

# Deliverable No. 6.6

## Ethical Documents

Grant Agreement No.: 604434

Project title: PneumoNP - Nanotherapeutics to Treat Antibiotic Resistant Gram-Negative Pneumonia Infections

Contractual Submission Date: 30/09/2014 (M9)

Actual Submission Date: 13/10/2014

Dissemination Level		
PU	Public	X
PP	Restricted to other programme participants (including the Commission Services)	
RE	Restricted to a group specified by the consortium (including the Commission Services)	
CO	Confidential, only for members of the consortium (including the Commission Services)	



<b>COVER AND CONTROL PAGE OF DOCUMENT</b>	
Project Acronym:	<b>PneumoNP</b>
Project Full Name:	Nanotherapeutics to Treat Antibiotic Resistant Gram-Negative Pneumonia Infections
Deliverable No.:	D6.6
Document name:	Ethical Documents
Nature (R, P, D, O) <sup>1</sup>	R
Dissemination Level (PU, PP, RE, CO) <sup>2</sup>	PU
Version:	1.0
Actual Submission Date:	13/10/2014
Editor: Institution: E-Mail:	John Hays Erasmus MC j.hays@erasmusmc.nl

**ABSTRACT:**

This deliverable contains the Ethical Documents obtained at the Dutch National and local Erasmus MC level to begin performing animal experiments.

**KEYWORD LIST: Ethical Documents**

The research leading to these results has received funding from the European Union's Seventh Framework Programme for research, technological development and demonstration under grant agreement n° 604434.

The author is solely responsible for its content, it does not represent the opinion of the European Community and the Community is not responsible for any use that might be made of data appearing therein.

<sup>1</sup> R=Report, P=Prototype, D=Demonstrator, O=Other

<sup>2</sup> PU=Public, PP=Restricted to other programme participants (including the Commission Services), RE=Restricted to a group specified by the consortium (including the Commission Services), CO=Confidential, only for members of the consortium (including the Commission Services)

<i>MODIFICATION CONTROL</i>			
Version	Date	Status	Author
1	13/10/2014	Final	John Hays and Irma Bakker-Woudenberg,

List of contributors

- John Hays and Irma Bakker-Woudenberg, Erasmus MC.

## Table of contents

TABLE OF CONTENTS .....	4
1. INTRODUCTION .....	5
2. DESCRIPTION OF ACTIVITIES .....	6
3. RESULTS .....	7
4. DISCUSSION AND CONCLUSION.....	8
<i>Appendix 1 - National Ethical Authorization (Landelijke goedkeuring)</i>	9
<i>Appendix 2 - Local Ethical Authorization (Erasmus MC goedkeuring)</i>	9

# 1. Introduction

Animal experiments are to be performed as detailed in WP5 of the PneumoNP Description of Work, as well as in the recently submitted Amendment. The first series of ethical documents associated with this work are attached to this document.

## 2. Description of activities

To get approval for the animal experiments as detailed in WP5 of the PneumoNP Description of Work, and in the recently submitted Amendment, partner EMC has taken the following steps:

First, partner EMC sent the Research Plan to their Local Ethical Authority at the Erasmus Laboratory Animal Science Center (EDC), he is the DVM Animal welfare officer/veterinarian at Erasmus MC. After reading our Research Plan he returned it with some questions and advice to partner EMC. According to this, partner EMC changed the Research Plan where required.

Next, partner EMC sent the Research Plan to the National Animal Experiments Committee DEC-Consult. During one of their meetings they discussed the relevance of the Research Plan in combination with the experimental approach and the number of animals requested.

Afterwards, DEC-Consult sent their response back to the DVM Animal welfare officer/veterinarian at Erasmus MC. Their response was: approval with only 1 question included as apparent in the attached document “Landelijke Goedkeuring DEC Consult EMC3305 (117-14-02) adv First Experiments”.

Next, the remaining question was discussed between the DVM Animal welfare officer/veterinarian at Erasmus MC and partner EMC. Agreement was achieved.

Finally, partner EMC received the definite approval from the DVM Animal welfare officer/veterinarian at Erasmus MC. In this regard, see the attached document “Instemming Proefdierdeskundige EMC3305 (117-14-02)”.

## 3. Results

Reference is made to the Annexes.

## 4. Discussion and conclusion

These documents allow animal experiments to be performed for PneumoNP project work.

The experiments authorized involve 1) animal passage of the *Klebsiella pneumonia*-ESBL strain, 2) the collection of alveolar aspirates from rats with *Klebsiella pneumonia*-ESBL pneumonia, 3) treatment of a *Klebsiella pneumoniae*-ESBL pneumonia with meropenem.

Due to the complexity of the project, and strict ethical requirements demanded by the animal ethical review board, ethical documents relating to additional PneumoNP animal experiments in Work Package 5 will be submitted to the EU as soon as they have been received by Erasmus MC.

This process ensures that animal work can begin as soon as possible, without becoming stalled over minor discussions relating to animal experiments that are only due to start in 8 – 12 months from now. These extra documents are now being prepared and will be submitted to the Dutch national and local Erasmus MC animal ethical committees within the next four weeks.



## **Appendix 1 - National Ethical Authorization (Landelijke goedkeuring)**

## **Appendix 2 - Local Ethical Authorization (Erasmus MC goedkeuring)**

**ADVIES DEC Nr. EMC 3305 (117-14-02)**

<b>Vergunninghouder</b>	<i>Erasmus MC</i>			
<b>Titel onderzoeksplan</b>	<i>Nano-therapeutics to Treat Antibiotic Resistant Gram-Negative Pneumonia Infections (PneumoNP)</i>			
<b>Status</b>	<i>Nieuw nog niet eerder uitgevoerd onderzoeksplan</i>			
<b>Ingediend door</b>	<i>Irma A.J.M. Bakker-Woudenberg <a href="mailto:i.bakker-woudenberg@erasmusmc.nl">i.bakker-woudenberg@erasmusmc.nl</a></i>			
<b>Afschrift aan</b>	<i>onderzoeker, proefdierdeskundige, leden van de commissie</i>			
<b>Adviestraject</b>	<i>Vergadering</i>	<i>11 juni 2014</i>	<i>Bespreking OZP</i>	<i>Advies</i>

**Doel:**

De experimenten in dit onderzoeksplan zijn onderdeel van het PneumoNP project dat zich richt op een innovatieve diagnostiek en behandeling van meervoudig-antibiotica-resistente pneumonieën veroorzaakt door *K. pneumoniae*. Dit onderzoek betreft:

Proef 1: Dierpassage van de *K. pneumoniae*-ESBL stam.

Proef 2: Het verkrijgen van alveolair exsudaat van ratten 24 uur na infectie van de longen met *K. pneumoniae*-ESBL. Dit alveolair exsudaat zal worden gebruikt voor de *ex vivo* selectie van de meest veelbelovende nano-therapeutica.

Proef 3: Validatie van het *K. pneumoniae*-ESBL pneumonie model in de rat op geschiktheid voor het PneumoNP project.

**Maatschappelijk en/of wetenschappelijk belang:**

Bij met name Gramnegatieve bacteriën waaronder *K. pneumoniae* stijgt de ontwikkeling van meervoudig antibioticaresistentie wereldwijd sterk, met als gevolg een snel toenemende sterfte aan infecties veroorzaakt door deze bacteriën.

Longontstekingen veroorzaakt door Gramnegatieve bacteriën komen in het ziekenhuis frequent voor, vooral in patiënten met onderliggende ziekten of een deficiënt immuunsysteem. Nieuwe vormen van behandeling met antibiotica in termen van 1) keuze van antibiotica, 2) antibiotica formulering en 3) route van antibiotica toediening, zijn zeer dringend nodig. De experimenten in dit onderzoeksplan zijn onderdeel van een project waarin men beoogt een inhalatietherapie met nanotherapeutica te ontwikkelen. Wat betreft de keuze van antibiotica richt men zich op de antimicrobiële peptiden (AMPs), een nieuwe klasse van antibiotica die goed worden getolereerd. Hun mogelijke rol in de behandeling van infecties met meervoudige antibiotica-resistente bacteriën is op zeer beperkte schaal aangetoond. Echter de werkelijke potentie van deze middelen *in vitro* en *in vivo* tijdens behandeling is nog niet volledig onderzocht.

Naast de noodzaak voor nieuwe behandelingsvormen met andere dan de standaard antibiotica, zijn vroege detectie van het infectieuze agens inclusief karakterisatie van het resistentieprofiel, en snelle monitoring van de effectiviteit van de behandeling van de multi-drug resistente bacteriële infectie van cruciaal belang. Dit experiment maakt deel uit van het PneumoNP project dat zich richt op deze doelstellingen, en beoogt uit *in vitro* onderzoek en dierexperimenteel onderzoek proof-of-concept te verkrijgen die deze innovatieve benadering dichterbij de patiënt moet brengen.

Na afsluiting van het PneumoNP project zal bij een bewezen succes deze innovatieve behandelingsmethode in de toekomst ook breder kunnen worden getest, bijvoorbeeld bij infecties door andere antibiotica-resistente pathogenen zoals Methicillin-resistent *Staphylococcus aureus*

(MRSA) en multi-drug of extensively-drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* (MDR-TB, XDR-TB).

---

**Aangevraagde dieren en verantwoording daarvan:** [aantallen, M/V, diersoort, stam(men); verdeling over aantal groepen, groeps grootte; herkomst]

Er wordt gebruik gemaakt van 126 mannelijke RP ratten. Deze worden verdeeld over drie groepen proef 1: 2 dieren, proef 2: 28 dieren, proef 3 groep a- h: 12 dieren per groep. De dieren zijn afkomstig uit de eigen fok.

**Proefopzet en handelingen:**

In **proef 1 en 2** wordt een unilaterale *K. pneumoniae*-ESBL pneumonie geïnduceerd (zie onderstaand) bij de ratten. Na 24 uur worden de dieren geëuthanaseerd middels CO<sub>2</sub> inhalatie waarna *K. pneumoniae*-ESBL wordt geïsoleerd uit de long (proef 1) of bloed wordt afgenomen middels hartpunctie en het alveolair exsudaat van de ratten wordt verzameld door het doen van een bronchoalveolaire lavage (BAL) van de linker (geïnfecteerde) long voor de *ex vivo* experimenten (proef 2).

In **proef 3** wordt bij de ratten ook een unilaterale *K. pneumoniae*-ESBL pneumonie geïnduceerd (zie onderstaand). Tijdens de narcose wordt een transponder subcutaan in de flank gebracht om zo de temperatuur te kunnen meten.

Er wordt 24 uur na infectie gestart met Meropenem (MEM)+cilastatin behandeling. Hiervoor krijgen de ratten gedurende 10 dagen elke 12 uur een intraperitoneale injectie met MEM en cilastatin (1:1, 3,125 / 6,25 / 12,5 / 25 / 25 mg/kg) Daarna volgt een periode van 10 dagen waarbij de ratten niet behandeld worden. De controle dieren krijgen een intraperitoneale injectie met PBS (groep 3c, 3f, 3h).

Gedurende dit experiment van 21 dagen wordt de disease progression score (DPS) bepaald. De dieren worden 1x per dag gewogen en de temperatuur wordt gemeten met behulp van de transponder. De ratten worden geëuthanaseerd wanneer ze de humane eindpunten bereiken, waarna bloed en longen worden gekweekt om dood door een superinfectie (niet *K. pneumoniae*) uit te sluiten. Op dag 21 worden de overlevende ratten gedood middels CO<sub>2</sub>-inhalatie. Bloed wordt afgenomen middels hartpunctie. Bloed en longen worden kwantitatief gekweekt.

Aanbrengen unilaterale *K. pneumoniae*-ESBL pneumonie

Voorafgaand aan het aanbrengen van de pneumonie worden de dieren onder narcose gebracht middels een intraperitoneale injectie met medetomidine/midazolam/fentanyl (0,6 ml). Longinfecties worden geïnduceerd door endotracheale intubatie gevolgd door inoculatie van de linker longlob met een suspensie van *K. pneumoniae*-ESBL (0,02 ml). Na infectie wordt de narcose geantagoniseerd middels een subcutane-injectie met antisedan/flumazenil/naloxon (1,0 ml).

**Maximale cumulatieve mate van ongerief:**

Gering/matig voor 30 dieren

Ernstig voor 96 dieren

---

**Ethische afweging:**

In de afweging worden door de commissie de volgende aspecten betrokken: het al dan niet aanwezig zijn van reële alternatieven, het belang van de doelstelling, het ongerief voor de dieren (als gevolg van zowel de experimentele handelingen, als huisvesting, eventuele genetische aanleg, duur van de proef, de toestand van het dier na afloop van de proef en alle andere factoren die het ongerief van de dieren kunnen beïnvloeden), alsmede eventuele andere ethische aspecten ten aanzien van het gebruik van dieren.

De commissie is ervan overtuigd dat voor het bereiken van de doelstelling van dit onderzoeksplan het gebruik van dieren onvermijdelijk is en dat die doelstelling niet te realiseren is met minder dieren en/of met minder ongerief voor de dieren.

Voorts is de commissie van oordeel dat het wetenschappelijk en maatschappelijk belang van de doelstelling van dit onderzoek opweegt tegen het voorgestelde gebruik van dieren en het met de huisvesting en experimenten gepaard gaande ongerief.

De commissie ziet geen reden te twijfelen aan de kwaliteit van de toetsing van de wetenschappelijke kwaliteit en de deugdelijke opzet van het onderzoek.

De commissie oordeelt derhalve dat de haar voorgelegde dierexperimenten ethisch toelaatbaar zijn.

**Advies:** Positief met ingang van 25 juni 2014 tot 01 januari 2018 onder de volgende voorwaarde en opmerking.

**Voorwaarde:**

1. Dit advies is pas van kracht na instemming met de reactie op onderstaande vraag:

**Vraag:**

1. In het antwoord op vraag 16 wordt vermeld dat de humane eindpunten worden bepaald aan de hand van een klinisch score systeem. De commissie verzoekt u dit systeem nader toe te lichten, zodat de het duidelijk wordt wat precies de gehanteerde criteria zijn om een dier uit proef te nemen.

De indiener wordt verzocht in een aparte schriftelijke reactie in te gaan op de bovengestelde vraag. (In het geval wordt besloten tevens een bijgesteld onderzoeksplan in te dienen, dient de bijgestelde tekst hierin helder (bijvoorbeeld in **bold**, *cursief*) te worden aangegeven.)

De commissie heeft de artikel-14 deskundige gemachtigd deze reactie te beoordelen. Na instemming wordt deze reactie ter kennisgeving aan de commissie toegestuurd.

Geen instemming van de proefdierdeskundige betekent dat de reactie in de eerstvolgende voltallige commissie vergadering zal worden besproken.

**Opmerking**

De verwachting is dat in de komende maanden de herziene Wet op de dierproeven van kracht zal worden. Op dat moment zal de besluitvorming over onderzoeksplannen en wijzigingen hierop ingrijpend veranderen.

Om te vermijden dat projecten mogelijk opnieuw ingediend moeten worden in het geval van verzoeken tot verlenging van adviezen van lopende onderzoeksplannen heeft de DEC van de DecConsult besloten de einddatum van alle adviezen en van 'verlengingen looptijd' te zetten op 1 januari 2018. Dit is de maximale periode waarover DEC's in de huidige situatie adviezen kunnen uitbrengen.

Deze verlenging van de geldigheidsduur van het advies heeft uitsluitend tot doel om u in staat te stellen de experimenten waarvoor u op dit moment al een positief advies heeft, af te ronden onder het regime van de huidige Wet op de dierproeven. De procedure van afhandeling na het van kracht worden van de nieuwe Wet op de Dierproeven van alle andere wijzigingen van lopende protocollen, zoals bijstellingen in vraagstelling en/of het experimental design, alsmede een verhoging van de aantallen dieren, is op dit moment nog niet bekend.

De onderzoeker dient iedere verandering ten opzichte van hetgeen beschreven staat in het onderzoeksplan, dit advies, alsmede onverwachte gebeurtenissen, onverwijld te melden aan de proefdierdeskundigen en de DEC.

Datum: 12 juni 2014  
Namens de DEC

Thea Vugts,  
Ambtelijk secretaris

## I.A.J.M. Bakker - Woudenberg

---

**From:** art14@erasmusmc.nl  
**Sent:** vrijdag 22 augustus 2014 9:56  
**To:** I.A.J.M. Bakker - Woudenberg  
**Subject:** Instemming Proefdierdeskundige EMC3305 (117-14-02)  
**Attachments:** EMC3305 (117-14-02) reactie op advies.docx; EMC3305 (117-14-02) aangepast protocol.docx

Geachte onderzoeker,

Uw reactie op vragen/voorwaarden van de DEC uit protocol 117-14-02 is door de Proefdierdeskundige beoordeeld en goed gekeurd.  
Het protocol is in AMS ontdaan van de art.14 lock.

Met vriendelijke groet,  
Miranda Buter

--

Erasmus Laboratory Animal Science Center (EDC)

dhr. dr. M.Sommers (DVM Animal welfare officer/veterinarian)  
Tel: \*31(0) 10 7038863

mevr. drs. T.C.G.M.Vughts (DVM Advisor animal care and use/veterinarian)  
Tel: \*31(0) 10 7043765

mevr. drs. D.Kuiper (DVM Advisor animal care and use/veterinarian)  
Tel: \*31(0) 10 7043441

mevr. ing. M.A.M.Buter (staf assistent)  
Tel: \*31(0) 10 7038877

Erasmus MC, University Medical Center Rotterdam  
Room: Ae 322/324  
P.O. box 2040  
3000 CA Rotterdam  
Netherlands

Please login on: <http://intranet.erasmusmc.nl/edc>, tab proefdierdeskundigen for Animal Welfare and Ethical Committee (DEC) information