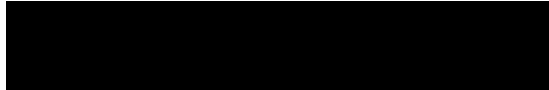




> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag



Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
www.centralecommissiedierproe  
ven.nl

T 0900 2800028  
ZBO-CCD@mines.nl

**Onze referentie**  
CCD 2015-45

**23 JUNI 2015**

Datum

Betreft Wob-verzoek W15-03

Geachte 

In uw email van 20 april 2015 heeft u met een beroep op de Wet openbaarheid van bestuur (hierna: Wob) informatie verzocht met betrekking tot vergunningaanvragen NTS 201550 Bescherming functionaliteit gehoorzenuw, NTS 201545 Opwekken van antigeen-specifieke immuunrespons, NTS 201547 Onderzoek visvriendelijkheid pompen en turbines, NTS 201544 Bioflocs, feed fish more with less en NTS 201541 Migratiemogelijkheden trekvis in Nederlandse rivieren.

Op uw verzoek vind alle correspondentie plaats per email. De ontvangst van uw verzoek is schriftelijk bevestigd op 21 april 2015. In deze brief is tevens de beslistermijn met vier weken verdaagd tot 16 juni 2015.

#### **Opschorting**

In de brief van 6 mei 2015 met kenmerk CCD 2015-28 is de beslistermijn met twee weken opgeschort vanwege het vragen van zienswijzen aan derden. De uiterste beslistermijn was daarmee 30 juni 2015.

#### **Wettelijk kader**

Uw verzoek valt deels onder de reikwijdte van de Wob.

#### **Inventarisatie documenten**

Op basis van uw verzoek zijn in totaal 52 documenten aangetroffen. Deze documenten zijn opgenomen in een inventarislijst, die als bijlage bij dit besluit is gevoegd. In dit besluit wordt verwezen naar de corresponderende nummers uit de inventarislijst, zodat per document duidelijk is wat is besloten.

Een document is dubbel opgenomen in de inventarisatie, dit wordt echter eenmaal verstrekt. Het betreft NTS 201547 document 11, dat identiek is aan document 5.

### **Zienswijzen**

Er zijn derde belanghebbenden bij de openbaarmaking van de documenten, deze zijn in de gelegenheid gesteld hierover een zienswijze te geven.

#### **Zienswijze NTS 201541 en NTS 201547**

Vergunninghouder geeft aan dat de projectbeschrijvingen en bijbehorende bijlagen concurrentiegevoelige informatie bevatten. Openbaarmaking daarvan zou de concurrentiepositie van vergunninghouder, die het onderzoek in concurrentie uitvoert met andere advies en ingenieursbureaus, in hoge mate schaden.

Vanwege eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer en ter voorkoming van onevenredige bevoordeling of benadeling van de bij de aangelegenheid betrokken natuurlijke personen of rechtspersonen danwel derden wil de adviserende DEC niet dat informatie over de DEC openbaar wordt.

#### **Zienswijze NTS 201550**

Vergunninghouder en adviserende DEC willen namen en contactgegevens van medewerkers vanwege privacy en dieractivisme niet openbaar maken. Dat geldt ook voor andere gegevens die herleidbaar zijn tot medewerkers van betreffende organisaties.

#### **Zienswijze NTS 201544 en NTS 201545**

Vergunninghouder heeft uit overwegingen van bescherming van personen en bedrijfsgeheimen bedenkingen tegen openbaarmaking van persoonsgegevens, contactgegevens, locatiegegevens en bedrijfsgegevens. Ook kunnen stukken vertrouwelijke informatie bevatten die vanwege contractuele afspraken niet openbaar mogen worden gemaakt.

De zienswijzen heeft de CCD in haar belangenafweging meegenomen.

### **Besluit**

De CCD heeft besloten een deel van de door u opgevraagde informatie niet openbaar te maken. De motivering vindt u in het onderdeel Overwegingen in dit besluit.

### **Reeds openbare documenten**

Van iedere verleende vergunning wordt een niet-technische samenvatting op de website van de CCD gepubliceerd. Deze informatie is daarmee reeds openbaar.

Het betreft NTS 201541 document 9, NTS 201544 document 9, NTS 201545 document 6, NTS 201547 document 10 en NTS 201550 document 6.

### **Overwegingen**

Allereerst wil de CCD u wijzen op het volgende. Ingevolge artikel 3, vijfde lid, van de Wob, wordt een verzoek om informatie ingewilligd met inachtneming van het bepaalde in de artikelen 10 en 11.

Het recht op openbaarmaking op grond van de Wob dient uitsluitend het publieke belang van een goede en democratische bestuursvoering. Het komt iedere burger

in gelijke mate toe. Daarom kan ten aanzien van de openbaarheid geen onderscheid worden gemaakt naar gelang de persoon of de bedoeling of belangen van de verzoeker. Bij de te verrichten belangenafweging worden dan ook betrokken het algemene belang bij openbaarmaking van de gevraagde informatie en de door de weigeringsgronden te beschermen belangen, maar niet het specifieke belang van de verzoeker.

Evenmin kent de Wob een beperkte vorm van openbaarmaking. Dit betekent dat openbaarmaking van de gevraagde documenten uitsluitend aan u op grond van de Wob niet mogelijk is. Indien de betreffende documenten aan u worden verstrekt, moet de CCD deze ook aan anderen geven indien zij daarom verzoeken. In dat licht vinden de onderstaande belangenafwegingen dan ook plaats.

### **Bedrijfs- en fabricagegegevens**

Artikel 10, eerste lid, aanhef en onder c, van de Wob bepaalt dat het verstrekken van informatie achterwege blijft voor zover dit bedrijfs- en fabricagegegevens betreft, die door natuurlijke personen of rechtspersonen vertrouwelijk aan de overheid zijn medegedeeld.

In de documenten NTS 201541 met nummers 2, 3, 5, 6 en 7 en NTS 201547 met nummers 2, 3, 7, 8 en 9 en NTS 201545 met nummer 2, staan bedrijfsgegevens en fabricagegegevens. Deze gegevens zijn door vergunninghouder vertrouwelijk aan de CCD meegedeeld in het kader van artikel 10a van de Wet op de dierproeven.

Uit bovengenoemde documenten kunnen wetenswaardigheden worden afgeleid met betrekking tot de technische bedrijfsvoering en het productieproces, de onderzoeksstrategie-, methoden en commerciële toepassing van de resultaten van het onderzoek. Met openbaarmaking krijgen ook concurrerende instellingen inzicht in deze gegevens, waardoor de concurrentiepositie van vergunninghouder wordt aangetast. De toepassing van specifieke onderzoeksmethoden en -middelen is een zeer belangrijke factor in de keuze van opdrachtgevers voor betreffende vergunninghouder, die het onderzoek uitvoert in concurrentie met andere advies- en ingenieursbureaus. Deze informatie zal de CCD daarom niet openbaar maken.

Voor alle bovengenoemde documenten geldt dat de vertrouwelijke en concurrentiegevoelige bedrijfs- en fabricagegegevens onlosmakelijk zijn verbonden en vervlochten met de resterende gegevens in de betreffende documenten. De CCD zal de documenten daarom in het geheel niet openbaar maken.

Overigens wordt het publiek wel degelijk geïnformeerd over het onderzoek, zonder daarbij concurrentiegevoelige informatie prijs te geven. Dat gebeurt in de vorm van een niet technische samenvatting, die voor alle verleende projectvergunningen wordt gepubliceerd op de website van de CCD.

### **De eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer**

Op grond van artikel 10, tweede lid, aanhef en onder e, van de Wob blijft verstrekking van informatie achterwege voor zover het belang daarvan niet opweegt tegen het belang dat de persoonlijke levenssfeer wordt geëerbiedigd.

In NTS 201541 documenten 1, 4, 8, 9 en 12, NTS 201544 documenten 1, 4 t/m 8 en 11, NTS 201545 documenten 1, 5 en 8, NTS 201547 documenten 1, 5, 6 en 13, NTS 201550 documenten 1 en 8 staan persoonsgegevens. De CCD is van oordeel dat t.a.v. deze gegevens het belang dat de persoonlijke levenssfeer wordt geëerbiedigd, zwaarder moet wegen dan het belang van openbaarheid. Personen die betrokken zijn bij het verrichten van dierproeven oefenen een maatschappelijke taak uit, en lopen het risico slachtoffer te worden van dierenrechtenactivisme <sup>1</sup>. Dat geldt ook voor de medewerkers van de CCD. Daarom zijn de persoonsgegevens verwijderd uit deze documenten.

### **Het voorkomen van onevenredige bevoordeling of benadeling**

Op grond van artikel 10, tweede lid, aanhef en onder g, van de Wob blijft verstrekking van informatie achterwege voor zover het belang daarvan niet opweegt tegen het belang van het voorkomen van onevenredige bevoordeling of benadeling van bij de aangelegenheid betrokken natuurlijke personen of rechtspersonen dan wel van derden.

### *Herleidbaarheid*

Integrale openbaarmaking van de door u opgevraagde gegevens leidt in dit geval tot onevenredige benadeling van de organisaties en de medewerkers waarop de gegevens betrekking hebben. In hierna te noemen documenten staat informatie die rechtstreeks of op zeer eenvoudige wijze te herleiden is naar de betrokken organisaties of personen. Het is niet uitgesloten dat openbaarmaking van deze gegevens vanuit dierenrechtenactivisme buitensporige reacties kan opleveren jegens deze organisaties of personen.

In verband met de zienswijze van de vergunninghouder en de adviserende DEC weegt de CCD voor de documenten NTS 201544 nummers 1 t/m 8 en 11 en NTS 201545 nummers 1 t/m 5 en 8 en NTS 201541 nummers 1, 8 en 12 en NTS 201547 nummers 1, 5 en 13 het belang van het voorkomen van onevenredige benadeling zwaarder dan het belang van openbaarmaking. Daarom is uit de betreffende documenten alle informatie verwijderd waarmee deze organisaties of personen geïdentificeerd kunnen worden:

- Namen van natuurlijke personen, zoals onderzoekers en contactpersonen
- Namen van vergunninghouder en adviserende DEC
- Deelnemernummer van de vergunninghouder
- Locatiegegevens als straatnaam, postcode, plaats maar ook de afdeling en het organisatieonderdeel wanneer deze door de naam of de specifieke unieke omschrijving direct te herleiden zijn tot de betreffende organisatie,
- Emailadressen, telefoonnummers en faxnummers die direct herleidbaar zijn tot personen of organisaties

### *Voorkomen van fraude*

Wanneer de CCD handtekeningen van bestuurders openbaar maakt zijn deze eenvoudig te kopiëren. Het is niet uitgesloten dat kwaadwillenden deze handtekening gebruiken voor frauduleuze doeleinden. Het belang van het voorkomen van onevenredige benadeling weegt de CCD hier zwaarder dan het

---

<sup>1</sup> blz 14 MvT Wet op de dierproeven,

belang van openbaarmaking. Daarom zijn uit alle vergunningen de handtekeningen van bestuurders verwijderd.

#### *Concurrentiegevoelige informatie*

De documenten NTS 201541 met nummers 2, 3, 5, 6 en 7 en NTS 201547 met nummers 2, 3, 7, 8 en 9 en NTS 201545 met nummer 2 bevatten bedrijfsvertrouwelijke en concurrentiegevoelige informatie. Openbaarmaking daarvan zou concurrenten onevenredig bevoordelen, zij krijgen op eenvoudige wijze en zonder investeringen inzicht in bedrijfsvertrouwelijke en concurrentiegevoelige informatie. Vergunninghouder zou door openbaarmaking onevenredig benadeeld worden vanwege de aantasting van haar concurrentiepositie en daarmee samenhangende financiële schade.

Voor bovengenoemde bovengenoemde documenten weegt de CCD het belang van het voorkomen van onevenredige benadeling en onevenredige bevoordeling zwaarder dan het belang van openbaarmaking.

Voor al deze documenten geldt dat de vertrouwelijke en concurrentiegevoelige gegevens onlosmakelijk zijn verbonden en vervlochten met de resterende gegevens in de betreffende documenten. De documenten worden daarom in het geheel niet openbaar gemaakt.

#### **Persoonlijke beleidsopvattingen in een stuk voor intern beraad**

Artikel 11, eerste lid, van de Wob bepaalt dat in geval van een verzoek om informatie uit documenten, opgesteld ten behoeve van intern beraad, geen informatie wordt verstrekt over daarin opgenomen persoonlijke beleidsopvattingen.

Alle ambtelijke adviezen zijn opgesteld ten behoeve van intern beraad en bevatten persoonlijke beleidsopvattingen. Het betreft de documenten NTS 201541 nummer 10, NTS 201544 nummer 10, NTS 201545 nummer 7, NTS 201547 nummer 12 en NTS 201550 nummer 7. De CCD verstrekt daarover geen informatie.

De CCD acht het niet in het belang van een goede en democratische bestuursvoering indien standpunten van ambtenaren zelfstandig worden betrokken in de publieke discussie. De CCD ziet dan ook geen aanleiding om met toepassing van artikel 11, tweede lid, van de Wob in niet tot personen herleidbare vorm informatie te verstrekken over deze persoonlijke beleidsopvattingen. De ambtelijke adviezen bevatten ook feitelijke informatie. Deze is echter zodanig verweven met de persoonlijke beleidsopvattingen dat die daar niet los van kan worden gezien. De CCD heeft daarom besloten alle ambtelijke adviezen geheel te weigeren.

#### **Uitgestelde openbaarmaking**

Aangezien naar verwachting belanghebbenden bezwaar hebben tegen de openbaarmaking van de informatie vindt de feitelijke openbaarmaking van de documenten niet eerder plaats, dan twee weken na dagtekening van deze beschikking, conform artikel 6, vijfde lid, van de Wob. Op deze wijze wordt aan deze belanghebbenden de mogelijkheid geboden om te proberen de openbaarmaking tegen te houden. Dit kan door het indienen van een

bezwaarschrift bij de CCD én door daarnaast bij de rechtbank te verzoeken om, bij wijze van voorlopige voorziening, het onderhavige besluit tot openbaarmaking te schorsen. Indien binnen twee weken na dagtekening van dit besluit een bezwaarschrift is ingediend en een verzoek om voorlopige voorziening is gedaan, wordt de uitspraak van de voorzieningenrechter afgewacht, voordat tot daadwerkelijke openbaarmaking wordt overgegaan.

De stukken die met dit besluit voor een ieder openbaar worden, zullen na afloop van de twee-weken termijn op [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl) worden geplaatst.

Met vriendelijke groet,

De Centrale Commissie Dierproeven,  
namens deze



ir. G. de Peuter  
Algemeen Secretaris

#### **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 20401, 2500 EK 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 onderwerp te vermelden. U vindt deze gegevens bovenaan 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. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige voorziening vragen bij de Voorzieningenrechter van de rechtbank in de woonplaats van de aanvrager. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisend belang.

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 aanvrager valt.

Inventaris Wob-verzoek W15-03											
nr.	document	wordt verstrekt			weigeringsgronden			11.1			
		reeds openbaar	niet geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g				
	NTS 201541 Migratiemogelijkheden trekvis in NL rivieren										
1	Aanvraagformulier						X	X			
2	Projectvoorstel -oud		X				X	X			
3	Bijlage beschrijving dierproeven -oud		X				X	X			
4	Brief CCD aanhouden beoordeling dd 20 maart 2015			X							
5	Projectvoorstel - nieuw		X				X	X			
6	Bijlage 1 beschrijving dierproeven -nieuw		X				X	X			
7	Bijlage 2 beschrijving dierproeven - nieuw		X				X	X			
8	DEC advies						X	X			
9	NTS	X									
10	Ambtelijk advies aan CCD		X								X
11	oplegnotitie ambtelijk advies		X								X
12	vergunning			X			X	X			X

Inventaris Wob-verzoek W15-03										
nr.	document	wordt verstrekt			weigeringsgronden					
		reeds openbaar	niet geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g			
	NTS 201544 Bioflocs feed fish more with less									11.1
1	Aanvraagformulier					X				
2	projectvoorstel								X	
3	Bijlage beschrijving dierproeven									X
4	Brief CCD aanhouden beoordeling dd 23 maart 2015			X				X		
5	Reactie aanvrager dd 26 maart 2015			X				X		
6	Brief CCD aanhouden beoordeling dd 30 maart 2015			X				X		
7	Reactie aanvrager dd 31 maart 2015							X		
8	DEC advies			X				X		
9	NTS 201544	X								
10	Ambtelijk advies aan CCD									X
11	vergunning			X				X		X



Inventaris Wob-verzoek W15-03										
nr.	document	wordt verstrekt			weigeringsgronden			11.1		
		reeds openbaar	niet geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g			
	NTS 201545 Opwekken antigeen specifiek immuunrespons									
1	Aanvraagformulier			x				x		
2	Projectvoorstel			x	x				x	
3	Bijlage 1 beschrijving dierproeven			x					x	
4	Bijlage 2 beschrijving dierproeven			x					x	
5	DEC advies								x	
6	NTS	x								
7	Ambtelijk advies		x							x
8	Vergunning			x				x		x

Inventaris Wob-verzoek W15-03												
nr.	document	wordt verstrekt			weigeringsgronden							
		reeds openbaar	niet geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1				
	NTS 201547 Onderzoek visvriendelijkheid in pompen en turbines											
1	Aanvraagformulier			X				X				
2	Projectvoorstel -oud		X						X			
3	Bijlage beschrijving dierproef - oud		X						X			
4	NTS -oud				X							
5	DEC advies (zelfde als doc 11)									X		
6	Brief CCD aanhouden beoordelen dd 20 maart 2015									X		
7	Projectvoorstel -nieuw		X						X			
8	Bijlage 1 beschrijving dierproeven -nieuw		X						X			
9	Bijlage 2 beschrijving dierproeven - nieuw		X						X			
10	NTS -nieuw											
11	zelfde als document 5											
12	Ambtelijk advies		X									
13	vergunning							X				
										X		X

Inventaris Wob-verzoek W15-03									
nr.	document	wordt verstrekt				weigeringsgronden			
		reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTS 201550 Bescherming functionaliteit gehoorzenuw								
1	Aanvraagformulier				X			X	
2	projectvoorstel								
3	Bijlage 1 beschrijving dierproeven								
4	Bijlage 2 beschrijving dierproeven								
5	DEC advies				X				
6	NTS	X							
7	Ambtelijk advies		X						X
8	Vergunning				X		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.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl) of in de toelichting op de website.
- Of bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

### 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 <input type="text" value=""/> <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie <input type="text" value=""/> Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde <input type="text" value=""/> KVK-nummer <input type="text" value=""/>
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	Straat en huisnummer <input type="text" value=""/> Postbus <input type="text" value=""/> Postcode en plaats <input type="text" value=""/> IBAN <input type="text" value=""/> Tenaamstelling van het rekeningnummer <input type="text" value=""/>
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters <input type="text" value=""/> <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw. Functie <input type="text" value=""/> Afdeling <input type="text" value=""/> Telefoonnummer <input type="text" value=""/> E-mailadres <input type="text" value=""/>
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters <input type="text" value=""/> <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. Functie <input type="text" value=""/> Afdeling <input type="text" value=""/> Telefoonnummer <input type="text" value=""/> E-mailadres <input type="text" value=""/>

- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.
- |                             |  |
|-----------------------------|--|
| (Titel) Naam en voorletters | <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
| Functie                     |  |
| Afdeling                    |  |
| Telefoonnummer              |  |
| E-mailadres                 |  |
- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?
- Ja > Stuur dan het ingevulde formulier Melding Machtiging mee met deze aanvraag
- Nee

## 2 Over uw aanvraag

- 2.1 Wat voor aanvraag doet u?
- Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3
- Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
- Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2
- Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
- Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3
- 2.2 Is dit een wijziging voor een project of dierproef waar al een vergunning voor verleend is?
- Ja > Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier
- Nee > Ga verder met vraag 3
- 2.3 Is dit een melding voor een project of dierproef waar al een vergunning voor is verleend?
- Nee > Ga verder met vraag 3
- Ja > Geef hier onder een toelichting en ga verder met vraag 6

## 3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- |            |                     |
|------------|---------------------|
| Startdatum | 0 1 _ 0 4 _ 2 0 1 5 |
| Einddatum  | 0 1 _ 0 4 _ 2 0 2 0 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Induction of antibody responses in llamas for isolation of specific antigen binding recomb
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Opwekken van een antigeen-specifieke immuunrespons in lama's om specifieke antilicha
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- |             |  |
|-------------|--|
| Naam DEC    |  |
| Postadres   |  |
| E-mailadres |  |

## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.  
*Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*

<input checked="" type="checkbox"/>	Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 741,00	Lege
<input type="checkbox"/>	Wijziging €	Lege
<input type="checkbox"/>	Via een eenmalige incasso	
<input checked="" type="checkbox"/>	Na ontvangst van de factuur	

## 5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

Projectvoorstel

Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen, indien van toepassing

Melding Machting DEC. advices

2 x Description animal procedures

## 6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:

Centrale Commissie  
 Dierproeven  
 Postbus 20401  
 2500 EK Den Haag

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). 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 F 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	[Redacted]
Functie	gemandateerd vergunninghouder
Plaats	[Redacted]
Datum	4 - 3 - 2015
Handtekening	[Redacted]



## Form

### Project proposal

- This form should be used to write the project proposal for animal procedures.
- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed.
- For more information on the project proposal, see our website ([www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl)).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

#### 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 Provide the title of the project.

#### 2 Categories

- 2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.
- Basic research
- Translational or applied research
- Regulatory use or routine production
- Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare
- Research aimed at preserving the species subjected to procedures
- Higher education or training
- Forensic enquiries





References:

De Meyer, T., Muyldermans, S., Depicker, A., 2014. Nanobody-based products as research and diagnostic tools. Trends Biotechnol. 32, 263-70.

Harmsen, M.M., De Haard, H.J., 2007. Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. Appl. Microbiol. Biotechnol. 77, 13-22.

### 3.2 Purpose

Describe the project's main objective and explain why this objective is achievable.

- If the project is focussed on one or more research objectives, which research questions should be addressed during this project?
- If the main objective is not a research objective, which specific need(s) does this project respond to?

The aim of the project is to isolate nanobodies that bind specifically to particular antigens. The nanobodies to be isolated will be applied in human or veterinary diagnostics or therapy. The research is therefore applied or translational. The following three objectives are likely to be pursued by [REDACTED] the coming years.

A) Use of nanobodies in diagnostic tests for human and animal diseases

[REDACTED]

B) Use of nanobodies as medicine

[REDACTED]

C) Use of nanobodies to purify medicines

[REDACTED]

---

References:

Harmsen, M.M., Fijten, H.P., Westra, D.F., Coco-Martin, J.M., 2011a. Effect of thiomersal on dissociation of intact (146S) foot-and-mouth disease virions into 12S particles as assessed by novel ELISAs specific for either 146S or 12S particles. *Vaccine* 29, 2682-2690.

Hmila, I., Saerens, D., Ben Abderrazek, R., Vincke, C., Abidi, N., Benlasfar, Z., Govaert, J., El Ayeb, M., Bouhaouala-Zahar, B., Muyldermans, S., 2010. A bispecific nanobody to provide full protection against lethal scorpion envenoming. *Faseb J* 24, 3479-3489.

Hussack, G., Arbabi-Ghahroudi, M., van Faassen, H., Songer, J.G., Ng, K.K., MacKenzie, R., Tanha, J., 2011. Neutralization of *Clostridium difficile* toxin A with single-domain antibodies targeting the cell receptor binding domain. *J. Biol. Chem.* 286, 8961-8976.

Verheesen, P., ten Haaft, M.R., Lindner, N., Verrips, C.T., de Haard, J.J., 2003. Beneficial properties of single-domain antibody fragments for application in immunoaffinity purification and immuno-perfusion chromatography. *Biochim. Biophys. Acta* 1624, 21-28.

---

### 3.3 Relevance

---

What is the scientific and/or social relevance of the objectives described above?

---

In general the novel nanobodies will result in improved diagnostics or therapy of diseases in animals or humans. Thus, it contributes to human and animal health. Human therapeutic applications are most likely cancer and inflammatory diseases. Animal therapeutic applications are most likely infectious diseases. An important objective of this project is to isolate nanobodies for purification of biologicals with [REDACTED]. This will lead to a higher degree of purification of such biologicals resulting in safer human therapy. Sometimes such biologicals exist in two isoforms which differ in therapeutic efficacy or levels of side effects. Purification of the most active isoform will lead to a more effective therapy or less side effects.

Due to their advantages nanobodies can be isolated that perform better than conventional antibodies for particular applications. Examples are:

- 1) Improvement of FMDV vaccines using nanobodies that discriminate intact and degraded FMDV virions (Harmsen et al., 2011a)
- 2) Improved tumor diagnostics using imaging techniques with nanobodies (De Meyer et al., 2014)
- 3) Improved or novel human therapy against various human diseases using nanobodies by [REDACTED]

References:

De Meyer, T., Muyldermans, S., Depicker, A., 2014. Nanobody-based products as research and diagnostic tools. *Trends Biotechnol.* 32, 263-70.

Harmsen, M.M., Fijten, H.P., Westra, D.F., Coco-Martin, J.M., 2011a. Effect of thiomersal on dissociation of intact (146S) foot-and-mouth disease virions into 12S particles as assessed by novel ELISAs specific for either 146S or 12S particles. *Vaccine* 29, 2682-2690.

---

### 3.4 Research strategy

---

3.4.1 Provide an overview of the overall design of the project (strategy).

---

[REDACTED] is a service provider for llama immunization. Clients are primarily third parties and occasionally internal [REDACTED] projects. The client usually delivers the antigen. Occasionally [REDACTED] buys or makes the antigen. [REDACTED] discussed the llama immunization protocol with the client and informs the client that immunization of a llama with several antigens in parallel is advantageous both for the projects costs and to reduce animal use. [REDACTED] isolates sera and RNA from PBLs of each immunized llama for isolation of nanobodies either by the client or in [REDACTED] laboratories.

---

---

### 3.4.2 Provide a basic outline of the different components of the project and the type(s) of animal procedures that will be performed.

---

A humoral immune response against the antigen of interest will be induced in a llama (*Lama glama*) by immunization. The llama will be immunized with several antigens in parallel to reduce animal use. As a rule of thumb we immunize with a maximum of ten antigens per llama. It is difficult to determine in advance how many antigens can be pooled for one llama immunization. This depends on several factors:

- 1) The immunogenicity of the antigen that is often known from immunizations in other mammals. Highly immunogenic antigens can be pooled more easily.
- 2) The requirements for the nanobody. For example a human therapeutic nanobody often has much more stringent requirements such as low immunogenicity in humans, safety, high potency than a nanobody for veterinary diagnostics.
- 3) The matrix effects of mixing antigens. For example a formalin inactivated toxin cannot be mixed with an antigen whose immunogenicity is destroyed by formalin.

Immunization can be done in several ways:

- 1) with a dead or inactivated antigen mixed with an adjuvant
- 2) by DNA immunization, often in combination with method 1). Here DNA immunization is used for priming immunization and dead antigen is used for one or two booster immunizations.
- 3) by vectored immunization. Here the antigen of interest is inserted into a virus or bacterium that shows limited replication in a llama without causing disease signs. During replication the antigen of interest is expressed in the llama. Examples of such an approach are immunization with Newcastle Disease Virus - vectored vaccines (Harmsen et al., 2011b) or with canarypox virus - vectored vaccines (Paoletti et al., 1994).

It is also possible that a llama is immunized by a combination of all three methods using three different antigens or antigen cocktails. During the immunization small samples of blood are collected for serum preparation. This can be used to monitor immune responses. After the llama has developed a sufficiently high antibody response against the antigen of interest a large blood sample is taken for isolation of peripheral blood lymphocytes (PBLs). This blood sample is larger than the serum samples to ensure that a diverse set of B-cells producing heavy-chain antibodies is isolated which is necessary to ensure nanobody library diversity. Two of such blood samples are collected at different moments during the immunisation procedure to ensure even more diverse nanobody libraries.

#### References:

- Harmsen, M.M., Antonis, A., Moormann, R.J.M., Kortekaas, J., 2011b. Parenteral vaccination of mammalian livestock with Newcastle disease virus-based vector vaccines offers optimal efficacy and safety. *Bioengineered Bugs* 2, 1.
- Paoletti, E., Tartaglia, J., Taylor, J., 1994. Safe and effective poxvirus vectors--NYVAC and ALVAC. *Dev Biol Stand* 82, 65-69.
- 

### 3.4.3 Describe the coherence between the different components and the different steps of the project. If applicable, describe the milestones and selection points.

---

The coherence between the llama immunizations is that they all serve the isolation of nanobodies. The experiments differ in the nature of the antigen. Different antigens are combined into a cocktail for llama immunization. ■■■■ waits with llama immunization until several antigens, sometimes serving different objectives, can be simultaneously used for llama immunization. Llamas are preferably immunized consecutively, after a half year resting period, with another antigen cocktail. Two llamas are immunized with the same antigen cocktail since different llamas have very different antibody responses. Such immunization of two llamas is normally sufficient for retrieving nanobodies that are suitable for achieving the objective. It is difficult to determine in advance how many llamas are needed, especially since llamas are often immunized with cocktails of antigens. For example when llamas are immunized with ten antigens that are lowly immunogenic and which serve socially highly relevant human therapeutic objectives then even more than two llamas could be immunized.

We do not have a go-nogo between the different phases in llama immunization: the induction of an immune response and the collection of a large blood sample for isolation of RNA from PBLs, because:

---

1) The experience with llama immunization has shown that phage display selection is such a powerful selection methodology that one can even isolate good nanobodies from animals that do not (yet) show a good antibody response in serum. In other words: phage display selection is a more sensitive technology than simple ELISA.

2) Serum also contains conventional antibodies composed of both heavy and light chains which are not suitable for nanobody isolation. These antibodies interfere in the detection of the heavy-chain antibody response from which nanobodies are retrieved. Therefore additional methods are needed to separate conventional and heavy-chain antibodies.

3) It is highly impractical to collect an additional blood sample for serum preparation to predict antibody responses for future large blood sample collection since one then has to do a very rapid test within a few days. Furthermore, this also requires the collection of an additional blood sample. In our experience the collection of an additional blood sample is more discomforting to the llama than the collection of a single larger blood sample.

3.4.4 List the different types of animal procedures. Use a different appendix 'description animal procedures' for each type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
1	Immunization of llamas housed in a meadow for retrieving nanobodies
2	Immunization of llamas housed in contained stables for retrieving nanobodies
3	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



isolation of nanobodies that bind to specific antigens used for llama immunization. Most commonly these vectors are phagemids suitable for phage display selection.

Describe the proposed animal procedures, including the nature, frequency and duration of the treatment. Provide justifications for the selected approach.

The basic llama immunization procedure consists of three immunizations of a llama with a dead antigen, usually proteinaceous, formulated with an adjuvant. Immunizations are given with 3 to 4 week intervals. The first two immunizations are preferably given with the oil-emulsion adjuvant Specol (Stimune, Life Technologies), which is proven effective in llamas but gives side reactions such as itching and pain that can last for several days (Boersma et al., 1992). Post mortem inspection at [REDACTED] of llamas immunized with Specol has revealed encapsulated granuloma at injection sites. Immunizations are normally given intramuscularly, in a maximum volume of 5 ml per injection, that is given at two injection sites in the hind thigh. The third (last) immunization is preferably given with the adjuvant Montanide IMS1312 (Seppic) since this adjuvant gives less adverse reactions. Immunization is again intramuscularly in a maximum volume of 5 ml. The IMS1312 adjuvant is a watery adjuvant with less depot function than Specol. However, for the last immunization such a depot function is much less important since the last blood sample is collected a week later and any immune response thereafter is completely irrelevant. Preferably 100 microgram of protein is used per immunization. In exceptional cases, when the antigen to be used for llama immunization cannot be purchased separately and is only available in a commercial (adjuvanted) vaccines registered for veterinary use, we immunize with such vaccines.

A variant on immunization with dead antigens is immunization with live cells as antigen. This is often done to isolate nanobodies against membrane proteins. Such llama immunizations have been performed with tumour cells (Baral et al. 2011) or HEK293 cells expressing the antigen of interest (Jahnichen et al., 2010) and can be done with or without adjuvant.

In principle (to reduce the number of animals to be used) antigen cocktails are used for llama immunization. Cocktails can be made with as many as ten different antigens. In such cocktails, in theory antigenic competition can decrease the immune response against particular antigens. This is often described when evaluating mixtures of antigens that protect against different diseases. However, since the aim of the experiments is not to induce high antibody titres but rather to induce sufficiently high antibody titres for nanobody retrieval, we consider antigenic competition of less importance here. There are several literature examples of successful nanobody retrieval after immunization with cocktails (Conway et al., 2010; Harmsen et al., 2013).

Since the aim of the induction of antibody responses is to retrieve antigen specific nanobodies by molecular biological techniques there is no need to induce extremely high antibody titres. This is opposed to the use of vaccines for protection of the animal against disease, where higher antibody titres are often better for protection. However, for nanobody retrieval purposes, it is preferred to induce a sufficiently high immune response for successful isolation of a diverse set of nanobodies. When giving many booster immunizations to a llama one can sometimes reach higher antibody titres, but this often is accompanied by amplification of only a subset of the nanobodies that bind to only one epitope with high affinity. Such nanobodies could not be suitable for the project objective while other, more suitable, nanobodies have lower titres after the last boosters. In such a case the last boosters were detrimental to reach the project objective. Thus, it is better to aim for a diverse antibody response that is sufficiently high for monoclonal nanobody isolation using a limited number of immunizations. In [REDACTED] experience three conventional immunizations with proteinaceous antigens and adjuvant or four DNA immunizations are sufficient for this purpose.

One week after the last immunization and often also 1 week after the penultimate immunization a large blood sample will be collected for isolation of peripheral blood lymphocytes for subsequent nanobody retrieval. For this purpose the llamas are fixated (without sedation) and 150 ml heparinized blood is collected from the vena jugularis.

During the immunization procedure small samples of at most 20 ml blood are collected from the vena jugularis for preparation of serum that can be used to evaluate the immunization procedure by measuring antibody titres. Serum samples are never collected more than once weekly.

#### References:

Baral, T.N., Murad, Y., Nguyen, T.D., Iqbal, U., Zhang, J., 2011. Isolation of functional single domain antibody by whole cell immunization: implications for cancer treatment. *J Immunol Methods* 371, 70-80.

Boersma, W.J., Bogaerts, W.J., Bianchi, A.T., Claassen, E., 1992. Adjuvant properties of stable water-in-oil emulsions: evaluation of the experience with Specol. Res. Immunol. 143, 503-512.

Conway, J.O., Sherwood, L.J., Collazo, M.T., Garza, J.A., Hayhurst, A., 2010. Llama single domain antibodies specific for the 7 botulinum neurotoxin serotypes as heptaplex immunoreagents. PLoS ONE 5, e8818.

Harmsen, M.M., Blokker, J.C., Pritz-Verschuren, S.B., Bartelink, W., Van der Burg, H., Koch, G., 2013. Isolation of panels of llama single-domain antibody fragments binding all nine neuraminidase subtypes of influenza A virus. Antibodies 2, 168-192.

Jahnichen, S., Blanchetot, C., Maussang, D., Gonzalez-Pajuelo, M., Chow, K.Y., Bosch, L., De Vrieze, S., Serruys, B., Ulrichs, H., Vandevelde, W., Saunders, M., De Haard, H.J., Schols, D., Leurs, R., Vanlandschoot, P., Verrips, T., Smit, M.J., 2010. CXCR4 nanobodies (VHH-based single variable domains) potentially inhibit chemotaxis and HIV-1 replication and mobilize stem cells. Proc. Natl. Acad. Sci. 107, 20565-20570.

Describe which statistical methods have been used and which other considerations have been taken into account to minimise the number of animals.

No statistical methods are used since this is not necessary. Two llamas are immunized with each antigen or mixture of antigens. Since llamas are outbred animals the diversity of the immune response is much higher when using different animals. More than 2 llamas are normally not needed (empirical evidence). Llamas are immunized with several different antigens, serving different purposes, in parallel (see previous section). This is an important way to minimise the number of animals.

## B. The animals

Specify the species, origin, estimated numbers, and life stages. Provide justifications for these choices.

Llamas (*L. glama*) are used since the methods for nanobody retrieval are well described for this species (Van der Linden et al., 2000). Llamas of at least one year old are used, since these have a sufficiently mature immune system and sufficient body weight (more than 50 kg) to assure that the blood samples taken do not cause anemia. Llamas are always housed in groups of at least two to prevent social stress. Groups of llamas are always of the same gender. Female llamas are used, since these are more amenable to handling by biotechnicians. In [REDACTED] experience female llamas react with less stress when fixated for immunization or blood collection. Non-pregnant female llamas are purchased from a conventional llama supplier in The Netherlands since there are no registered llama suppliers in the Netherlands.

[REDACTED] is currently housing a group of six female llamas that are to be (re-)used for llama immunization. In addition to this group of six llamas, which we consider part of earlier llama immunizations, we intend to immunize a total of 20 llamas in a 5-year period.

References:

Van der Linden, R., De Geus, B., Stok, W., Bos, W., Van Wassenaar, D., Verrips, T., Frenken, L., 2000. Induction of immune responses and molecular cloning of the heavy chain antibody repertoire of *Lama glama*. J. Immunol. Methods 240, 185-195.

## C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

Llamas that are re-used will get a 6 month rest period between successive immunization cycles. Re-use is done for a maximum of four immunization cycles, where each cycle consists of a series of immunizations with 3-4 week intervals.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

No

Yes> Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

#### **D. Replacement, reduction, refinement**

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Replacement: Nanobodies can only be retrieved from camelids and llamas are a suitable species for nanobody retrieval due to their relative ease of handling and well described procedures for nanobody retrieval. Good (potent, high-affinity, stable, specific) nanobodies are best retrieved from llamas immunized with the antigen of interest. In principle it is possible to retrieve antigen binding nanobodies from non-immunized animals. This is accomplished by isolating PBLs from many (>10) llamas and creating very large nanobody phage display libraries from these PBLs, resulting in so-called naïve libraries. Sometimes, further diversity can be introduced in such libraries by molecular biological techniques, resulting in synthetic naïve libraries. In general the antigen binding nanobodies isolated from such libraries are of lesser quality (potency, affinity, stability, specificity) than those isolated from immune libraries. For this reason, such approaches are only used for antigens that can not be used for immunization because they are not immunogenic or too toxic (De Meyer et al. 2014). If feasible, nanobodies are therefore preferentially retrieved by immunization of camelids.

Nurse sharks also produce a special class of single-domain antibodies that have been termed IgNAR. These, however, have a vestigial complementarity determining region 2, resulting in less diversity of antibody responses as compared to nanobodies (Stanfield et al., 2004). Also because of the difficulty in handling sharks for immunization and the higher immunogenicity of IgNAR domains upon human therapeutic use, camelids are preferred over sharks for isolation of single-domain antibodies.

Reduction: An important way to reduce animal use is to immunize llamas with multiple antigens serving different purposes in parallel, and to do repeated immunizations of llamas with novel antigen cocktails after a half-year resting period.

Refinement: In the last immunization [REDACTED] uses an adjuvant that gives less severe side reactions - Montanide IMS1312 - to reduce the secondary inflammatory reactions that are sometimes induced by the adjuvant Specol, that is used for the first two immunizations.

#### References:

De Meyer, T., Muyldermans, S., Depicker, A., 2014. Nanobody-based products as research and diagnostic tools. Trends Biotechnol 32, 263-270.

Stanfield, R.L., Dooley, H., Flajnik, M.F., Wilson, I.A., 2004. Crystal structure of a shark single-domain antibody V region in complex with lysozyme. Science 305, 1770-1773.

Explain what measures will be taken to minimise 1) animal suffering, pain or fear and 2) adverse effects on the environment.

Llamas are getting a rest period of two weeks after transport to [REDACTED] to get accustomed to the new environment and the biotechnicians before they are immunized. The biotechnicians will regularly (once a week) contact the llamas to reduce stress upon future llama handlings. Female llamas are used since these show lower stress symptoms upon llama handling.

[REDACTED] uses an adjuvant that gives less severe side reactions - Montanide IMS1312 - for the last immunization to reduce the secondary inflammatory reactions that are sometimes induced by the adjuvant Specol, that is used for the first two immunizations. The first two immunizations are done with Specol since this adjuvant has a stronger depot effect and is proven effective in llamas. Specol can induce severe secondary inflammatory reactions. However, the long experience at the [REDACTED] with Specol-adjuvanted llama immunizations suggests that the level of discomfort is less severe than described in the code of practice. This could be due to the fact that the code of practice is developed for laboratory animals and not for large farm animals.

The llamas are killed at the end of the last experiment since they still contain antigens used for llama immunization at the injection sites. Since llamas are occasionally used for human consumption such a precaution is necessary to prevent intoxication of humans with antigens used for immunization.



## Repetition and duplication

### E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is

In most instances llamas have never been immunized with the antigen of interest earlier and good nanobodies are not available against the target antigen. An advantage of llama immunization is that phage display libraries can be stored in the lab for future nanobody retrieval. Thus, when novel nanobodies are required for a particular project and a phage display library of a llama that was immunized with a highly related antigen is available then a novel llama immunization is not necessary. Such is the case for example when isolating nanobodies against a novel strain of influenza or foot-and-mouth disease virus, for which libraries derived from llamas immunized with different strains of the same serotype exist. Often conventional monoclonal antibodies already exist against the target antigen. However, for many applications, especially therapeutic applications, nanobodies offer many advantages over conventional monoclonal antibodies (see Project proposal) to justify nanobody isolation.

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

No

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

### G. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

## Classification of discomfort/humane endpoints

### H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question 1.

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

The intramuscular injection of vaccine and blood sampling from the jugular vein with a needle induces a short pain that does not require pain relieving methods. The immunization with Specol adjuvant can result in adverse secondary reactions that can include pain. Experience at the [REDACTED] with Specol-adjuvanted llama immunizations suggests that the level of discomfort is less severe than described in the code of practice, and that giving painkillers is not perse necessary.

Yes

### **I. Other aspects compromising the welfare of the animals**

Describe which other adverse effects on the animals' welfare may be expected?

The immunization with Specol adjuvant will result in adverse inflammatory reactions that can, beside pain, include itching, encapsulated granuloma and reduced appetite, that can last for several days. A total of about 380 ml blood will be collected in a 2 month period. The llamas used (at least 1-year-old) have sufficient body weight and circulating blood volume to cope with such blood sampling without developing anemia. When llamas are housed in a meadow it is possible that unforeseen diseases may develop.

Explain why these effects may emerge.

Due to housing of llamas in the field they can develop any disease that is occurring in the environment.

Indicate which measures will be adopted to prevent occurrence or minimise severity.

A veterinarian will be consulted when animals show signs of disease and a proper treatment plan will be adopted.

### **J. Humane endpoints**

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

Indicate the likely incidence.

### **K. Classification of severity of procedures**

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe').

The repeated immunization with Specol adjuvant is expected to cause most discomfort to the llamas. Specol can induce severe secondary inflammatory reactions. However, the long experience at [REDACTED] with Specol-adjuvanted llama immunizations suggests that the level of discomfort is less severe than described in the code of practice. This could be due to the fact that the code of practice is developed for laboratory animals and not for large farm animals. The overall level of discomfort is estimated as moderate.

## **End of experiment**

### **L. Method of killing**

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'signatures'.

Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

The llamas are killed at the end of the experiment since they still contain antigens used for llama immunization at the injection sites. Since llamas are occasionally used for human consumption such a precaution is necessary to prevent intoxication of humans with antigens used for immunization.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Yes



into vectors suitable for subsequent isolation of nanobodies that bind to specific antigens used for llama immunization. Most commonly these vectors are phagemids suitable for phage display selection.

---

Describe the proposed animal procedures, including the nature, frequency and duration of the treatment. Provide justifications for the selected approach.

---

The basic llama immunization procedure described here is immunization with DNA or with genetically modified microorganisms that express the antigen of interest.

Llamas are immunized by DNA immunization using plasmids commonly used for DNA immunization of mammals, such as pVR1012-derived plasmids. These encode the gene of interest controlled by the human CMV promoter/enhancer region and the bovine growth hormone polyadenylation signal. DNA immunization is done by administering 50 microgram of plasmid in 1 ml Tris-EDTA buffer intramuscularly into the neck at four spots (i.e. 0.25 ml per spot). DNA immunization is normally less effective in inducing high antibody titres, but has the advantage of being highly specific for the antigen encoded by the plasmid. DNA immunization is therefore sometimes combined with booster immunizations with proteinaceous antigens with adjuvant, which is described in animal procedure with serial number 1.

Immunization with vectored vaccines will be done with Newcastle Disease Virus (NDV) - vectored vaccines derived from the lentogenic LaSota strain (Harmsen et al., 2011) or with canarypox (ALVAC) virus (Paoletti et al., 1994). These vectors are proven effective in mammals and do not cause clinical disease signs in mammals. Both vectors do not spread in mammals and can only give some local limited replication. NDV vector vaccines are given intramuscularly in a volume of at most 5 ml without adjuvant. ALVAC vectors are given intramuscularly in a volume of at most 5 ml with Carbopol adjuvant. For llama immunization antigen cocktails are used. This can be done with as many as ten different antigens. In theory antigenic competition can decrease the immune response against particular antigens. This is often described when evaluating mixtures of antigens that protect against different diseases. However, since the aim of our experiments is not to induce high antibody titres but rather to induce sufficiently high antibody titres for nanobody retrieval, we consider antigenic competition of less importance here. There are several literature examples of successful nanobody retrieval after immunization with cocktails of proteinaceous antigens with adjuvant (Conway et al., 2010; Harmsen et al., 2013).

Since the aim of the induction of antibody responses is to retrieve antigen specific nanobodies by molecular biological techniques there is no need to induce extremely high antibody titres. This is opposed to the use of vaccines for protection of the animal against disease, where higher antibody titres are often better for protection. However, for nanobody retrieval purposes, we prefer to induce a sufficiently high immune response for successful isolation of a diverse set of nanobodies. When giving many booster immunizations to a llama one can sometimes reach higher antibody titres, but this often is accompanied by amplification of only a subset of the nanobodies that bind to only one epitope with high affinity. Such nanobodies could not be suitable for the project objective while other, more suitable, nanobodies have lower titres after the last boosters. In such a case the last boosters were detrimental to reach the project objective. Thus, we aim for a diverse antibody response that is sufficiently high for monoclonal nanobody isolation using a limited number of immunizations. In our experience three immunizations with NDV or ALVAC-vectored vaccines or four DNA immunizations are sufficient for this purpose. One week after the last immunization and often also 1 week after the penultimate immunization a large blood sample will be collected for isolation of peripheral blood lymphocytes for subsequent nanobody retrieval. For this purpose the llamas are fixated and 150 ml heparinized blood is collected from the vena jugularis without sedation.

During the immunization procedure small samples of at most 20 ml blood are collected from the vena jugularis for preparation of serum that can be used to evaluate the immunization procedure by measuring antibody titres. Serum samples are never collected more than once weekly.

#### References:

- De Meyer, T., Muyldermans, S., Depicker, A., 2014. Nanobody-based products as research and diagnostic tools. *Trends Biotechnol* 32, 263-270.
- Conway, J.O., Sherwood, L.J., Collazo, M.T., Garza, J.A., Hayhurst, A., 2010. Llama single domain antibodies specific for the 7 botulinum neurotoxin serotypes as heptaplex immunoreagents. *PLoS ONE* 5, e8818.
- Harmsen, M.M., Antonis, A., Moormann, R.J.M., Kortekaas, J., 2011. Parenteral vaccination of mammalian livestock with Newcastle disease virus-based vector

vaccines offers optimal efficacy and safety. Bioengineered Bugs 2, 1.

Harmsen, M.M., Blokker, J.C., Pritz-Verschuren, S.B., Bartelink, W., Van der Burg, H., Koch, G., 2013. Isolation of panels of llama single-domain antibody fragments binding all nine neuraminidase subtypes of influenza A virus. Antibodies 2, 168-192.

Paoletti, E., Tartaglia, J., Taylor, J., 1994. Safe and effective poxvirus vectors--NYVAC and ALVAC. Dev Biol Stand 82, 65-69.

Describe which statistical methods have been used and which other considerations have been taken into account to minimise the number of animals.

No statistical methods are used since this is not necessary. Two llamas are immunized with each antigen or mixture of antigens. Since llamas are outbred animals the diversity of the immune response is much higher when using different animals. Llamas are immunized with several different antigens, serving different purposes, in parallel (see previous section). This is an important way to minimise the number of animals.

## B. The animals

Specify the species, origin, estimated numbers, and life stages. Provide justifications for these choices.

Llamas (*L. glama*) are used since the methods for nanobody retrieval are well described for this species (Van der Linden et al., 2000). Llamas of at least one year old are used, since these have a sufficiently mature immune system and sufficient body weight (more than 50 kg) to assure that the blood samples taken do not cause anemia. Llamas are always housed in groups of at least two to prevent social stress. Groups of llamas are always of the same gender. Female llamas are used, since these are more amenable to handling by biotechnicians. In [REDACTED] experience female llamas react with less stress when fixated for immunization or blood collection. Non-pregnant female llamas are purchased from a conventional llama supplier in The Netherlands since there are no registered llama suppliers in the Netherlands.

We intend to immunize a total of 4 llamas in a 5-year period.

References:

Van der Linden, R., De Geus, B., Stok, W., Bos, W., Van Wassenaar, D., Verrips, T., Frenken, L., 2000. Induction of immune responses and molecular cloning of the heavy chain antibody repertoire of *Lama glama*. J. Immunol. Methods 240, 185-195.

## C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

No

Yes > Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

## D. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Replacement: Nanobodies can only be retrieved from camelids and llamas are a suitable species for nanobody retrieval due to their relative ease of handling and well described procedures for nanobody retrieval. Good (potent, high-affinity, stable, specific) nanobodies are best retrieved from llamas immunized with

the antigen of interest. In principle it is possible to retrieve antigen binding nanobodies from non-immunized animals. This is accomplished by isolating PBLs from many (>10) llamas and creating very large nanobody phage display libraries from these PBLs, resulting in so-called naïve libraries. Sometimes, further diversity can be introduced in such libraries by molecular biological techniques, resulting in synthetic naïve libraries. In general the antigen binding nanobodies isolated from such libraries are of lesser quality (potency, affinity, stability, specificity) than those isolated from immune libraries. For this reason, such approaches are only used for antigens that can not be used for immunization because they are not immunogenic or too toxic (De Meyer et al. 2014). If feasible, nanobodies are therefore preferentially retrieved by immunization of camelids.

Nurse sharks also produce a special class of single-domain antibodies that have been termed IgNAR. These, however, have a vestigial complementarity determining region 2, resulting in less diversity of antibody responses as compared to nanobodies (Stanfield et al., 2004). Also because of the difficulty in handling sharks for immunization and the higher immunogenicity of IgNAR domains upon human therapeutic use, camelids are preferred over sharks for isolation of single-domain antibodies.

Reduction: An important way to reduce animal use is to immunize llamas with multiple antigens serving different purposes in parallel.

#### References:

De Meyer, T., Muyldermans, S., Depicker, A., 2014. Nanobody-based products as research and diagnostic tools. Trends Biotechnol 32, 263-270.

Stanfield, R.L., Dooley, H., Flajnik, M.F., Wilson, I.A., 2004. Crystal structure of a shark single-domain antibody V region in complex with lysozyme. Science 305, 1770-1773.

---

Explain what measures will be taken to minimise 1) animal suffering, pain or fear and 2) adverse effects on the environment.

Llamas are getting a rest period of two weeks after transport to ████████ to get accustomed to the new environment and the biotechnicians before they are immunized. The biotechnicians will regularly (once a week) contact the llamas to reduce stress upon future llama handlings. Female llamas are used since these show lower stress symptoms upon llama handling.

## Repetition and duplication

### E. Repetition

---

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is

Often conventional monoclonal antibodies already exist against the target antigen. However, for many applications, especially therapeutic applications, nanobodies offer many advantages over conventional monoclonal antibodies (see Projectvoorstel) to justify nanobody isolation.

In most instances llamas have never been immunized with the antigen of interest earlier and good nanobodies are not available against the target antigen.

An advantage of llama immunization is that phage display libraries can be stored in the lab for future nanobody retrieval. Thus, when novel nanobodies are required for a particular project and a phage display library of a llama that was immunized with a highly related antigen is available then a novel llama immunization is not necessary. Such is the case for example when isolating nanobodies against a novel strain of influenza or foot-and-mouth disease virus, for which libraries derived from llamas immunized with different strains of the same serotype exist.

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

---

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

No

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

### **G. Location where the animals procedures are performed**

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

## **Classification of discomfort/humane endpoints**

### **H. Pain and pain relief**

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question 1.

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

The intramuscular injection of vaccine and blood sampling from the jugular vein with a needle induces a short pain that does not require pain relieving methods. The immunization with Carbopol adjuvant can induce pain.

Yes

### **I. Other aspects compromising the welfare of the animals**

Describe which other adverse effects on the animals' welfare may be expected?

The llamas are housed in contained facilities since they are immunized with plasmids or genetically modified organisms. The immunization with Carbopol adjuvant will result in adverse reactions: itching, pain and reduced appetite, that can last for several days. However, the effects of this adjuvant are not as severe as with oil emulsion adjuvant. A total of about 380 ml blood will be collected in a 2 month period. The llamas used (at least 1-year-old) have sufficient body weight and circulating blood volume to cope with such blood sampling without developing anemia.

Explain why these effects may emerge.

According to GMO regulation llamas must be housed in contained facilities to prevent spread of genetically modified organisms into the environment.

Indicate which measures will be adopted to prevent occurrence or minimise severity.

Llamas receive adequate housing facilities.

### **J. Humane endpoints**

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.



Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

Indicate the likely incidence.

### **K. Classification of severity of procedures**

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe').

The llamas are housed in contained facilities. As a result they have limited ability to walk around and cannot graze. Sometimes an adjuvant is used in vectored-immunization, which does not give as severe side reactions as oil-emulsion adjuvants. The overall level of discomfort is estimated as moderate.

## **End of experiment**

### **L. Method of killing**

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'signatures'.

Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

The llamas are killed at the end of the experiment since they cannot be introduced into the environment after immunization to prevent spread of genetically modified organisms into the environment.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Yes




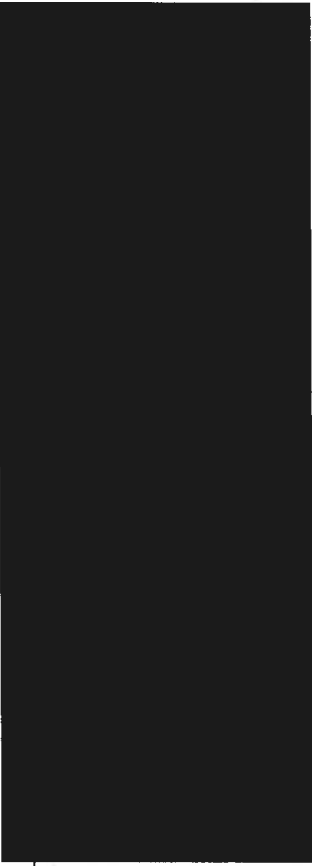


Centrale Commissie Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag

Geachte heer, mevrouw,

Onderstaand het advies van de DEC aangaande het project "Induction of antibody responses in llamas for isolation of specific antigen binding recombinant antibody fragments derived from heavy-chain antibodies (nanobodies)",

#### A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: 
2. Titel van het project: Induction of antibody responses in llamas for isolation of specific antigen binding recombinant antibody fragments derived from heavy-chain antibodies (nanobodies)
3. Titel van de NTS: Opwekken van een antigeen-specifieke immuunrespons in lama's om specifieke afweerstoffen te isoleren tegen antigenen
- 4.
5. Type aanvraag: nieuwe aanvraag projectvergunning
6. Contactgegevens 
7. Adviestraject  
Ontvangen door DEC: 19-02-2015  
In vergadering besproken : 20-02-2015
8. Correspondentie met de aanvrager  
Datum vragen: 23-02-2015  
Strekking van de vragen:
  - De DEC heeft een aantal suggesties gedaan voor tekstuele verbeteringen
  - De DEC heeft vragen gesteld over:
    - o de begrenzing van het doel van het project
    - o het maximum aantal keren dat een dier hergebruikt kan worden
    - o het mogelijke gebruik van pijnstillers
    - o ongerief door reactie op de immunisatiesDatum antwoorden: 24-02-2015  
Strekking van de antwoorden:
  - Er zijn tekstuele wijzigingen doorgevoerd
  - op vragen van de DEC:
    - o het doel van het project is beter afgebakend
    - o op proefplan niveau zal uitgewerkt worden of het mogelijk is om het aantal keren hergebruik te vergroten zonder dat het

ongerief van de dieren substantieel toeneemt, maar waardoor het aantal te gebruiken dieren kan afnemen

- o op proefplanniveau zal het gebruik van pijnstillers uitgewerkt worden
- o ongerief door reactie op de immunisaties is verduidelijkt.

De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

### **B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)**

1. De DEC heeft vastgesteld dat het project vergunningplichtig is (dierproeven in de zin der wet)
2. De aanvraag is een nieuwe aanvraag
3. De DEC is competent om over de aanvraag te adviseren vanuit het oogpunt van onafhankelijkheid, onpartijdigheid en beschikbare expertises.

### **C. Beoordeling (inhoud)**

1. De DEC heeft vastgesteld dat het project uit wetenschappelijk oogpunt en vanuit het oogpunt van productledoelinden verantwoord is.
2. De DEC heeft vastgesteld dat de in de aanvraag aangekruiste doelcategorie in overeenstemming is met de hoofddoelstelling.
3. Het reële belang van het project, te weten het verkrijgen van een specifiek type antilichamen (nanobodies) voor humane en veterinaire diagnostiek of therapie, wordt door de DEC onderschreven.
4. De DEC stelt vast dat de expertise van de onderzoekers, de voorzieningen waar de experimenten uitgevoerd worden en de onderzoeksstrategie kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling van het project.
5. De proeven kunnen alleen uitgevoerd worden met lama's en die kunnen niet van een geregistreerde instelling worden betrokken. Bij een deel van de proeven (indien er gewerkt wordt met GGO's) moeten de dieren achter een barrière gehuisvest worden en is hergebruik niet mogelijk. Het gebruik van GGO's als vector is soms onderdeel van de ontwikkeling van vaccins. Er kan in sommige experimenten sprake zijn van hergebruik onder bepaalde voorwaarden. Ook zal gekeken worden of pijnbestrijding toegepast kan worden om tot verdere verfijning te komen.
6. De DEC stelt vast dat een cumulatieve inschatting van ongerief als "moderate" realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Ongerief in de experimenten zal bestaan uit hanteren, inspuiten, reactie op de immunisatie en bloedafname. Bij een deel van de proeven (indien er gewerkt wordt met GGO's) kunnen de dieren niet op conventionele wijze gehuisvest worden. Om in het welzijn van de dieren tegemoet te komen wordt in de dierverblijven kooiverrijking aangeboden en wordt er naar gestreefd eventuele stress te verminderen door de dieren vertrouwd te maken met de dierverzorgers.
7. De DEC heeft vastgesteld dat er geen alternatieven zijn om de doelstelling van het project te realiseren. Synthetisch vervaardigde nanobodies geven veel minder bruikbare resultaten.
8. De DEC heeft vastgesteld dat er optimaal tegemoet gekomen wordt aan de vereiste van vermindering van dierproeven. Er ligt geen statistische onderbouwing ten grondslag aan het aantal van twee dieren per experiment. Omdat uit ervaring is gebleken dat 1 dier vaak onvoldoende is voor een gewenste diversiteit in de immunreactie moet een experiment met 2 dieren uitgevoerd worden en meer dieren blijkt niet nodig. Het aantal dieren voor het gehele project is realistisch ingeschat op basis van ervaringen in het verleden en de te verwachten vraag van opdrachtgevers. De DEC heeft de onderzoeker meegegeven om te onderzoeken of hergebruik van dieren meer dan 3 keer in bepaalde gevallen wetenschappelijk en vanuit welzijnsoogpunt acceptabel is. Dit zou kunnen leiden tot een verdere vermindering van het aantal proefdieren. De aanvrager beschikt over voldoende expertise om te voorkomen dat eerder gedaan onderzoek herhaald wordt.

- [REDACTED]
9. De DEC heeft vastgesteld dat het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven. Het dierenwelzijn wordt geborgd door dieren te huisvesten op een wijze die zo veel mogelijk tegemoet komt aan de natuurlijke behoeften van de dieren en door kooiverrijking indien plaatsing in een weide niet toegestaan is. De DEC is overtuigd dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.

De DEC heeft de onderzoeker gevraagd om te bestuderen of het gebruik van pijnstilling een verdere vermindering van het ongerief zou kunnen opleveren. Er is geen sprake van belangwekkende milieu effecten.

10. De NTS is naar het oordeel van de DEC een evenwichtige weergave van het project, begrijpelijk geformuleerd en voldoet aan de vereisten in de herziene Wod Art. 10.a.1.7.

#### **D. Ethische afweging**

- De DEC is unaniem van mening dat het doel van het project het gebruik van proefdieren en het ongerief dat de dieren wordt aangedaan rechtvaardigt. Dit project kan een bijdrage leveren aan de ontwikkeling van humane en veterinaire medicijnen en diagnostische testen. Voor dit project zijn geen alternatieven beschikbaar. De uitvoering is verder niet in strijd met andere ethische overwegingen m.b.t. het gebruik van proefdieren.

#### **E. Advies**

De DEC adviseert unaniem om de vergunning te verlenen.

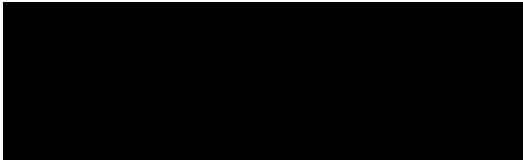
Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

secretaris DEC



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

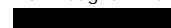


**Centrale Commissie Dierproeven**

Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
www.zbo-ccd.nl

T 0900-2800028 (10 ct /min)  
info@zbo-ccd.nl

**Onze referentie  
Aanvraagnummer**



Datum 13 april 2015  
Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

**Bijlagen**  
1

Geachte heer/mevrouw,

Op 13 maart 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Induction of antibody responses in llamas for isolation of specific antigen binding recombinant antibody fragments derived from heavy-chain antibodies (nanobodies)" met aanvraagnummer [redacted]. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

**Beslissing**

Wij keuren uw aanvraag goed, onder de in de vergunning opgenomen voorwaarden, op grond van artikel 10a, lid 3, van de Wet op de dierproeven (hierna de wet). U kunt met uw project "Induction of antibody responses in llamas for isolation of specific antigen binding recombinant antibody fragments derived from heavy-chain antibodies (nanobodies)" starten. De vergunning wordt afgegeven van 13 april 2015 tot en met 1 april 2020.

**Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de dierexperimentencommissie [redacted] gevoegd. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a lid 3 van de wet. Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de dierexperimentencommissie. Wij nemen dit advies van de commissie over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet zijn de grondslag van dit besluit.

**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 20401, 2500 EK 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. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige

**Datum**

13 april 2015

**Onze referentie**

Aanvraagnummer

voorziening vragen bij de Voorzieningenrechter van de rechtbank in de woonplaats van de aanvrager. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisend belang.

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 aanvrager valt.

**Meer informatie**

Heeft u vragen, kijk dan op [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Het Bestuur van de Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:

ir. G. de Peuter  
Algemeen Secretaris

Dit besluit is genomen met inachtneming van het Besluit mandaat, volmacht en machtiging van de Centrale Commissie Dierproeven CCD 2014 zoals het bestuur van de Centrale Commissie Dierproeven heeft vastgesteld op 19 december 2014, ref 2014-04 en is gepubliceerd in de Staatscourant van 2 januari 2015, Nr. 163

**Bijlagen**

- Vergunning

- Hiervan deel uitmakend:
- Projectvoorstel
  - Niet-technische samenvatting
  - DEC-advies

# Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam:

Adres:

Postcode en woonplaats:

Deelnemersnummer:

deze projectvergunning voor het tijdvak 13 april 2015 tot en met 1 april 2020 voor het project "Induction of antibody responses in llamas for isolation of specific antigen binding recombinant antibody fragments derived from heavy-chain antibodies (nanobodies)" met aanvraagnummer [REDACTED], volgens advies van Dierenexperimentencommissie [REDACTED].

De verantwoordelijk onderzoeker is wetenschappelijk medewerker.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 13 maart 2015.
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij brief op 13 maart 2015;
  - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij brief op 13 maart 2015.
  - c. Advies van dierenexperimentencommissie d.d. 3 maart 2015 ontvangen op 13 maart 2015.

## Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst	Voorwaarden
Immunization of llamas housed in a meadow for retrieving nanobodies	Lama (Lama glama)	16	Matig	De humane eindpunten moeten worden vastgelegd in overleg met de Instantie voor Dierenwelzijn voordat het project gestart wordt.
Immunization of llamas housed in contained stables for retrieving nanobodies	Lama (Lama glama)	4	Matig	De humane eindpunten moeten worden vastgelegd in overleg met de Instantie voor Dierenwelzijn voordat het project gestart wordt.

## 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. Uit artikel 10b 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 de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.

Artikel 10b schrijft 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 van Economische Zaken 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

**Datum**  
13 april 2015

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer

██████████

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 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 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 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 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 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.