

Betreft AVD █████ 202115697 "Brain and Blood PK assessment of VNAR antibody-based blood brain barrier shuttle"

Geachte leden van de CCD, geachte █████

Op 11 maart en op 21 maart hebben wij enkele vragen ontvangen met betrekking tot onze projectaanvraag AVD █████ 2021156971.

Bijgevoegd vindt u puntsgewijs onze antwoorden op deze vragen.

### **VRAGEN 11 Maart**

#### **Niet technische samenvatting**

*- De titel bevat de afkorting PK. Dit is voor het algemeen publiek echter geen navolgbare afkorting. Kunt u deze afkorting daarom vervangen door meer gangbare bewoordingen?*

**De titel is aangepast en is nu: "Bepaling van het verloop van de concentratie van nieuw ontwikkelde transport eiwitten voor passage door de bloed-hersens barrière in hersenen en bloed"**

*- De NTS bevat op verschillende plaatsen nog typefouten. Wij verzoeken u om deze er nog uit te halen.*

#### **Onze excuses, dit is gecontroleerd en gecorrigeerd**

*- Kunt u onder 'Verwachte nadelige effecten' ook het doden van de dieren benoemen?*

#### **Dit is opgenomen**

*- Onder verwachte nadelige effecten noemt u het inspuiten van antistoffen. Kunt u dit ook benoemen onder 'Procedures' en voor het algemeen publiek toelichten wat antistoffen zijn en waarom de dieren deze krijgen toegediend?*

**We begrijpen dat dit onduidelijk kan zijn. Daarom is de term "antistoffen" vervangen door "eiwitten" waardoor het duidelijker aansluit bij de eerdere beschrijving.**

*- Wij verzoeken u om in de sectie 'Voorspelde schade' uitgebreider toe te lichten waarom het doden van dieren noodzakelijk is voor uw onderzoek en welke inzichten dit oplevert. tevens verzoeken wij u om onder 'Verfijning' toe te lichten waarom dit de meest verfijnde methode is om uw onderzoeksvraag te beantwoorden.*

**Onder "Voorspelde schade" is een extra stukje opgenomen: ".....zullen enkele dieren gedood worden om het verloop van de concentratie van de eiwitten in de hersenen (en dus de bloed-hersensbarrière gepasseerd zijn) te bepalen. Andere methoden, zoals microdialyse, kunnen hiervoor niet toegepast worden in apen".**

**Onder Verfijning is nu opgenomen: "Het bepalen van concentraties van de te onderzoeken eiwitten in de hersenen is technisch lastig. Dit kan niet met beeldvormende technieken en de in knaagdieren soms gebruikte microdialyse techniek is zeer belastend en praktisch gezien niet mogelijk in apen. Voor het bepalen van de concentratie en verdeling in de hersenen van de onderzochte eiwitten worden de dieren daarom gedood. Dit is voor de dieren de minst belastende methode."**

- De laatste zin onder 'Vermindering' is enigszins verwarrend. kunt u hieraan toevoegen dat het werkelijke aantal dieren dat uiteindelijk zal worden ingezet ingezet dus mogelijk lager kan komen te liggen?

**Dit is gedaan. Opgenomen: De aangevraagde aantallen zijn maximale aantallen voor het geval alle stappen uitgevoerd moeten worden. Het werkelijk aantal ingezette dieren dat wordt ingezet ligt daarom mogelijk lager.**

- Kunt u onder 'Verfijning' toelichten wat er bedoeld wordt met 'niet-voedsel materiaal'? En kunt u verder toelichten wanneer wanneer het nodig is om in te grijpen en wat er dan met het dier/de dieren zal gebeuren?

**Het niet-voedsel materiaal is speelgoedverrijking etc.,. Dit is nu opgenomen in de tekst: niet-voedsel verrijking (zoals kong toys, spiegels, ballen etc.).**

**Ook is nu opgenomen: "De ingreep hangt af van de situatie en wordt gedaan in overleg met de dierenartsen en de gedragspecialist".**

- Onder 'Soortkeuze' en 'Vermindering' Gaat u in op de verschillen in de bloed-hersen barrière tussen mensen en kleine knaagdieren. Er zijn echter naast apen ook andere dieren die fysiek meer op de mens lijken dan knaagdieren. Wij verzoeken u daarom de keuze van uw diermodel uitgebreider te onderbouwen.

**Een uitgebreidere onderbouwing is gegeven.**

- Wij kunnen ons voorstellen dat de gemiddelde Nederlander niet weet dat Java apen onder het geslacht 'Macaca' vallen. Wij verzoeken u daarom om onder verfijning de naam Makaken te vervangen door Java- apen.

**Dit is gedaan**

De herziene NTS is bijgevoegd (aparte file).

#### **Onduidelijkheden**

- U geeft aan 3 doseringen (1.35, 6.75 and 13.5mg/kg) te willen testen in de bloed PK studie van bijlage 3.4.3.1. Deze zijn gebaseerd op bevindingen onder AVD5020020185885. Uit uw aanvraag blijkt echter niet waarom specifiek voor deze 3 doseringen is gekozen. Kunt u de rationale achter deze doseringen verder toelichten en hierbij ook ingaan op de noodzaak om de (laagste) dosering uit AVD5020020185885 in het huidige project te repliceren?

**Er worden maximaal 3 doseringen gebruikt waarbij we uitgaan van de initieel geteste dosis van 1,35 mg. De andere 2 doses zijn gebaseerd op een 5-voudige en 10-voudige verhoging van de oorspronkelijke waarde, waarbij we eerst de 10-voudige gaan testen. Dit zijn gebruikelijke verhogingen zijn bij dit type PK studies. De laagste dosering uit de eerdere studie is alleen gebruikt om te onderzoeken of deze stof de bloed-brein barrière passeerde en hier is in tegenstelling tot de huidige aanvraag geen PK studie mee uitgevoerd.**

- Kunt u toelichten wat de rationale is achter de beoogde frequentie en timing van de bloedafnames in bijlage 3.4.3.1? uit de projectaanvraag is niet geheel navolgbaar waarom voor deze specifieke tijdpunten is gekozen.

**Ik weet niet wat bedoeld wordt met Bijlage 3.4.2.1. Ik ga er van uit dat hier Appendix 1, A wordt bedoeld. De frequentie van bloedafname is gebaseerd op het te verwachten verloop van de stoffen in**

het bloed van deze dieren op grond van theoretische aannames, waarbij we een snelle eerste toename verwachten met een plateau (concentratie tussen 1 uur t/m/ 1 dag) gevolgd door een geleidelijke afname (dag 3 t/m 14). Voor het bepalen van een goed PK profiel worden meerdere tijdpunten genomen in de vroege fase gevolgd door een kleiner aantal punten daarna om de afname te onderzoeken. Met de voorgestelde tijdpunten hebben we het gehele verloop van de concentratie van de stoffen in het bloed in beeld.

- De Wod stelt dat niet-menselijke primaten niet in dierproeven gebruikt mogen worden, tenzij door middel van een wetenschappelijke motivering wordt aangetoond dat het doel van de dierproef niet kan worden bereikt door gebruikmaking van dieren behorende tot een andere soort dan een niet-menselijke primatensoort. U onderbouwt de noodzaak voor het gebruik van niet-humane primaten door te wijzen op de verschillen tussen BBB transporters in mensen en knaagdieren. Ook schrijft u dat TXP1 niet reageert op Trf1 in 'andere' geteste soorten, buiten apen en de mens, maar laat na om toe te lichten in welke overige soorten TXP1 is getest. In onze ogen is hiermee onvoldoende onderbouwd waarom het gebruik van Makaken (niet-humane primaten) noodzakelijk is voor het behalen van uw onderzoeksdoelen. Wij verzoeken wij u daarom toe te lichten welke andere soorten zijn getest in relatie tot TXP1 en of er ook andere soorten dan knaagdieren zijn overwogen als alternatief voor niet-humane primaten. Ook verzoeken wij u om aan de hand van wetenschappelijke publicaties te onderbouwen waarom er buiten (niet-humane) primaten geen andere geschikte diersoort is voor het behalen van uw onderzoeksdoelen.

**Alhoewel er veel onderzoek wordt gedaan naar BBB passage in knaagdieren is uit eerder onderzoek door de partner bekend dat de te onderzoeken stof (shuttle) niet werkt in knaagdieren omdat de receptor niet herkend wordt omdat er, itt aap en mens een groot verschil is tussen de humane en knaagdier receptor. Het eerdere onderzoek met TXP1 is gedaan in apen en bij overgaan naar een andere diersoort zullen deze studies herhaald moeten worden in de nieuwe diersoort. Er zijn geen andere studies met vergelijkbare producten (VNAR gebaseerd) en BBB shutteling bekend in andere diersoorten. Het gebruik van apen voor het bepalen van BBB passage en Trf1 receptor (met andere producten) is eerder beschreven in apenmodellen (zie onder).**

**Pardridge WM et al., Blood-brain barrier transport, plasma pharmacokinetics, and neuropathology following chronic treatment of the rhesus monkey with a brain penetrating humanized monoclonal antibody against the human transferring receptor. 2018. Mol. Pharm. 15:5207.**

**Yu YJ et al. Therapeutic bispecific antibodies cross the blood-brain barrier in nonhuman primates. 2014. Sci Transl Med. 6:261ra154**

- Het is onvoldoende navolgbaar hoe de groepsgroottes tot stand zijn gekomen. U geeft aan dat dit aantal gebaseerd is op bevindingen uit eerdere studies. Kunt u toelichten welke aannames en statistische methoden u gebruikt hebt voor het bepalen van het benodigde aantal dieren?

**Dit is geen vergelijking tussen 2 groepen en er worden geen statistische vergelijkingen gedaan. Het vast stellen van het profiel gebeurt per individueel dier. Omdat we uit eerder onderzoek weten dat de variatie heel klein is, zoals vermeld in de vergunningaanvraag, zijn 2 dieren per groep voldoende om het verloop van de concentratie met voldoende zekerheid te bepalen. Het controle eiwit wordt meegenomen als referentie voor de afname van de teststof in het bloed, TMDD en receptor saturatie. Omdat het controle eiwit een niet-bindend eiwit met dezelfde structuur en moleculair gewicht als de test stof is, maar PK en afname niet worden bepaald door receptor saturatie en TMDD wordt dit controle eiwit gebruikt als referentie.**

- Het ongerief in bijlage 2 is onvoldoende ingekaderd. Onder A. staat dat additionele bloedsamples

kunnen worden genomen. Wij verzoeken u om toe te lichten op welke manier dit zal worden uitgevoerd en hoe vaak dit maximaal zal gebeuren.

**Bloedafname wordt gedaan via de vena femoralis onder lichte verdoving en zal maximaal 3x plaatsvinden met max. 1 ml bloed per keer. Dit wordt gedaan ter vergelijking met de bloed PK studie. Het ongerief voor deze bloedafnames is "matig".**

- Uit uw aanvraag blijkt niet of de dieren reeds eerder voor dierproeven zijn ingezet. Als dat niet het geval is is er onder dit project geen sprake van hergebruik. Zou u kunnen toelichten of de dieren (mogelijk) reeds eerder voor dierproeven zijn ingezet?

**De dieren zijn mogelijk ingezet voor eerder onderzoek. Daarbij is het ongerief niet meer dan matig geweest en heeft de dierenarts de dieren geschikt bevonden voor het uitvoeren van dit onderzoek.**

## **VRAAG 21 Maart**

In afwachting op uw reactie op de onderstaande vragen is uw aanvraag in de CCD vergadering van afgelopen vrijdag (18-02) reeds voorbesproken. Tijdens deze bespreking is bij de CCD de vraag gerezen of het echt noodzakelijk is om dieren te doden voor de hersen-PK studie. Wij verzoeken u daarom in aanvulling op de onderstaande vragen ook te onderbouwen waarom terminale experimenten noodzakelijk zijn voor de brein PK studies. Kunt u hierbij ook ingaan op alternatieven die zijn overwogen en toelichten waarom deze niet geschikt zijn voor het beantwoorden van de onderzoeksvragen?

**We hebben inderdaad verschillende alternatieven overwogen, maar deze blijken niet geschikt, (nog) niet ontwikkelt voor apen en/of ernstig ongerief te veroorzaken. Een van de mogelijkheden is gebruik van beeldvormende technieken zoals PET-CT. Het is echter lastig om radioactieve labelling te doen en daarbij de karakteristieken van de te onderzoeken stof niet te veranderen en de juiste concentraties te kunnen bepalen. Dit zijn lastige, langdurige trajecten met een zeer kleine kans van slagen met deze stoffen. Daarnaast zal dit resulteren in het gebruik van extra dieren voor opzetten en validatie van de methode.**

**Een andere optie is microdialyse. Dit vergt specifieke operaties voor het plaatsen van canules in de hersenen met mogelijke complicaties. Deze dialyse studies zijn vaak kortdurend en geen 5 dagen, waarbij de dieren vaak vast zitten. Als de dieren niet vast zitten zullen ze voor de veiligheid ook solitair gehuisvest moeten worden om te voorkomen dat de canules beschadigen. Deze techniek is voor de dieren zeer belastend. Een bijkomend aandachtspunt is dat we de verdeling over de verschillende gebieden in de hersenen willen zien (o.a. hippocampus) en dat dat niet gaat met de microdialyse techniek.**

**Over het doden van het dier voor het doel van dit onderzoek wordt niet licht gedacht, maar op dit moment is dit voor de dieren de minst belastende methode om de PK in de hersenen (en de verschillende hersengebieden) te bepalen.**