling aan deze middelen in muizen en over hun effectiviteit. Met deze informatie kunnen de mogelijk succesvolle (combinaties van) middelen in klinische studies worden onderzocht.</p> <p>Om nieuwe behandelingen te ontwikkelen, zijn modellen voor bacteriële infecties nodig. Hiervoor worden in het laboratorium test-omstandigheden nagebootst waarmee een eerste screening van middelen op mogelijke effectiviteit kan worden onderzocht. Daarna worden, in dit project, 10 potente middelen en 5 combinaties in twee veelgebruikte muismodellen onderzocht. De resultaten worden vervolgens vertaald naar optimale doseringen van deze middelen bij de mens.</p>
<p>Welke potentiële voordelen kan dit project opleveren? Leg uit hoe de wetenschap vooruit kan worden geholpen of mensen, dieren of het milieu uiteindelijk voordeel kunnen hebben bij het project. Maak, waar van toepassing, een onderscheid tussen voordelen op korte termijn (binnen de looptijd van het project) en voordelen op</p>	<p>In dit project zullen de beschreven proefdiermodellen van weefsel- en longinfectie aangepast worden, zodat de effectiviteit van middelen tegen een aantal klinisch relevante bacteriestammen kan worden onderzocht. We verwachten dat er 3 (combinaties van) middelen succesvol zullen zijn in onze dierproeven. Deze potentieel succesvolle (combinaties van) middelen kunnen vervolgens onderzocht worden in klinische studies. Op basis van de resultaten van deze dierproeven kunnen de meest optimale doseringsschema's (hoeveel en hoe vaak doseren) bepaald worden. Deze doseringsschema's kunnen dan later in studies in patiënten gebruikt worden. Hiermee kunnen antibiotica mogelijk beter gedoseerd worden, waardoor de huidige antibiotica behouden kunnen blijven, met betere effectiviteit, minder ontstaan van resistentie, en minder toxiciteit.</p>

lange termijn (die mogelijk pas worden bereikt nadat het project is afgerond).

VOORSPELDE SCHADE

<p>In welke procedures worden de dieren gewoonlijk gebruikt (bijvoorbeeld injecties, chirurgische procedures)? Vermeld het aantal en de duur van deze procedures.</p>	<p>Er wordt gewerkt met muizen met verminderde afweer. Hiervoor worden de muizen voorafgaand aan de infectie twee keer in de buikholte geïnjecteerd met een afweeronderdrukkend middel. De dieren zullen geïnfecteerd worden met bacteriën, via de neus voor longinfectie of in de dijbeenspier voor weefselinfectie. Tijdens de infectie worden de dieren behandeld met antibiotica, niet-antibiotica of combinaties daarvan. Aan het eind van het experiment worden de relevante organen uitgenomen om de aantallen bacteriën te bepalen of wordt bloed en longspoeling afgenomen om concentraties van de middelen te bepalen. Longinfectie en het doden vinden plaats onder narcose. Alle dieren ontvangen pijnstilling.</p>																
<p>Wat zijn de verwachte gevolgen/nadelige effecten voor de dieren, bijvoorbeeld pijn, gewichtsverlies, inactiviteit/verminderde mobiliteit, stress, abnormaal gedrag, en wat is de duur van die effecten?</p>	<p>Het is noodzaak de dieren te infecteren met bacteriën om de meest geschikte doseringsschema's van middelen in behandeling van infecties te kunnen onderzoeken. Dit kan ongerief met zich meebrengen wanneer een middel of combinatie van middelen niet effectief blijkt tegen de bacterie waarmee het dier geïnfecteerd is.</p> <p>Bij proeven waarin concentraties van middelen gemeten worden is er een risico op koorts of ondertemperatuur. De kans op het ontwikkelen van een infectie in de bloedbaan en andere organen is klein, omdat de kortdurende proeven over het algemeen beëindigd zijn voordat de infectie kans heeft gehad zich op een dergelijke wijze te ontwikkelen.</p> <p>Bij proeven waarin gekeken wordt naar de samenhang tussen de blootstelling aan middelen en effectiviteit van de middelen kunnen de dieren een infectie in de bloedbaan en organen ontwikkelen, waarbij de ernst van de infectie afhangt van de effectiviteit van de middelen die getest worden. Dieren kunnen hierdoor koorts of ondertemperatuur krijgen, gewicht verliezen, meer/minder actief worden en minder alert worden. Naast de gevolgen van de infectie zal het welzijn van de dieren worden beïnvloed door eventuele bijwerkingen van toediening van middelen die de werking van het immuunsysteem remmen, de toediening van bacteriën en het (herhaaldelijk) toedienen van de te testen middelen.</p>																
<p>Welke soorten en aantallen dieren zullen naar verwachting worden gebruikt? Wat zijn de verwachte ernstgraden en de aantallen dieren in elke ernstcategorie (per soort)?</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Soort:</th> <th rowspan="2">Totaal aantal</th> <th colspan="4">Geraamde aantallen naar ernstgraad</th> </tr> <tr> <th>Terminaal</th> <th>Licht</th> <th>Matig</th> <th>Ernstig</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Muizen (<i>Mus musculus</i>)</td> <td>18020</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>15332</td> <td>2688</td> </tr> </tbody> </table>	Soort:	Totaal aantal	Geraamde aantallen naar ernstgraad				Terminaal	Licht	Matig	Ernstig	Muizen (<i>Mus musculus</i>)	18020	0	0	15332	2688
Soort:	Totaal aantal			Geraamde aantallen naar ernstgraad													
		Terminaal	Licht	Matig	Ernstig												
Muizen (<i>Mus musculus</i>)	18020	0	0	15332	2688												
<p>Wat gebeurt er met de dieren die aan het einde van de procedure in leven worden gehouden?</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Soort:</th> <th colspan="3">Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren</th> </tr> <tr> <th>Hergebruikt</th> <th>Teruggeplaatst</th> <th>Geadopteerd</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Soort:	Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren			Hergebruikt	Teruggeplaatst	Geadopteerd									
Soort:	Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren																
	Hergebruikt	Teruggeplaatst	Geadopteerd														
<p>Geef de redenen voor het geplande lot van de dieren na de procedure.</p>	<p>Aan het eind van de proef worden de dieren op humane wijze gedood, teneinde bloed en weefsels voor verdere wetenschappelijke analyse te kunnen verkrijgen. Het doden van de dieren aan het eind van de proef is ook noodzakelijk vanwege biologische veiligheidsvoorschriften (werk met multiresistente en moeilijk behandelbare bacteriën).</p>																

TOEPASSING VAN DE DRIE V'S

<p>1. Vervanging Beschrijf welke diervrije alternatieven op dit gebied voorhanden zijn en waarom zij niet voor het project kunnen worden gebruikt.</p>	<p>Voordat gestart wordt met dierproeven worden middelen altijd uitgebreid getest, onder in het laboratorium nagebootste omstandigheden middels reageerbuis-achtige systemen. Alleen wanneer middelen in deze experimenten potentie laten zien zullen ze in dierproeven onderzocht worden. Een diermodel is essentieel vanwege de complexe interacties tussen middelen, bacteriën en het immuunsysteem in het menselijk lichaam. Deze reageerbuis-achtige laboratoriummodellen/technieken kunnen deze interacties niet reproduceren en niet goed de optimale manier van toedienen van de middelen voorspellen.</p>
<p>2. Vermindering Leg uit hoe de aantallen dieren voor dit project zijn bepaald. Beschrijf de stappen die zijn genomen om het aantal te gebruiken dieren te verminderen en de beginselen die zijn gebruikt bij het opzetten van de studies. Beschrijf, waar van toepassing, de praktijken die gedurende het hele project zullen worden toegepast om het aantal dieren die in overeenstemming met de wetenschappelijke doelstellingen werden gebruikt, tot een minimum te beperken. Deze praktijken kunnen bijvoorbeeld bestaan uit proefprojecten, computermodellen, het delen van weefsel en hergebruik.</p>	<p>Voorafgaand aan een studie wordt de proefopzet met de benodigde groepsgroottes voorgelegd aan de Instantie voor Dierenwelzijn. Door gebruik te maken van gestandaardiseerde dieren (vrij van specifieke ziekteverwekkers) en van bepaalde leeftijd, gewicht en geslacht wordt de benodigde groepsgrootte verder beperkt. De te bestuderen middelen zullen eerst in detail worden bestudeerd in het laboratorium middels reageerbuis-achtige modellen/technieken. Alleen (combinaties van) middelen die potentie hebben om in dieren werkzaam te kunnen zijn, worden in de muismodellen bestudeerd. Wanneer in een vroege fase van het dieronderzoek blijkt dat een middel geen gewenst concentratieverloop heeft of dat het niet effectief is, dan valt het middel al in een vroege fase af en worden er geen verdere dierexperimenten uitgevoerd. Door de gestandaardiseerde opzet van de proeven kunnen resultaten van verschillende studies onderling goed vergeleken worden waardoor onnodig gebruik van dieren wordt voorkomen.</p>
<p>3. Verfijning Geef voorbeelden van de specifieke maatregelen (bv. verscherpte monitoring, postoperatieve behandeling, pijnbestrijding, training van dieren) die in verband met de procedures moeten worden genomen om de welzijnskosten (schade) voor de dieren tot een minimum te beperken. Beschrijf de mechanismen om gedurende de looptijd van het project nieuwe verfijningstechnieken in gebruik te nemen.</p>	<p>De modellen van weefsel- en longinfectie in de muis worden wereldwijd gebruikt. Van het model van weefselinfectie is aangetoond dat de resultaten verkregen in dit model goed overeenkomen met de verwachte respons bij patiënten.</p> <p>Met de standaard opzet van de experimenten voor optimalisatie van doseringsschema's van middelen is ruime ervaring binnen de onderzoeksgroep.</p> <p>De dierproeven worden uitgevoerd door deskundig personeel. De infectie van de longen en het uiteindelijke doden vinden plaats onder narcose om het ongerief zo veel mogelijk te beperken. Verder wordt pijnstilling toegepast om het ongerief zo veel mogelijk te minimaliseren. De dierproeven waarbij concentraties van de middelen worden bepaald worden relatief kort gehouden, waardoor de infectie zich nog niet ver kan ontwikkelen en het ongerief zo laag mogelijk wordt gehouden. Bovendien wordt het verloop van de infectie van de dieren nauwgezet gevolgd, zodat de dieren bij ernstige ziekteverschijnselen op basis van humane eindpuntcriteria vroegtijdig uit de proef kunnen worden genomen.</p>
<p>Licht de keuze van de soorten en de bijbehorende levensstadia toe</p>	<p>In de in de literatuur omschreven modellen van weefsel- en longinfectie zijn opgezet in jongvolwassen muizen. Om resultaten uit dit project te kunnen vergelijken met resultaten die eerder in deze modellen verkregen zijn, is het belangrijk dezelfde diersoort en levensstadia te gebruiken. Bovendien is aangetoond dat de resultaten verkregen in het weefselinfectiemodel (met jongvolwassen muizen) goed overeenkomen met de verwachte respons bij patiënten.</p>

VOOR EEN BEOORDELING ACHTERAF GESELECTEERD PROJECT

Project geselecteerd voor BA?	ja
Termijn voor BA	31-08-2028
Reden voor de beoordeling achteraf	
Bevat ernstige procedures	ja
Maakt gebruik van niet-menselijke primaten	
Andere reden	
Toelichting van de andere reden voor de beoordeling achteraf	

AANVULLENDE VELDEN

Nationaal veld 1 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 2 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 3 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 4 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 5 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Startdatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Einddatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Goedkeuringsdatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 1 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 2 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 3 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Link naar de eerdere versie van de NTS buiten het EC-systeem	

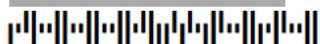


> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

5.1 lid2h

5.1 lid2e

5.1 lid2h



**Centrale Commissie
Dierproeven**
Postbus 93118
2509 AC Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0800 789 0789
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD 5.1 lid2h 202215947
Bijlagen
3

Datum 9 september 2022

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 5.1 lid2e,

Op 25 maart 2022 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Nieuwe (combinatie)therapieën tegen infecties door multiresistente en moeilijk behandelbare bacteriën 2" met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202215947. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed. Uit artikel 10a, eerste lid van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) volgt daarom dat het is toegestaan om uw project uit te voeren binnen de gestelde vergunningsperiode. Deze vergunning wordt afgegeven voor de periode van 9 september 2022 tot en met 31 mei 2027.

Aan de vergunning hebben wij de volgende voorwaarde verbonden op grond van artikel 10a1, tweede lid van de wet.

Beoordeling achteraf

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk mei 2028 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

De onderbouwing van deze beslissing vindt u onder 'Overwegingen'.

Procedure

Datum:

9 september 2022

Aanvraagnummer:

AVD 5.1 lid2h 202215947

Advies dierexperimentencommissie

Wij hebben advies gevraagd bij de 5.1 lid2h hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 4 augustus 2022. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

Nadere vragen aanvrager

Op 5 augustus 2022, 15 augustus 2022 en 2 september 2022 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft tijdig antwoord gegeven. Het verzoek om aanvullingen had betrekking op onderbouwing keuze diersoort, aangeven van aantal dieren en resultaten eerdere vergunning en aanpassen van de niet-technische samenvatting voor een algemeen publiek. Uw reactie is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

Overwegingen

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de DEC, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

Beoordeling achteraf

Na afloop van het project moet er een beoordeling plaatsvinden zoals bedoeld in artikel 10a1, eerste lid, onder d en artikel 10a1, derde lid van de wet. De reden van deze beoordeling achteraf is dat in dit project dieren ernstig ongerief ondergaan. Deze beoordeling zal uiterlijk mei 2028 plaatsvinden. Meer informatie over de eisen die gesteld worden bij de beoordeling achteraf vindt u in de bijlage 'Weergave wet- en regelgeving'.

Bezwaar

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen. Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 93118, 2509 AC Den Haag.

Bij het indienen van een bezwaarschrift vragen we u in ieder geval de datum van de beslissing waartegen u bezwaar maakt en het aanvraagnummer te vermelden. U vindt deze nummers in de rechter kantlijn in deze brief.

Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. Nadat u een bezwaarschrift heeft ingediend kunt u een voorlopige voorziening vragen bij de voorzieningenrechter van de rechtbank in de vestigingsplaats van de vergunninghouder. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een

spoedeisende situatie.

Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op

<http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de vergunninghouder valt.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl, stuur een e-mail naar info@zbo-ccd.nl of neem telefonisch contact met ons op: 0800 789 0789.

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

i.o.

5.1 lid2h

drs. F. Braunstahl
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

- Projectvergunning
- DEC-advies
- Weergave wet- en regelgeving

Datum:

9 september 2022

Aanvraagnummer:

AVD **5.1 lid2h** 202215947



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam:

Adres:

Postcode en plaats:

Deelnemersnummer:

5.1 lid2h

deze projectvergunning voor het tijdvak 9 september 2022 tot en met 31 mei 2027, voor het project "Nieuwe (combinatie)therapieën tegen infecties door multiresistente en moeilijk behandelbare bacteriën 2" met aanvraagnummer AVD **5.1 lid2h** 202215947, na advies van **5.1 lid2h**. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is **5.1 lid2e**. Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 25 maart 2022
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 29 augustus 2022;
 - b Bijlagen dierproeven
 - 3.4.3.1. Dijspiermodel, zoals ontvangen op 29 augustus 2022;
 - 3.4.3.2. Longmodel, zoals ontvangen op 29 augustus 2022;
 - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 10 augustus 2022;
 - d Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 4 augustus 2022
 - e De aanvullingen op uw aanvraag, zoals ontvangen op 10 augustus 2022, 29 augustus 2022, 7 september 2022.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief
3.4.3.1. Dijspiermodel			
	Muizen (Mus musculus)	9.010	15,0% Ernstig 85,0% Matig
3.4.3.2. Longmodel			
	Muizen (Mus musculus)	9.010	15,0% Ernstig 85,0% Matig

Voorwaarden

Beoordeling achteraf

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk mei 2028 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

Aanvraagnummer: AVD^{5.1 lid2h} 202215947

Geldende voorschriften

Wij wijzen u op onderstaande geldende voorschriften, die volgen uit artikel 1d, vierde lid, artikel 10, eerste lid en/of artikel 10a3 van de wet.

- Go/ no go momenten worden voor aanvang van elk experiment afgestemd met de IvD.
- Het is verboden een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is.
- Het is verboden dierproeven te verrichten voor een doel waarvan het belang niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend.
- Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.



Aanvraagnummer:

AVD^{5.1 lid2n} 202215947

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

Volgens artikel 10c van de Wet op de Dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g, derde lid van de wet. Uit artikel 10b, eerste lid van de wet volgt dat de dierproeven zijn ingedeeld in de categorieën terminaal, licht, matig of ernstig. Als er wijzigingen in een dierproef plaatsvinden, moeten deze gemeld worden aan de Centrale Commissie Dierproeven. Hebben de wijzigingen negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn, dan moet volgens artikel 10a5, eerste lid van de wet de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven. Artikel 10b, tweede en derde lid van de wet schrijven voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister een ontheffing is verleend.

Verzorging

De fokker, leverancier en gebruiker moeten volgens artikel 13f van de wet over voldoende personeel beschikken en ervoor zorgen dat de dieren behoorlijk worden verzorgd, behandeld en gehuisvest. Er moeten ook personen zijn die toezicht houden op het welzijn en de verzorging van de dieren in de inrichting, personeel dat met de dieren omgaat moet toegang hebben tot informatie over de in de inrichting gehuisveste soorten en personeel moet voldoende geschoold en bekwaam zijn. Ook moeten er personen zijn die een eind kunnen maken aan onnodige pijn, lijden, angst of blijvende schade die tijdens een dierproef bij een dier wordt veroorzaakt. Daarnaast zijn er personen die zorgen dat een project volgens deze vergunning wordt uitgevoerd en als dat niet mogelijk is zorgen dat er passende maatregelen worden getroffen.

In artikel 9 van de wet staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn. In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.

Voordat een dierproef die onderdeel uitmaakt van dit project start, moet volgens artikel 10a3 van de wet de uitvoering afgestemd worden met de instantie voor dierenwelzijn.

Pijnbestrijding en verdoving

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdoving wordt uitgevoerd tenzij dat niet mogelijk is, dan wel bij het verrichten van een dierproef worden pijnstillers toegediend of andere goede methoden gebruikt die de pijn, het lijden, de angst of de blijvende schade bij het dier tot een minimum beperken. Een dierproef die bij het dier gepaard gaat met zwaar letsel dat hevige pijn kan veroorzaken, wordt niet zonder verdoving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdoving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdoving onverenigbaar is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd

Aanvraagnummer:AVD 5.1 lid2f 202215947

voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

Einde van een dierproef

Artikel 13a van de wet bepaalt dat een dierproef is afgelopen wanneer voor die dierproef geen verdere waarnemingen hoeven te worden verricht of, voor wat betreft nieuwe genetisch gemodificeerde dierenlijnen, wanneer bij de nakomelingen niet evenveel of meer, pijn, lijden, angst, of blijvende schade wordt waargenomen of verwacht dan bij het inbrengen van een naald. Er wordt dan door een dierenarts of een andere ter zake deskundige beslist of het dier in leven zal worden gehouden. Een dier wordt gedood als aannemelijk is dat het een matige of ernstige vorm van pijn, lijden, angst of blijven schade zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.

Volgens artikel 13b van de wet moet de dood als eindpunt van een dierproef zoveel mogelijk worden vermeden en vervangen door in een vroege fase vaststelbare, humane eindpunten. Als de dood als eindpunt onvermijdelijk is, moeten er zo weinig mogelijk dieren sterven en het lijden zo veel mogelijk beperkt blijven.

Uit artikel 13c van de wet volgt dat het doden van dieren door een deskundig persoon moet worden gedaan, wat zo min mogelijk pijn, lijden en angst met zich meebrengt. De methode om te doden is vastgesteld in de Europese richtlijn artikel 6.

In artikel 13d van de wet is vastgesteld dat proefdieren geadopteerd kunnen worden, teruggeplaatst in hun habitat of in een geschikt dierhouderijsysteem, als de gezondheidstoestand van het dier het toelaat, er geen gevaar is voor volksgezondheid, diergezondheid of milieu en er passende maatregelen zijn genomen om het welzijn van het dier te waarborgen.

Beoordeling achteraf

Volgens artikel 10a1, eerste lid onder d en derde lid van de wet worden projecten waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt, projecten die als ernstig ingedeelde dierproeven omvatten of een dierproef die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, achteraf beoordeeld.