

Inventaris Wob-verzoek W15-11									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTS 2015104								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Niet-technische samenvatting	x							
3	Projectvoorstel			x					
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1			x					
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2			x					
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3 oud			x					
7	Bijlage beschrijving dierproeven 4 oud			x					
8	Bijlage beschrijving dierproeven 5 oud			x					
9	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
10	Vervolgbrief aanvraag				x		x	x	
11	Verzoek DEC-advies				x		x	x	
12	DEC-advies				x		x	x	
13	Brief antwoorden				x		x	x	
14	Bijlage beschrijving dierproeven 3 nieuw			x					
15	Bijlage beschrijving dierproeven 4 nieuw			x					
16	Bijlage beschrijving dierproeven 5 nieuw			x					
17	Table of groups			x					
18	Advies CCD		x						x
19	Beschikking en vergunning				x		x	x	
20	Mail ontvangstbevestiging 22-5-2015				x		x	x	
21	Mail DEC aanpassing 5-6-2015				x		x	x	
22	Mail aanpassing tekst 11-6-2015				x		x	x	
23	Mail DEC aanpassing 12-6-2015				x		x	x	
24	Mail dubbele betaling 18-6-2015				x		x	x	



26 MEI 2015

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 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 80101 [redacted] KNAW <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen															
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table><tr><td>Naam instelling of organisatie</td><td>KNAW</td></tr><tr><td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td><td>[redacted]</td></tr><tr><td>KvK-nummer</td><td>5 4 6 6 7 0 8 9</td></tr></table>	Naam instelling of organisatie	KNAW	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[redacted]	KvK-nummer	5 4 6 6 7 0 8 9									
Naam instelling of organisatie	KNAW																
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[redacted]																
KvK-nummer	5 4 6 6 7 0 8 9																
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>	<table><tr><td>Straat en huisnummer</td><td></td></tr><tr><td>Postbus</td><td>Postbus 19121</td></tr><tr><td>Postcode en plaats</td><td>1000GC Amsterdam</td></tr><tr><td>IBAN</td><td>NL33DEUT0546900054</td></tr><tr><td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td><td>[redacted]</td></tr></table>	Straat en huisnummer		Postbus	Postbus 19121	Postcode en plaats	1000GC Amsterdam	IBAN	NL33DEUT0546900054	Tenaamstelling van het rekeningnummer	[redacted]					
Straat en huisnummer																	
Postbus	Postbus 19121																
Postcode en plaats	1000GC Amsterdam																
IBAN	NL33DEUT0546900054																
Tenaamstelling van het rekeningnummer	[redacted]																
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[redacted]</td><td><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>Group Leader</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>Group Regeneration of Sensory-Motor Systems</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>[redacted]</td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>[redacted]</td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters	[redacted]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie	Group Leader		Afdeling	Group Regeneration of Sensory-Motor Systems		Telefoonnummer	[redacted]		E-mailadres	[redacted]	
(Titel) Naam en voorletters	[redacted]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.															
Functie	Group Leader																
Afdeling	Group Regeneration of Sensory-Motor Systems																
Telefoonnummer	[redacted]																
E-mailadres	[redacted]																
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[redacted]</td><td><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>Biotechnicus</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>Group Regeneration of Sensory-Motor Systems</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>[redacted]</td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>[redacted]</td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters	[redacted]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie	Biotechnicus		Afdeling	Group Regeneration of Sensory-Motor Systems		Telefoonnummer	[redacted]		E-mailadres	[redacted]	
(Titel) Naam en voorletters	[redacted]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.															
Functie	Biotechnicus																
Afdeling	Group Regeneration of Sensory-Motor Systems																
Telefoonnummer	[redacted]																
E-mailadres	[redacted]																

- 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 Dhr. 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 7 . 2 0 1 5
- Einddatum 0 1 . 0 7 . 2 0 2 0
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Developing strategies to promote repair or plasticity of the central and peripheral
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Ontwikkeling van strategieën om de regeneratie van zenuwweefsel te bevorderen
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC DEC-KNAW
- Postadres Amsterdam
- E-mailadres

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 741,00 Lege
 Wijziging € Lege
- 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.
- Via een eenmalige incasso
 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 Machtiging
- Appendixen 5 maal


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:

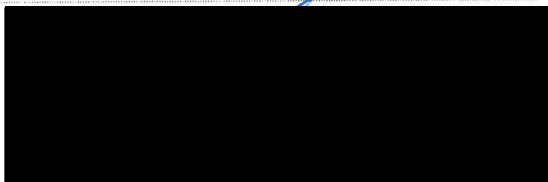
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
- dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan 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 

Functie Directeur Instituten KNAW

Plaats Amsterdam

Datum 18 - 05 - 2015

Handtekening 



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).
- 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
- 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

3 General description of the project

3.1 Background

Describe the project (motivation, background and context) with respect to the categories selected in 2.

- For legally required animal procedures, indicate which statutory or regulatory requirements apply (with respect to the intended use and market authorisation).
- For routine production, describe what will be produced and for which uses.
- For higher education or training, explain why this project is part of the educational program and describe the learning targets.

Dysfunction of the brain or spinal cord (collectively referred to as the central nervous system [CNS]) or of the peripheral nervous system (PNS) due to neural degeneration or traumatic injury affects millions of people worldwide and has a significant physical, emotional, and socio-economical impact. There are many different causes for neural degeneration or injury ranging from genetic causes, toxic insults, traffic and sports-related incidents, community violence and work-related incidents. Nervous system degeneration primarily entails the death of specific populations of neurons themselves (e.g. the loss of dopaminergic neurons in patients with Parkinson's disease) and/or the interruption of nerve projections and the associated loss of synaptic contacts (e.g. in patients with brain, spinal cord or peripheral nerve injury). When nerve cells are lost, these cells are not replaced by new cells (as opposed to cells in many other organs). In the CNS damaged, interrupted nerve tracts normally do not regrow, while in the PNS injured nerve tracts do regrow but only to some extent and after severe lesions most nerve fibers do not re-innervate the target. The failure to regenerate is due to the induction of the expression of growth inhibitory factors, for instance at the site of the injury (in the neural scar formed after a CNS lesion), and the lack of the production of pro-regenerative molecules (e.g. neurotrophic factors or transcription factors). In the injured CNS the balance shifts to growth inhibition and, therefore, regeneration is very poor in the CNS. However, some recovery of function may occur due to the induction of growth of intact neighboring axon pathways. This process is usually referred to as plasticity and is also an important mechanism for partial recovery of function and repair. In the PNS the situation is slightly better than in the CNS, e.g. Schwann cells in an injured peripheral nerve do support nerve fiber growth, but after longer times of denervation these cells deteriorate and do not support growth anymore.

Currently there are no effective treatments for patients that have sustained injury to the CNS. For instance, Parkinson patients are treated pharmacologically with L-DOPA to supplement the loss of dopamine. This treatment temporally alleviates some of the symptoms of the disease but it is not a regenerative treatment. Patients with a lesion of the PNS can be treated by a neurosurgeon, however, regeneration and functional recovery of a nerve following surgical intervention is almost never complete. Therefore, what is urgently needed is more fundamental knowledge on (i) which molecules and genes determine the loss of neurons, (ii) which factors control in the outgrowth of neuronal projections, and (iii) which factors limit the regeneration of injured neurons. This knowledge will be tested for their potential to be used as genuine regenerative treatments that (1) promote neuronal survival in order to prevent neurons from degeneration, (2) promote nerve fiber outgrowth and the formation of new synaptic connections of lesioned or spared nerve tracts by adding growth promoting factors or the removal of inhibitory factors. We focus our research both on genuine regeneration of injured nerve tract and on structural remodeling of spared nerve tracts (also referred to in the field as structural plasticity) because structural remodeling of the intact fibers may also have a significant positive impact on functional recovery. For many of our project we have used human nervous tissue as the starting material of our screens and as tissue to start to refine our gene transfer methods.

There is general agreement in the research field of neurodegeneration and regeneration that the current neurosurgical intervention strategies have reached optimal refinement. Therefore these interventions will not lead to the level of repair that is required for patients with nervous system injury to allow a return to a normal life. Hence the long-term aim of the research in this field should be on developing effective regenerative treatments. For this it is essential to identify factors (genes, molecules, cell types) that are pivotal in the survival of neurons, the regeneration of injured nerve projections and the formation of new synapses. We and others have already identified two cell types [*Schwann cells (SCs) and Olfactory ensheathing glia cells (OEGs)*; reviewed in *Roet and Verhaagen, Experimental Neurology 2014*] and several molecules that either promote neuronal survival, axon regeneration or plasticity [*growth factors, wnts, transcription factors*; reviewed in *Fagoe et. al. 2014*] or hamper axon regeneration or plasticity [*extracellular matrix molecules, e.g. semaphorins*; reviewed in *Mecollari et. al. Frontier in Neuroscience 2014*]. Some of these cell types and factors have subsequently been tested for their neuroprotective or growth-promoting effects in lesion models in experimental animals. Specific examples of work from our own laboratory include the profound pro-regenerative effect of transplanted, genetically modified, OEGs in a spinal cord lesion (*Ruitenberget al. Journal of Neuroscience 2003*), of the growth factor BDNF on the survival of rubrospinal neurons (*Ruitenberget al Neurobiology of Disease 2004*) and of the growth factor GDNF on motor axon outgrowth (*Eggers et. al. Molecular Cellular Neuroscience 2008, Hoyng et. al. Experimental Neurology 2014a*). Recent, as yet unpublished, discoveries from our group include the observation that the signaling molecule Wnt5a promotes nerve fiber outgrowth (*van Vliet, unpublished*) and that functional neutralisation of Semaphorin3A (a molecule obstructing regeneration) promotes repair of the injured spinal cord (*Mecollari, unpublished*) and enhances plasticity in the brain (*Vo et. al. Molecular and Cellular Neuroscience 2013, and unpublished observations in collaboration with Daniela Carulli and Tommaso Pizzuroso, Italy*). Moreover we have identified molecules that induce degeneration of neurons, specifically the dopaminergic neurons that die in Parkinson's disease (*Bossers et al Brain Pathology 2009; Korecka and Moloney et al unpublished*).

As a means to express pro-regenerative molecules in damaged neural tissue in order to study their functional involvement, we have developed advanced and innovative gene transfer strategies (based on adeno-associated and lentiviral vectors, some of which have clinical potential; reviewed in *Mason et.al. Current Gene Therapy 2011*). Gene transfer with viral vectors is chosen as a primary approach because it is a very powerful method to locally express a gene and study its function in the injured nervous system. Moreover eventually this strategy may be applicable clinically since in the last 10 years an the adeno-associated viral (AAV) vector has gained increasing acceptance as a clinical gene therapy platform. Viral vector-mediated gene transfer was optimized for gene transfer in injured neurons by testing which serotype (*Mason et.al. Molecular Therapy 2010, Blits et.al. J. Neuroscience Methods 2011; Korecka et. al. Viral vectors 2011*) and route of delivery (*Fagoe et.al. Neuromethods 2015*) was the best. In addition, we also combined tissue transplantation with gene transfer e.g. in a study where we used genetically modified nerve autografts to repair injured peripheral nerves (*Hoyng et.al. Experimental Neurology 2014*). Although gene therapy is in our view a very powerful way to study gene function, it may also be a clinically applicable strategy to promote repair the use of small molecules (inhibitors, agonist; that is pharmacological intervention). This is certainly an option that we want to pursue if this would be more rational.

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 main aim of this project is to unravel the fundamental cell and molecular biological mechanisms that underlie the failure of the nervous system to repair itself. Specifically the project aims to identify molecules that promote or inhibit the neuroregeneration process, to overexpress or neutralize these molecules and to study the effects of these interventions on the recovery process.

The laboratory and scientific infrastructure needed is available at the Netherlands Institute for Neuroscience which makes this research highly feasible. In addition to the scientific achievements of the group summarized above, the group has a long-term internationally recognized track record in

neuroregeneration research. This is illustrated by the fact that the group published over 190 papers on this topic, received national and international funding and was positively evaluated by the KNAW-audit committee in 2012. The group has been part of several European consortia and has international collaborations with groups in e.g. Cambridge, Turin, and Perth.

Taken together, and based on the available data, know-how, and infrastructure as summarized above, we expect that in the next five years it will be realistic to firmly establish the role of at least three and perhaps six new molecular targets in the neural repair process. We also collaborate with clinicians, e.g. at the department of neurosurgery at the LUMC, to allow translation of our research to the clinic.

3.3 Relevance

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

This project is important for two reasons: 1. It results in fundamental insights into the mechanisms that inhibit or promote regeneration, and 2. These results form the basis for repair strategies that will eventually be applied to promote repair in patients.

Apart from pharmacological treatment (e.g. with L-DOPA in Parkinson patients which results in temporary relief of symptoms) or neurosurgical repair of an injured peripheral nerve (which results mostly in only partial recovery of function) there are no effective treatments available for patients with nervous system degeneration/injury. Individuals with neural injury therefore suffer from a life-long disability and many are usually dependent on outside care and/or are bound to a wheelchair. There is an urgent need for treatments that promote nervous system repair and full functional recovery.

In the current project we develop strategies that have the aim to promote neuroprotection and/or neuroregeneration with the long-term goal to lead to medically applicable treatment options for patients with brain, spinal cord or peripheral nerve injuries. These regenerative treatments will be beneficial for individual patients and for society as a whole because effective treatments may allow patients to rehabilitate and improve their quality of life.

3.4 Research strategy

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

To achieve the aims described above we make use of a four step strategy (our "target discovery pipeline") developed by us that includes (1) large gene expression and proteomics screens on control (non-damaged) or damaged human neural tissue or on control and damaged tissue of experimental animals to identify molecules involved in the neural repair process, (2) bioinformatical analysis of the resulting gene and protein data sets in combination with published datasets to identify the most promising targets, (3) to perform bioassays for neuronal survival, axon outgrowth and synapse formation to confirm a functional role of the identified candidate targets using primary neural cells, and finally (4) gene and cell therapy studies in (transgenic) animal models of neurodegeneration and injury to test the mechanism of action and/or effectiveness of a final set of most promising targets. For this, we have developed and tested advanced viral vector-mediated gene transfer technology that allows us to express genes in vivo in injured neurons or glia cells. We are also in the process of developing regulatable viral vectors that are based on a novel immune-inert transactivator that allows antibiotic-mediated control over transgene expression in vivo (Hoyng et al Experimental Neurology 2014b). Our approach has shown to result in valuable fundamental knowledge and form the foundation for novel, potential repair strategies in patients.

Thus, the overall strategy of this project consists of a number of distinct steps aiming at target discovery for neural protection and repair using molecular screens and bioinformatics from published data sets and from data obtained from our own models (procedure 3.4.4.1), target validation in vitro by means of

bioassays (procedure 3.4.4.2), and investigation of target efficacy in vivo in (transgenic) animal models (procedures 3.4.4.3; 3.4.4.4; 3.4.4.5) of neural degeneration and regeneration. We refer to this strategy as our "target-discovery strategy". Below we will describe how we execute each of these steps and what is required in terms of types of animal experiments.

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.

Molecular screens. The first step in our target finding approach are molecular screens, using microarray or RNA-sequencing, which are performed on unaffected control neural cells and on injured neural cells. The comparison yields insights into the molecular differences between intact, non-injured neural cells and injured neural cells. This step is performed on several different sources of tissue, including human nervous system tissue obtained from the Netherlands Brain Bank, from the operation theatre (both do not require experimental animals), or from tissue obtained from experimental animals after a lesion of e.g. a spinal cord or a peripheral nerve lesion or from transgenic animals. Animal experiments are needed to obtain tissue from animals with or without a neural lesion (procedure 3.4.4.1; for neural lesions see "injury models" below).

Bioassays. Bioassays are essential for two reasons. First, the molecular screens usually result in many different interesting targets and only the most promising molecules need to be selected for testing in injury models. We have large-scale bioassays to measure the effect of overexpression or knockdown of target on e.g. neuronal survival and axon outgrowth, two processes directly relevant to neuroprotection and repair. Second, viral vectors used for gene transfer have to be tested for efficacy on primary neurons or glia cells before any application in vivo. For both applications we need to culture primary neurons or glia cells derived from rat or mouse embryo's or adult mice or rats (procedure 3.4.4.2).

Injury models. It is important to test our targets under different circumstances because certain parts of the nervous system regenerate to a certain extent (e.g. the peripheral nerve) while other parts (the spinal cord) do hardly regenerate. Therefore we need different types of injury. The efficacy of a selected target is determined either in an animal model for neural injury (in case we expect an effect on the regeneration process) or in a naïve animal (in case we hypothesize that a molecular target is involved in neurodegeneration or synapse loss as is e.g. the case for some chemorepulsive proteins). The lesion is produced e.g. by means of transection of a nerve tract in the spinal cord (e.g. the dorsal column or the corticospinal tract) or transection of a peripheral nerve. Type of animal experiment: lesioning of the brain, spinal cord or peripheral nerve is part of procedures 3.4.4.3, 3.4.4.4, 3.4.4.5.

Viral vector or cell-mediated gene delivery of a target. Targets identified in the molecular screens and functionally validated in bioassays are delivered to the nervous system by means of viral vectors (direct in vivo gene transfer) or by means of cell transplants that have been exposed to a viral vector in vitro ("ex vivo gene transfer"). The animal experiment required here is: Stereotactic injection of a viral vector or of cells in a specific brain nucleus, in the spinal cord, in a spinal ganglion, or in the peripheral nerve or the muscle. The chosen injection site is dependent on the specific target and on the goal of the experiment (procedures 3.4.4.3 - functional and histological analysis). Moreover we need to test the performance of most new produced batches of viral vectors in vivo on a small number of animals (procedure 3.4.4.4).

In the ideal situation, the efficacy of the viral vector or cell-mediated gene delivery of a target will be carried out in one of the injury models to test the effect of a selected target on neuronal degeneration or regeneration. However, for some experiments WT or transgenic mice may be used, for instance when a target is implicated in neuronal degeneration or neuroplasticity. To test the effects of the application of a target two main read-out parameters are used in parallel: functional and morphological tests (part of procedure 3.4.4.4).

Functional analysis. The efficacy of a treatment may be evaluated by means of electrophysiological and/or functional approaches. With electrophysiology, the return of compound motor action potentials (CMAPs) and spinal evoked potentials are evaluated in time after the injury. Functional behavioral tests include the narrow beam test, gridwalk test, grip test, open field test, rope test, cylinder test, pole jump test, kinematic gait analysis test, catwalk gait analysis and foot flick test (part of procedure 3.4.4.3.).

Morphological analysis. For this, tissue for histological analysis is obtained following perfusion fixation of an experimental animal at different times after inflicting the injury. The efficacy of a particular treatment or target is analyzed at the level of cell survival, degree of axon outgrowth, scar formation and synapse formation. Type of animal experiment: Perfusion of rats and mice. (part of procedure 3.4.4.3.).

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.

In this project we identify and characterize target molecules that promote or inhibit repair of the CNS or PNS using bioassays and in vivo models. Some targets have been identified based on previous discoveries by ourselves or of others, e.g. we work on a number of growth factors (NGF, BDNF, GDNF) and repulsive guidance molecules (Semaphorins) in the context of regeneration, structural plasticity and synapse formation. The "target discovery strategy" described above has already served to identify a number of new targets by ourselves. Typically, this pipeline consist of 4 steps that logically follow each other and progresses from "target identification" to "efficacy studies" in an animal model. For each target a go/no go decision is made whether or not the target should be studied at the next step. Primary target identification is based on human tissue obtained from the Netherlands Brain Bank or from the operation theatre obtained in collaboration with neurosurgeons. In some cases we perform genome wide gene expression studies on tissue from (transgenic) mice or rats using our injury models.

The logical structure of these different phases is best illustrated by an example from our recent research: Step 1/2: screening (step 1) and bioinformatics (step 2) - the protein Wnt5a was selected from a small group of highly upregulated molecules in a screen of injured human peripheral nerve tissue that was removed by the neurosurgeon during a nerve repair operation. Step 3: The effect of Wnt5a upregulation was studied in primary neuronal cell cultures and we found that Wnt5a significantly promotes neurite outgrowth. Therefore, Wnt5a was taken to step 4: testing of the effect of Wnt5a overexpression in vivo in a rat peripheral nerve injury model using both functional and histological read-outs. Moreover, in a Wnt5a knock-out mice introduced in the Netherlands Institute for Neuroscience from a group in Japan (Hiroaki Honda, Hiroshima University) we are currently studying in vivo effects of Wnt5a on axon regeneration. Taken together, for each target go/no go decisions are made based on the performance in each specific stage of the project as illustrated above for Wnt5a.

It is important to note, that there is some overlap between the animal studies described in this project and those in earlier DEC-approved protocols. After a license for this project has been obtained, all experiments will formally be executed under this new license.

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	Molecular screens: Sacrifice of mice or rats following a lesion and/or intervention with a viral vector to obtain neural tissue for molecular screens
2	Ex vivo bioassays: Sacrifice of embryos of mice or rats or of adult mice or rats to obtain tissues for cell culture and bioassays
3	Injury models (functional and histological analysis): Injection of cells or viral vectors in lesioned animals
4	Testing of the quality of viral vector batches
5	Monitoring and testing of novel genetically modified mice
6	
7	
8	
9	
10	



Appendix Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website (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'. NVWA 80101
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. Netherlands Institute for Neuroscience
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| # 1 | Molecular screens: Sacrifice of mice or rats following a lesion and/or intervention with a viral vector to obtain neural tissue for molecular screens |
- Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

A primary aim of our research is to unravel new mechanisms that govern or hamper neuroregeneration or neuroplasticity. To achieve this we perform, in addition to analysis of patient material, molecular screens on neural tissue after a lesion to identify or mechanistically validate molecules that are potentially involved in the regeneration process or in the processes that hamper regeneration.

The brain, spinal cord or peripheral nerve lesions will be performed by means of well-established neurosurgical procedures. The types of lesion are chosen because they represent clinically relevant injuries. In different parts of the CNS different processes underlie degeneration and regeneration and it is therefore important to study different parts of the CNS (brain, spinal cord, spinal ganglion, peripheral nerve) and innervated target muscles. In some instances we will perform a lesion and inject a viral vector encoding for a gene of interest ("a target") or a molecule of interest (e.g. a transcription factor, Wnt5a or Semaphorin3A). At a particular post-lesion interval animals will be killed and tissue will be dissected out for a molecular screen, e.g. a microarray screen, RNA-sequencing or proteomics analysis. This specific aim is to provide quantitative insight in the changes in mRNA or protein levels that occur in neural tissue after a lesion and/or after applying a specific treatment (e.g. viral vector-mediated gene transfer of a specific target gene).

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

This procedure can consist of the following steps:

- 1) *Application of a lesion to the brain, spinal cord or peripheral nerve.* Under adequate anaesthesia and perioperative analgesia, the brain, spinal cord, or peripheral nerve is exposed and a unilateral or bilateral lesion is made by means of damaging a nerve tract.
 - a) *Brain:* injection of a neurotoxin systemically (I.P.) or intracranially, or by means of inflicting mechanical injury with micro-scissors (*max 1x*).
 - b) *Spinal cord:* At cervical or thoracic or lumbar level, access to the spinal cord is gained and a uni- or bilateral lesion of the rubrospinal tract, corticospinal tract, dorsal column or dorsolateral columns is performed by means of microscissors (*max 1x*).
 - c) *Peripheral nerve:* After gaining access to the peripheral nerve lesion site, unilateral crush or transection or spinal root avulsion is performed (*max 1x*).
- 2) *(Optional) Viral vector or cell-mediated gene delivery of a target or injection of the target molecule itself.* Under adequate anaesthesia and postoperative analgesia a (stereotaxic) injection of a viral vector (a control vector encoding GFP or an experimental vector encoding a target gene) or of cells (control cells expressing GFP or cells expressing an experimental target gene), or of tissue grafts (virally transduced or not), in a specific brain area, spinal cord, spinal ganglion, peripheral nerve, or target muscle is performed.
 - a) In 80% of the experiments, this procedure is performed simultaneously with the lesioning procedure resulting in only one exposure of the animal to surgery (*max 1x*).
 - b) In 20% of the experiments, the target expression needs to be present prior- or after the lesion has been applied resulting in a separate surgery (*max 1x*).
- 3) The animals will be sacrificed at defined time point ranging between 6 hours and 2 months after the lesion by administration of an overdose of barbiturate (I.P) or via CO₂/O₂ sedation followed by decapitation. Relevant tissues will be dissected out and will be processed for the molecular screen.

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

Parameters can be qualitative or quantitative. In the case of quantitative analysis, prior to performing an experiment we perform a power analysis (e.g. a power analysis). Many years of experience will allow us to do this in an efficient and reliable way.

B. The animals

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

Mice: genetically modified and wild type; The mice are obtained from our own breedings or from a commercial licensed breeder.

Mice (adult): 240.

Rat (adult): 240.

The estimate of the total number of animals is primarily based on our experience over the past 5 years. This number of experiments and therefore the number of animals is dependent upon the number of involved researchers which is strongly dependent on the available funding. However, a general estimate for the total number of rats and mice is as follows. A typical experiment will consist of 4 groups: a control group and 3 groups at 3 post-lesion time points. Each group consists on average of 6 animals. Total number of animals for typical experiment is 24. We expect to do 2 of these experiments per year on mice (48 mice/year) and 2 of these experiments on rats (48 rats/year) which results in a total of approximately 240 mice and 240 rats over a period of 5 years. Mice will be used when we want to measure gene and/or protein expression differences in a situation where we want to compare genetically modified (e.g. a knock-out for a target) versus wild type mice. Rats will be used for all other experiments since the size of rats allows more precise surgical lesion procedures and viral vector injections.

Importantly, before we start our experiments we will write an application to the IvD. In this application we will exactly describe (among others) which considerations, facts and results have led to the proposition of the experiments, which specific question(s) we are trying to answer with the proposed animal experiments and what the ultimate goal is for the proposed experiments. Moreover we will describe in full detail the experimental design, argue the number of animals in the experiments, describe human endpoints, alternatives, and the nature of discomfort. Experiments will only be started upon IvD approval.

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.

The procedures described in this project are based on a large body of scientific- and experimental experience in both rats and mice. Testing of the intervention-techniques will be performed *in-silico* and *in-vitro* as much as possible prior to performing an animal experiment. However, to fully understand and study the proposed mechanisms/targets in the context of neurodegeneration/degeneration, animal studies are necessary because of the complexity of the processes occurring following a lesion.

These studies are worldwide conducted in both rat and mouse, making translation and extrapolation of data between the different research-groups worldwide feasible.

Experiments will be executed in succession and, if needed, small explorative studies will be performed to provide the necessary insight in variation and expected results. On basis of our previous work and experience and explorative pilot experiments, statistical analysis can be performed to determine the

minimum number of animals needed to obtain scientific valuable data.

In the case when transgenic mice are used; presence of an existing mouse line is checked, and/or an attempt is made to obtain the target transgenic mouse in as little breeding steps as possible, reducing breeding time and animals. In addition, mice with inducible alleles will be used whenever possible, resulting in a normal phenotype until induction with tamoxifen.

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

All surgical procedures resulting in animal suffering or pain will be performed under adequate anaesthesia and analgesia. Close postoperative monitoring will be performed and humane endpoints applied when indicated. All available resources to reduce pain, fear or suffering will be employed.

Procedures will only be performed by competent personnel, as mandatory.

Adverse environmental effects are not present.

All rats and mice will be socially housed with the appropriate environmental enrichment under strict DM2 (if a viral vector is injected) conditions, or at DM1 (if transgenic mice are used).

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 required.

The proposed procedures are just fundamental research, it does not consist of legally required research.

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 I.

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

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

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

analgesia is applied prophylactic and when indicated.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

As a result of the applied loss of innervation/ neurodegeneration, a behavioral response consisting of excessive licking and biting at the affected area might occur. In time this can lead to tissue damage (autotomy). In our experience this behavior occurs mainly between 2-8 weeks post lesion and is *not* present in all types of lesions. Spinal cord and dorsal root lesions are the types of lesions where this occurs most frequently.

It is expected that in such a specific experiment 2-5% of all animals will be experiencing these adverse effect at various degrees.

All animals will be frequently monitored for possible side effects.

Animals exhibiting any unexpected phenotype resulting in constitutional discomfort will be killed within a day.

Explain why these effects may emerge.

The precise mechanism behind autotomy is still largely unknown. This behaviour only occurs in an denervated area/limb and is in the majority of cases transient.

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

Animals will be monitored daily and if possible treatment will be initiated (topically or systemic).

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.

Weight loss (>20% weight loss compared to pre-operative bodyweight), abnormal/unexpected behaviour and/or posture, general signs of illness and/or discomfort. Autotomy. The animals will never experience more than moderate discomfort.

Indicate the likely incidence.

Expected 2-5 % within time frame of specific experiment in 33% of the experiments.

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').

Moderate in 100%. In most of the cases this discomfort is transient (1-2 days).

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 rats or mice will be killed for histological analysis.

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



Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website (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 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| # 2 | Sacrifice of embryos of rats or mice or of adult rats or mice to obtain tissues for cell culture and bioassays. |
- Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

This project invests in the elucidation of the fundamental cell and molecular biological mechanisms that underlie the failure of the nervous system to repair itself. This fundamental knowledge is essential to identify the key molecules (also referred to as "targets") that regulate crucial aspects (neuronal survival, neurite outgrowth, synapse formation) of degeneration, regeneration, and functional recovery.

In order to identify and screen for targets and perform a pre-screening on the function and effect of these targets prior to *in-vivo* studies, molecular screens and bioassays are performed *in-vitro* using primary cell cultures obtained from rat or mice (embryos and adults) being either TG or WT. Alternatives (i.e. cell lines) are in most instances not compatible with the research question due to altered gene expression patterns resulting in the lack - or presence- of specific receptors (for example cell lines have been proven to be insensitive to semaphorins).

Animals will be killed according to Annex IV of directive 2010/63/EU and tissues will be harvested for further culturing.

Dependent on the research question and assay performed, cells are harvested from rats or mice (WT/ TG) from embryos, pups (P1-P7) or adults. To be able to answer specific research questions, primary cells from transgenic mice that are (conditional) knockout, mutant or transgenic for genes that might be associated with the above mentioned targets are needed.

These cultures are used for:

- Bioassays (outgrowth-, migration-, viability-, repulsion-, collapse- assays)
- Immunocytochemical- or in-situ hybridisation staining
- Biochemical analysis (ELISA, FACS, Microarray, RNA/ DNA/ Protein extraction).
- Manipulation of the cells (via viral- or plasmids driven gene expression, pharmacologically) and subsequent analysis using the above mentioned techniques.

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

This procedure will consist of the following steps:

- The animals will be sacrificed by administration of an overdose of barbiturate (I.P), or via CO₂/O₂ sedation followed by decapitation.
 - o In the case of embryonic tissues: pregnant mothers will be euthanized. Embryos are quickly taken from the uterus and placed on (but not in direct contact with) melting ice water, followed by decapitation. Brains will be isolated and kept cool and tissue will be harvested for culturing.
 - o In the case of pups: Pups are placed on (but not in direct contact with) melting ice water, followed by decapitation. Brains will be isolated and kept cool and tissue will be harvested for culturing.
 - o In the case of adult tissues: animals will be euthanized and tissue will be harvested for culturing.
- Tissues that are harvested include, but are not limited to: Brain, meninges, peripheral nerve, spinal cord, spinal dorsal root ganglia (DRG, SCG), muscle, skin.

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

Quantitative analysis: prior to performing an experiment we perform statistical analysis (a power analysis) to ensure that we use the minimum number of animals per group that will be statistically sound and biological relevant.

Qualitative analysis: The number of animals is based upon our large experience in the past. This concerns knowledge about the total number of cells that can be obtained from specific tissues per animal and the expansion of these cells during passaging. Experimental design further dictates the number of cells needed. Finally, experiments are performed sequentially resulting in increasing knowledge about the variation in the target and control groups.

B. The animals

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

The estimate of the total number of animals is primarily based on our experience over the past 5 years. This number of experiments and therefore the number of animals is dependent upon the number of involved researchers which is strongly dependent on the available funding. However, in general, an estimate for the total number of rats and mice is as follows:

Rat and mice embryo's: an average of 25 pregnant mice and 25 rat pregnant mothers (litters) is needed per year to perform primary cultures and bioassays

(e.g. dorsal root ganglia) described in this protocol. One litter generally provides enough cells from any of the proposed tissues, to perform an in-vitro study (including experimental groups, positive- negative- and biological controls). For 5 years, 125 rat and 125 mice pregnant mothers, with an average of 6 to 8 pups per mother. *For 5 years that amounts to maximally 1000 rat embryos and 1000 mouse embryos (and the 125 rat and 125 mice pregnant mothers).*

Early post-natal rats and mice (P1 to P7): an average of 75 rat pups and 75 mouse pups is required per year to perform primary cultures and bioassays using post-natal cells (e.g. cerebellar granule cells, cortical neurons). *For 5 years a total of 375 rats and 375 mice pups are required.*

Adult rats and mice: an average of 20 adult rats and 20 adult mice is necessary to set up primary cultures and bioassays using adult neurons (mostly dorsal root ganglion neurons). *For 5 years a total of 100 adult rats and 100 adult mice are required.*

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.

The procedures described in this project are based on a large body of scientific- and experimental experience in both rats and mice. Testing of the intervention-techniques will be performed *in-silico* and *in-vitro* as much as possible prior to performing an animal experiment.

In case an alternative (i.e. a cell line) is available that is applicable and will answer the research question, these are the primary choice.

Optimal use is made from each animal killed by harvesting the maximum amount of tissue from different organs.

These studies are conducted in both rat and mouse worldwide, making translation and extrapolation of data between research-groups more feasible.

Experiments will be executed in succession and, if needed, small explorative studies will be performed to provide the necessary insight in variation and expected results. On basis of this previous work and experience, statistical analysis can be performed to determine the minimal number cells/ culture dishes and thus, the minimal number of animals needed to obtain valuable data.

To reduce inter- and intra-assay variability we will only use well-established reagents and protocols during the in-vitro procedures.

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

All procedures resulting in animal suffering or pain will be performed under adequate anaesthesia. All available resources to reduce pain, fear or suffering will be employed.

Experiments will be done sequentially. Whenever possible small scaled pilot studies will be performed with the minimal number of animals.

Procedures will only be performed by competent personnel, as mandatory.

Adverse environmental effects are not present.
All rats and mice will be housed under strict DM1 and SPF regulations.

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 required.

The proposed procedures are just fundamental research, it does not consist of legally required research.

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 I.

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

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

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

No other adverse effects are expected. Animals will experience normal housing conditions without additional handling until they are killed.

Explain why these effects may emerge.

Not applicable

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

Not applicable

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.

Expected 0% within time frame of the experiment

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').

mild 100%

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.

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



Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website (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 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| #3 | Injury models (functional and histological analysis): Injection of cells or viral vectors in lesioned animals. |
- Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

Our aim is to determine whether our identified target molecules and intervention methods (i.e. viral vector or cell-mediated gene delivery of a target, by using transgenic mice with overexpression or knock-down of a target) will improve both anatomical and functional recovery following a lesion to the brain, spinal cord, or peripheral nerve. Therefore, following a lesion we will perform several non-invasive function tests and/or an electrophysiological test on each

animal at several time points after induction of the lesion and the therapeutic intervention. This will provide insight in the full spectrum of the induced functional deficit and the degree of subsequent recovery of function per animal in time.

The brain, spinal cord or peripheral nerve lesions will be made by means of well-established surgical procedures. These lesion types are chosen because they represent clinically relevant injuries in which we can test the efficacy of a specific intervention. In different parts of the CNS different processes underlie degeneration and regeneration and it is therefore important to study different parts of the CNS (brain, spinal cord, spinal ganglion, peripheral nerve) and innervated target muscles.

The cells or viral vectors will be injected via small needles in the area of study.

Activation or inhibition of transgenes encoded in the viral vectors or transgene mouse via pharmaceuticals (e.g. doxycycline, tamoxifen) might be necessary to regulate transgene expression in time.

Intravenous application of a substrate (e.g. luciferine) might be necessary to perform an imaging study and visualize viral vector mediated expression of the reporter gene luciferase.

Assessment of recovery of function is obtained by performing multiple function tests at multiple time points.

Animals might be injected under anaesthesia with an antero/retrograde tracer prior to killing the animals to allow histological assessment of regeneration/sprouting process at the intermediate or the final stages of recovery.

At the end of the experiments in all cases the animals will be killed and tissues will be harvested for further analysis, allowing direct correlation between the individual degree of function recovery and histological parameters. These tissues can be subjected to: histological sectioning followed by immunohistochemical- or in-situ hybridisation staining or biochemical analysis (ELISA, FACS, Microarray, RNA/ DNA/ Protein extraction).

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

This procedure will consist of the following steps:

- 1) *Pre-training and baseline measurement of the animals using behavioural function tests.* Acclimatization of the animals to both the handling and testing-environment will result in reliable baseline data with little variation. This step involves:
 - a. Pre-training on our non-invasive function tests performed on freely moving animals to obtain baseline values (*max: 1x exposure/ test/ day, for 2 weeks*). In general, animals performing one or more non-invasive function tests including, for example: 1) cross a beam, rope or narrow corridor, walking from platform to platform without being forced. 2) Grip a horizontal bar and pull after which the maximum applied force is measured. 3) Walk in an open field or cylinder while being observed by the researcher who is scoring naturally behaviour 'events'. Dependent on the aim of the experiment the relevant test(s) and variants thereof will be selected and applied.
- 2) Baseline measurement of electrophysiological (CMAP) measurement under adequate anaesthesia. (*max: 2x*)
- 3) *Application of a lesion to the brain, spinal cord or peripheral nerve.* Under adequate anaesthesia and postoperative analgesia, the skull, spinal cord or peripheral nerve is exposed and a unilateral or bilateral lesion is made by means of damaging of a nerve tract.
 - a. *Brain:* injection of a toxin systemically (I.P.) or intracranially, or by means of mechanical injury with microscissors (*max 1x*).
 - b. *Spinal cord:* At cervical or thoracic or lumbar level, access to the spinal cord is gained and a uni- or bilateral lesion of the rubrospinal tract, corticospinal tract, dorsal column or dorsolateral columns is performed by means of microscissors (*max 1x*).
 - c. *Peripheral nerve:* After gaining access to the peripheral nerve lesion site, unilateral crush or transection or spinal root avulsion is performed. (*max 1x*).
- 4) *Viral vector or cell-mediated gene delivery of a target.* Under adequate anaesthesia and postoperative analgesia a (stereotaxic) injection of a viral vector (an control vector encoding GFP or 'repair experiments' with an experimental vector encoding a target gene) or of cells (control cells expressing GFP or cells expressing an experimental target gene), or of tissue grafts (virally transduced or not), in a specific brain area, spinal cord, spinal ganglion, peripheral nerve, or target muscle is performed.
 - a. In 80% of the experiments, the injection of the viral vector is performed simultaneously with the lesioning procedure resulting in only one

- exposure of the animal to surgery (*max 1x*).
- b. In 20% of the experiments, the target expression needs to be present prior- or after the lesion has been applied resulting in a separate surgery (*max 1x*).
- 5) Dependent on the viral vector system or transgenic mouse used, administration of transgene-inducing agent or pharmaceuticals are needed continuously or alternating, as follows:
 - a. Enteral: diet supplemented with doxycyclin (during certain periods of the experiment)
 - b. Parenteral: intravenous, intramuscular, intraperitoneal injection of luciferine a substrate for luciferase a reporter gene used to monitor the activity of some vectors. Subsequent imaging to visualize viral vector mediated expression of the reporter gene luciferase is performed in the IVIS under isoflurane anaesthesia. These measurements generally take 5 minutes, but maximally 30 minutes (*max 1x/wk, max 24x*).
 - c. Parenteral: I.P. injection of tamoxifen (*max 3x*).
 - 6) *Testing the efficacy of the treatment by assessment of recovery of function:* The initial loss and gradual gain of function occurs over a period of maximal 12 months and will be evaluated by performing a subset of the function tests as described in (1). The frequency of testing is:
 - a. Early following the lesion (first 4-8 weeks), (bi-) weekly tests need to be performed in order to evaluate the dynamics of this initial recovery phase.
 - b. After 4-8 weeks, gain of function will start to level off and a weekly- to bimonthly testing frequency up to the final 12th month is sufficient.
 - 7) *Testing the efficacy of the treatment by assessment of anatomical parameters:*
 - a. *Retrograde tracing to histologically visualize treatment efficacy prior to sacrifice.* Administration of an antero- or retrograde tracer by:
 1. Surgically exposing the peripheral nerve followed by tracer application under adequate anesthesia and analgesia (*max. 1x*)
 2. Surgically exposing the skull/spinal cord followed by intracranial or intraspinal tracer injection under adequate anesthesia and analgesia (*max.1 x*)
 - b. Perfusion fixation of animals at specific time points after the lesion by sacrificing the animals by administration of an overdose of barbiturate (I.P) followed by transcardial perfusion/fixation, or via CO₂/O₂ sedation followed by dissection of the relevant tissues for extensive histological analysis of the tissue response to the treatment.
 - 8) (Optional) Withdrawal of blood samples without anesthesia in the mouse, or under adequate anaesthesia in the rat. (*max 5x*).
 - 9) (Optional) Imaging by a light source (luminescence): the intravenous or intraperitoneal administration of luciferin under isoflurane anesthesia for a period of max 10 minutes (*max 2x week up over a period of maximally 12 months*).
 - 10) The animals will be sacrificed by administration of an overdose of barbiturate (I.P) followed by transcardial perfusion/fixation, or via CO₂/O₂ sedation followed by decapitation.

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

Quantitative analysis: prior to performing an experiment we perform statistical analysis (a power analysis) to ensure that we use the minimum number of animals per group that will be statistically sound and biological relevant.

Qualitative analysis (most of our experiments): the number is based in literature and/or years of experience with similar type of experiments. Moreover, these types of experiments will be performed sequentially in order to ensure that we will use the minimum number of rats or mice per group that is informative resulting in scientifically sound conclusions.

B. The animals

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

Mice: genetically modified and wild type; The mice are obtained from our own breedings or from a commercial licensed breeder.

Mice (adult): 750.

Rat (adult): 900. The rats are obtained from a commercial licensed breeder
The estimate of the total number of animals is primarily based on our experience over the past 5 years. This number of experiment and therefore the number of animals is dependent upon the number of involved researchers which is strongly dependent on the available funding. However, in general, an estimate for the total number of rats and mice is as follows: Function studies contain an average of 60 rats (containing experimental groups, positive- negative- and biological controls). In average 3 of these studies are performed each year, resulting in a total of 900 rats (5 year x 3 studies x n=60). The same is true for mouse function studies, resulting in 900 mice total.
Before we start our experiments we will write an application to the IvD. In this application we will exactly describe (among others) which considerations, facts and results have led to the proposition of the experiments, which specific question(s) we are trying to answer with the proposed animal experiments and what the ultimate goal is for the proposed experiments. Moreover we will describe in full detail the experimental design, argue the number of animals in the experiments, describe (i.a.) human endpoints, alternatives, nature of discomfort. Experiments will only be started upon IvD approval.

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.

The procedures described in this project are based on a large body of scientific- and experimental experience in both rats and mice. Testing of the intervention-techniques will be performed *in-silico* and *in-vitro* as much as possible prior to performing an animal experiment. However, to fully understand and study the proposed mechanisms/targets, animal studies are necessary as the complexity of the processes occurring following a lesion can only be achieved in a complete organism.

These studies are conducted in both rat and mouse worldwide, making translation and extrapolation of data between research-groups more feasible. Experiments will be executed in succession and, if needed, small explorative studies will be performed to provide the necessary insight in variation and expected results. On basis of this previous work and experience, statistical analysis can be performed to determine the maximum number of animals needed to obtain valuable data.

In the case when transgenic mice are used; presence of an existing mouse line is checked, and/or an attempt is made to obtain the target transgenic mouse in as little breeding steps as possible, reducing breeding time and number of animals. In addition, mice with inducible alleles will be used when possible, resulting in a normal phenotype until induction.

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

All surgical procedures resulting in animal suffering or pain will be performed under adequate anaesthesia and analgesia. Close postoperative monitoring will be performed and humane endpoints applied. All available resources to reduce pain, fear or suffering will be employed.

Procedures will only be performed by competent personnel, as mandatory.

Adverse environmental effects are not present.

All rats and mice will be socially housed and provided with tools for environmental enrichment. For some periods during the experiments they are housed under strict DM2, DM1 regulations (no discomfort consequences).

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 required.

The proposed experiments are not carried out as a result of legal requirements.

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 I.

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

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

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

anaesthesia and analgesia is used.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

As a result of the applied loss of innervation/ neurodegeneration, autotomy, a response consisting of excessive licking and biting at the affected area, might occur. In time this can lead to tissue damage. In our experience this behavior occurs mainly between 2-8 weeks post lesion and is *not* present in all types of lesions. Spinal cord and dorsal root lesions are the types of lesions where this occurs most frequently.

It is expected that in 33% of the experiments 2-5% of all animals will be experiencing these adverse effects to different degrees.

All animals will be frequently monitored for possible side effects.

Animals exhibiting any unexpected phenotype will be killed within a day.

Explain why these effects may emerge.

The precise mechanism behind autotomy is still largely unknown. This behaviour only occurs in an denervated area/limb and is in the majority of cases transient.

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

Animals will be monitored daily and if possible treatment will be initiated (topically or systemic).

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.

Weight loss (>20% weight loss compared to pre-operative bodyweight), abnormal/unexpected behaviour and/or posture, general signs of illness and/or discomfort. Autotomy. The discomfort will never be more than moderate.

Indicate the likely incidence.

Expected 2-5 % within time frame of the experiment.

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').

Moderate 100%. In most of the cases this discomfort is transient (1-2 days).

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 rats or mice will be killed for histological analysis.

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



Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website (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 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|------------------------------------------------|
| # 4 | Testing of the quality of viral vector batches |

Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

A primary aim of our research is to unravel new mechanisms that govern or hamper neuroregeneration or neuroplasticity. A key approach that we use to test the efficacy of a specific target molecule is viral vector-mediated gene transfer to neurons or glia cells. Although the viral vector technique has become more and more a standard technique, the generation of new viral vectors with potentially improved performance is an ongoing endeavor. For instance, of one of the most used viral vectors (adeno-associated viral vectors - AAV) an increasing number of variants ("serotypes") with specific cellular transduction profiles have

become available. Moreover we are currently developing vectors with regulatable transgene expression. Therefore it is necessary to have a protocol in place that allows testing the performance of newly generated vectors in small scale prior to their use in large animal experiments. A new vector batch that needs to be tested will only be tested in the tissue for which it is intended to be used later in the large experiment in which its efficacy is tested. Therefore this test protocol includes injections in the brain, spinal cord, peripheral nerve, and muscle without surgically inflicted damage.

Injection of a viral vector in the brain, spinal cord or the peripheral nerve or muscle will be performed by means of well-established (stereotactic) injection procedures. The typical primary outcome parameters that will be studied are: the transduction efficiency (number of cells transduced), the level of transgene expression per cell, the spread and cell type specificity obtained with a viral vector and, in the case of a regulatable viral vector, the inducibility and subsequent silencing of transgene expression.

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

This procedure can consist of the following steps:

- 1) Injection of a vector in the brain, spinal cord or the peripheral nerve or muscle. Dependent on the specific aim of the project for which the vector is generated the vector will be tested in the tissue of interest for that project (max. 1 x) For most vectors it will be sufficient to test the performance on a limited number of post-injection times, e.g. 2 weeks and 4 weeks. For other tests of viral vectors more elaborate testing will be required, e.g. for regulatable vectors where a gene is turned on and off.
- 2) Specific virus batch-dependent situations:
- 3) Dependent on the viral vector system or transgenic mouse used, administration of transgene-inducing agent or pharmaceuticals are needed continuously or alternating, as follows:
 - a. Enteral: diet supplemented with doxycyclin (during certain periods of the experiment)
 - b. Parenteral: intravenous, intramuscular, intraperitoneal injection of luciferine a substrate for luciferase a reporter gene used to monitor the activity of some vectors. Subsequent imaging to visualize viral vector mediated expression of the reporter gene luciferase is performed in the IVIS under isoflurane anaesthesia. These measurements generally take 5 minutes, but maximally 30 minutes (*max 1x/wk, max 24x*).
 - c. Parenteral: I.P. injection of tamoxifen (*max 3x*).

Vectors encoding the recombinase Cre will be tested in genetically modified mice that carry a floxed gene of interest or a floxed reporter gene which requires i.p injection of tamoxifen

- 4) At the end of the experiment the animals will be sacrificed by administration of an overdose of barbiturate (I.P) followed by transcardial perfusion/fixation, or via CO₂/O₂ sedation followed by decapitation. The expression of the transgene will be studied by histological analysis of the tissue or by biochemical analysis, e.g. and ELISA for GFP or GDNF.

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

We will not use statistical method to determine the number of animals in this particular procedure because the aim of this procedure is not to compare groups with different treatments. Based on previous experiments we know that an N=4 per group is normally sufficient to determine whether a viral vector batch works well or not. The N=4 is based on the following consideration: our injection techniques are well-established, however, occasionally we lose an animal because the injections does not go optimal. With an N=4 we always have at least 3 animals in which we will be able to investigate transgene expression.

B. The animals

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

Mice (adult): 180. Either commercial or wildtype/transgenic mice from our own breeding facility.

Rat (adult): 460. Commercially available.

The estimate of the total number of animals is primarily based on our experience over the past 5 years.

The number of experiments and therefore the number of animals is dependent upon the number of involved researchers which is strongly dependent on the available funding.

Adult mice. We estimate that a total number of 7 viral vector batches have to be tested in mice. We expect that 1 batch will have to be tested on 3 timepoints with 4 mice per time point. For the other 6 batches one time point would be sufficient, 4 mice per time point. Per year we need 36 mice. Total per 5 years: 180 mice. The justification of the use of mice is that we use viral vectors that express Cre, a recombinase, to knock-out a specific gene that is floxed in mice. The advantage of the use of Cre expressed via a viral vector is that this can be done in adult animals, that is in circumstances where the development of the animal has been completely normal.

Adult rats. We estimate that a total of 15 viral vector batches have to be tested in rats. Total rats per 5 years is 460. The justification of the use of rats is that our lesion and regeneration models are established in rats.

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.

The aim of this protocol is to test the performance of viral vector batches prior to their use in larger animal experiments. This avoids that batches that do not perform as required are not used in larger animal experiments. This "pre-screening" of the performance of a viral vector batch results in the reduction of the use of animals because it avoids the use of a "bad" batch in larger experiments that would fail if the pre-screen would not have been done. Pre-screening is also a form of refinement.

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

All surgical procedures resulting in animal suffering or pain will be performed under adequate anaesthesia and analgesia. Close postoperative monitoring will

be performed and humane endpoints followed. All available resources to reduce pain, fear or suffering will be employed.

Procedures will only be performed by competent personnel, as mandatory.

Adverse environmental effects are not present.

All rats and mice will be socially housed with the appropriate environmental enrichment under standard and when required DM2, DM1 conditions.

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 required.

The proposed experiments are not carried out as a result of legal requirements.

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 I.

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

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

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

anaesthesia and analgesia is used

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Effects due to the performed surgery.

Effects as a consequence of the biological effects of the applied vector. No discomfort is expected.

All animals will be frequently monitored for possible side effects. Animals exhibiting any unexpected phenotype? will be killed within a day.

Explain why these effects may emerge.

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

Animals will be monitored daily and if possible treatment will be initiated (topically or systemic).

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.

Weight loss (>20% weight loss compared to pre-operative bodyweight), abnormal/unexpected behaviour and/or posture, general signs of illness and/or discomfort.

Indicate the likely incidence.

Expected 2-5 % within time frame of the experiment.

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').

Mild 100%

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 rats or mice will be killed for histological analysis.

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



Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website (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 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|--------------------------------------------------------------|
| # 5 | Monitoring and generation of novel genetically modified mice |

Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

This procedure concerns the creation of genetically mice via DNA/RNA injection into oocyte, injection of genetically modified ES cells into blastocysts and/or via the CRISPR/Cas9 system. Moreover this procedure concerns the generation of crosses between mice with a floxed allele and Cre-expression mice lines in order to generate conditional null-mutant mice. As a consequence of this advanced breeding procedure mice may only have a gene deletion in a particular neuron or glia cell.

Welfare assessment of the novel mouse models will be performed according to the guidelines of the new EU directive. New transgenic lines and/or KO lines generated via classical methods and/or novel combinations of these aforementioned lines will be monitored for 2 generations to determine the absence or presence of mice with a deviant or hampered phenotype. Since whole body (compound) knock-outs will now be mostly replaced by cell specific knock-outs we expect that phenotypes will display considerable less adverse effects.

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

Generation of the mice according to classical methods:

1) Superovulation of donor mice.

- a) Administration of gonadotropin's (2 times) by subcutaneous or intraperitoneal injections followed by mating.
- b) Animals will be killed for the isolation of early (usually two or four cell stage) embryos.

2) Embryo recipients.

- a) Recipients for embryo transfer will be rendered pseudo pregnant by mating with a sterile (vasectomized) male.
- b) Genetically modified embryos will be implanted surgically or non-surgically into the reproductive tract.
- c) Embryo recipients, not as part of an experiment, will be killed after weaning of the pups at three weeks of age.

3) Weaned pups at 3 weeks of age: Tissue sampling for genotyping and/or identification via tail and earcut, respectively, under anesthesia (isoflurane).

Animals are killed by O2/CO2 method.

Welfare assessment:

Daily checks of the welfare of the mice on several common parameters (overall appearance, size, confirmation and growth, coat condition, behavior, clinical signs, relative size and numbers) as has been described in the Directive 2010/63/EU: corrigendum of 24 Jan. 2013

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

For these type of experiments statistical analysis is not performed since the purpose of the experiment is not to compare groups but to create viable novel mice lines for follow-up experiments. All techniques are state of the art and have been shown to be effective in generating GM mice with a smallest number of mice possible.

B. The animals

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

Mouse; *Mus musculus*: genetically modified and wild type adult mice. All mice are derived from the NIN, an establishment licensed by the NVWA, or from a registered commercial company.

For generation of GM mice we expect, based on our extensive experience, to generate max. 15 new lines over the next 5 years. For the creation of a new GM mouse lines we will use on average max. 150 mice (according to the besluit biotechnologie). Based on these numbers in total a maximum of 2250 mice will be required.

Welfare assesment: we expect to generate over the next 5 years 15 new GM lines for which we have to perform the welfare assesment. For 2 generations, 7 males and 7 females control and GM mice. We therefore need in total: 15 (new (compound) lines) * 2 (generation) * 28 ((7 male +7 female = 14 GM mice +

(7 male + 7 female = 14 control mice)) = 840 mice for the welfare assessment.

Taken together within the context of this procedure we need 2250 + 840 mice = 3090 mice

A large portion of the newly generated GG mice will be floxed mice, which have no phenotype by definition, and which are not part of the welfare assessment protocol. We will not breed new GM mice showing a hampered phenotype.

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.

- (Vasectomized) males will also be used by the other groups of the NIN if required for their experiments, thereby reducing the number of (vasectomized) males used for the generation of GM mice.

Mice used for welfare assessment, might be used for experiments described in procedures 3.4.4.1, 3.4.4.2 and 3.4.4.3.

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.

We start the generation of a new GM mouse line only after we are convinced that based on molecular screens in human tissue or animals (procedure 3.4.4.1), and in vitro experiments (procedure 3.4.4.2) the creation of a new line is essential for in vivo functional and mechanistic studies. Animal studies are essential unavoidable if we want to obtain comprehensive knowledge on the function of specific genes in processes of neuroregeneration and plasticity. The CRISPR/Cas9 system allows us, if required, to genetically modify multiple (that is up to 5 different) genes in a single experiments. This may strongly reduce the number of mice used for the generation and/or breeding of these GM mice.

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

All possibilities to reduce pain, fear or suffering will be used. There are no negative environmental effects; all mice will be housed under well-controlled DM1 conditions.

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 required.

The proposed procedures are just fundamental research, it does not consist of legally required research.

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 I.

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

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

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

We do not expect to find additional adverse effect. This is the direct result of how we create our constructs for the generation of GM mice.

Explain why these effects may emerge.

We do not expect to find other adverse effect.

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

Daily monitoring of our mice; immediate action will be taken immediately if unexpectedly any adverse effect will become visible.

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').

Vasectomized males: moderate

Donors: moderate 100%

Foster mothers: moderate 100%

GM mice: no to mild 100% (welfare assessment).

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 donor females will be killed as part of the experiments.

The foster females will be killed after the experiment (at the stage of weaning of the pups).

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Kon. Ned. Academie van Wetenschappen

Postbus 19121
1100 GC AMSTERDAM



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.zbo-ccd.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD801002015104

Bijlagen

2

Datum 22-05-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 22 mei 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD801002015104. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

Als wij nog informatie van u nodig hebben dan ontvangt u daarover bericht. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn bijgeschreven op de rekening van de CCD. Zodra uw aanvraag compleet is, ontvangt u binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. In geval van een complexe aanvraag kan deze termijn met maximaal vijftien werkdagen verlengd worden. U krijgt bericht als de beslisperiode van uw aanvraag vanwege complexiteit wordt verlengd. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Factuur

Bijgaand treft u de factuur aan voor de betaling van de leges. Wij verzoeken u de leges zo spoedig mogelijk te voldoen, zodat we uw aanvraag in behandeling kunnen nemen. Is uw betaling niet binnen dertig dagen ontvangen, dan wordt uw aanvraag buiten behandeling gesteld. Dit betekent dat uw aanvraag niet beoordeeld wordt en u uw project niet mag starten.

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 80100
Naam instelling of organisatie: Kon. Ned. Academie van Wetenschappen
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 54667089
Postbus: 19121
Postcode en plaats: 1100 GC AMSTERDAM
IBAN: NLDEUT056900054
Tenaamstelling van het rekeningnummer: [REDACTED]

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: Group Leader
Afdeling: Group Regeneration of Sensory Motor Systems
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: Biotechnicus
Afdeling: Group Regeneration of Sensory Motor Systems
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u? Nieuwe aanvraag
 Wijziging op een (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
 Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

Over uw project

Geplande startdatum: 1 juli 2015
Geplande einddatum: 1 juli 2020
Titel project: Developing strategies to promote repair or plasticity of the central and peripheral
Titel niet-technische samenvatting: Ontwikkeling van strategieën om de regeneratie van zenuwweefsel te bevorderen
Naam DEC: DEC KNAW
Postadres DEC: [REDACTED] Amsterdam
E-mailadres DEC: [REDACTED]


Betaalgegevens

De leges bedragen: € 741,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen: Projectvoorstel
 Beschrijving Dierproeven
 Niet-technische samenvatting
Overige bijlagen: DEC-advies
 er zijn in totaal 5 appendixen

Ondertekening

Naam: 
Functie: Directeur Instituten KNAW
Plaats: Amsterdam
Datum: 18 mei 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Kon. Ned. Academie van Wetenschappen

Postbus 19121
1100 GC AMSTERDAM



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.zbo-ccd.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD801002015104

Bijlagen

2

Datum 22-05-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 22 mei 2015

Vervaldatum: 21 juni 2015

Factuurnummer: 201570104

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvegrunning dierproeven Betreft aanvraag AVD801002015104	€ 741,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL28RBOS 056.99.96.066 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Kon. Ned. Academie van Wetenschappen

Postbus 19121
1100 GC AMSTERDAM



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.zbo-ccd.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD801002015104

Datum

Betreft Vervolg Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw

Op 22 mei 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project Developing strategies to promote repair or plasticity of the central and peripheral met aanvraagnummer AVD801002015104. Uw aanvraag wordt in behandeling genomen. In deze brief leest u wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Wanneer een beslissing

Wij nemen uiterlijk 17 juni 2015 een beslissing. Als wij nog informatie nodig hebben, kan dit later worden. Voor een complexe aanvraag staat een langere termijn. In beide gevallen ontvangt u daarover bericht. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Kon. Ned. Academie van Wetenschappen

Postbus 19121

1100 GC AMSTERDAM



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

www.zbo-ccd.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD801002015104

Datum

Betreft Vervolg Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw

Op 22 mei 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project Developing strategies to promote repair or plasticity of the central and peripheral met aanvraagnummer AVD801002015104.

DEC advies gevraagd

Uw aanvraag is naar DEC Kon. Ned. Academie van Wetenschappen gestuurd. Zij zal hierover advies aan de CCD uitbrengen. Als de DEC vragen heeft, zal zij contact met u opnemen.

Uw aanvraag wordt door een andere dan de door u aangegeven DEC van een advies voorzien. nvt

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Format DEC-advies

Maak bij de toepassing van dit format gebruik van de bijbehorende toelichting, waarin elke stap in het beoordelingsproces wordt toegelicht

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: AVD/801002015104
2. Titel van het project: Developing strategies to promote repair or plasticity of the central and peripheral nervous system.
3. Titel van de NTS: Ontwikkeling van strategieën om de regeneratie van zenuwweefsel te bevorderen.
4. Type aanvraag:
 - ✓ nieuwe aanvraag projectvergunning
 - wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: KNAW
 - telefoonnummer contactpersoon: ██████████
 - mailadres contactpersoon: ██████████
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ✓ ontvangen door DEC: 17-04-2015
 - ✓ aanvraag compleet: 30-04-2015
 - ✓ in vergadering besproken: 23-04-2015
 - ✓ anderszins behandeld: n.v.t.
 - ✓ termijnonderbreking(en): n.v.t.
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen:
 - aanpassing aanvraag:
 - ✓ advies aan CCD: 22-05-2015
7. Eventueel horen van aanvrager
 - Datum: n.v.t.
 - Plaats:
 - Aantal aanwezige DEC-leden:
 - Aanwezige (namens) aanvrager:
8. Correspondentie met de aanvrager:
 - Datum 24-04-2015
 - Strekking: completering van de aanvraag
 - Datum antwoord 20-05-2015
 - Strekking van de antwoorden: de aanvraag is gecompliceerd
9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC): geen

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig. Het omvat dierproeven in de zin der wet.

2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag. Er is enige overlap met een aantal al van een positief advies voorziene DEC-protocollen.
3. De DEC is competent om over deze projectvergunningsaanvraag te adviseren. De benodigde expertise op dit wetenschappelijk terrein is aanwezig binnen de DEC. Geen van de DEC-leden is betrokken bij het betreffende project.
4. Vanwege betrokkenheid bij het betreffende project is een aantal DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken bij de advisering: n.v.t.

C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is wetenschappelijk verantwoord.
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.
3. De doelstelling, in relatie tot de uitvoering, is helder omschreven; te weten het verkrijgen van fundamenteel wetenschappelijke inzichten in 1) de biologische mechanismen van het afsterven van zenuwcellen en de biologische mechanismen van zenuwweefselregeneratie na het optreden van schade en 2) de toepasbaarheid van die kennis in de ontwikkeling van therapeutische strategieën om het verlies van zenuwcellen te voorkomen of om de uitgroei van beschadigde zenuwuitlopers te stimuleren. Op termijn kunnen de resultaten leiden tot nieuwe behandelingsmethoden voor de humane patiënt met zenuwschade.

Het fundamenteel wetenschappelijke belang acht de DEC substantieel. Het verkrijgen van wetenschappelijke kennis van de processen en factoren die ten grondslag liggen aan regeneratie van zenuwweefsel (waaronder het herstel van zenuwceluitlopers en het voorkomen van de celdood van zenuwcellen) is essentieel voor het ontwikkelen van nieuwe therapeutische strategieën. Inzichten in het gebruik van genterapie met behulp van virale vectoren om de geïdentificeerde factoren te kunnen inbrengen op de juiste plaats in het geval van zenuwschade is naar de mening van de DEC van substantieel belang. Het project dient een belangrijk maatschappelijk belang, gezien de grote groep patiënten met zenuwweefselschade.

4. De gekozen strategie en experimentele aanpak in combinatie met de infrastructuur op [REDACTED] en de expertise van de betrokken onderzoeksgroep bieden een realistisch uitzicht op het behalen van de beoogde doelstellingen binnen gevraagde looptijd van het project. Het project bouwt voort op een langlopende lijn van onderzoek van een grote groep onderzoekers. Over de afgelopen jaren zijn met een vergelijkbare strategie en aanpak belangrijke wetenschappelijk resultaten behaald, resulterend in vele publicaties in vooraanstaande tijdschriften. Het onderzoek wordt financieel gesteund door verschillende onafhankelijke subsidiegevers. Er zijn internationale samenwerkingsverbanden en er zijn sterke relaties met de kliniek die een

vertaling van de bevindingen van het onderzoek naar de kliniek zullen vergemakkelijken.

5. Alle dieren worden gefokt voor het gebruik in dierproeven, er is geen sprake van afwijkende huisvesting en/of hergebruik. Er is geen sprake van bedreigde diersoorten, niet-menselijke primaten, zwerfdieren en/of dieren in/uit het wild. De toegepaste methoden voor anesthesie/euthanasie zijn conform de Richtlijn.
6. Het cumulatieve ongerief gepaard gaand met de dierproeven, zoals beschreven in de vijf verschillende type dierproeven, is naar inschatting van de DEC licht (Type dierproef 2, 4 en 5) of matig (Type dierproef 1 en 3) ongerief. In het merendeel van de gevallen met matig ongerief is de duur van het ongerief beperkt tot 1-2 dagen en is er een beperkt risico op onbedoelde bijwerkingen in de vorm van autotomie. Deze inschatting van de DEC is in overeenstemming met het niveau van cumulatief ongerief zoals dat is geclassificeerd door de onderzoekers. Dit is gebaseerd op hun ruime ervaring met de gebruikte modellen in vergelijkbare dierproeven.
7. Binnen het project wordt maximaal gebruik gemaakt van methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk **vervangen**. Een belangrijk onderdeel van de experimentele strategie is de gefaseerde opzet. In de eerste fase, voorafgaand aan de dierproeven, vindt een uitgebreide screening plaats met weefsel afkomstig van patiënten en van de Nederlandse Hersenbank. Na deze fase zijn er go/no-go-beslissingsmomenten, voordat tot het uitvoeren van bioassays wordt besloten.
Nieuwe inzichten in de processen die zenuwweefselherstel reguleren kunnen op dit moment alleen maar verkregen worden in een intact organisme. Deze processen, waarbij verschillende typen cellen betrokken zijn binnen een gecompliceerde anatomische context, zijn zeer complex en kunnen niet met cellijnen worden bestudeerd. Naar het oordeel van de DEC zijn er geen alternatieven beschikbaar voor het voorgestelde gebruik van intacte dieren om te doelstelling van dit project te realiseren.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereisten van **vermindering** van dierproeven. De onderzoeksgroep heeft een jarenlange ervaring opgebouwd met dit soort experimenten en door een veelal gefaseerde opzet wordt per experiment niet meer dan het minimaal benodigde aantal dieren ingezet. Voorafgaand aan de kwantitatieve experimenten wordt op basis van literatuurgegevens, eigen historische data of een specifiek hiertoe uitgevoerd pilot experiment de groepsgrootte bepaald. Technieken en procedures worden zorgvuldig toegepast. Het aantal te gebruiken dieren is realistisch geschat. Voor de bioassays zijn op beperkte schaal proefdieren nodig (met licht ongerief) maar de uitkomsten van deze proeven leiden tot de selectie van factoren met een duidelijk effect en hiermee wordt het aantal dierproeven met

zenuwschademodelen (met matig ongerief) verminderd en wordt de kans op het verkrijgen wetenschappelijk relevante resultaten verhoogd.

Voor het genereren van genetisch gemodificeerde diermodellen waarin de gentherapie experimenten worden gedaan zijn naar verhouding veel dieren nodig. Ook ontstaat daarbij onvermijdelijk een overschot van dieren die wel gefokt worden, maar niet worden gebruikt in het onderzoek. De commissie acht dat aanvaardbaar in het licht van het feit dat de gentherapie experimenten, zowel in methodologisch opzicht (onderzoek naar de functie van een gen in beschadigd zenuwweefsel), als mogelijke toekomstige klinische behandeling, van essentieel belang zijn voor dit project.

- 9.** De uitvoering van het project is in overeenstemming met de vereisten van **verfijning** van dierproeven en is zo opgezet dat de dierproeven met zo min mogelijk ongerief worden uitgevoerd.

Bij de opzet wordt rekening gehouden met dierenwelzijn en wel op de volgende manieren: 1) het gebruik van adequate anesthesie en analgesie waar nodig, 2) een intensieve monitoring van de proefdieren na de inductie van zenuwweefselschade, 3) het gebruik van weefselspecifieke genetisch gemodificeerde muizen, 4) een monitoring op het optreden van onverwacht constitutioneel ongerief van nieuwe gecreëerde genotypes.

Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.

- 10.** De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en is geformuleerd in begrijpelijke taal. De NTS voldoet daarmee aan de eisen zoals gesteld in artikel 10.a.1.7 van de Wod.

D. Ethische afweging

De centrale vraag voor de ethische afweging is of het belang van het doel van dit project opweegt tegen het ongerief dat de dieren ondergaan (geclassificeerd als licht of matig). Het doel van het project is het verkrijgen van fundamenteel wetenschappelijke inzichten in: 1) de biologische oorzaken van het afsterven van zenuwcellen en het (vrijwel volledig) ontbreken van zenuwweefselregeneratie en 2) de toepasbaarheid van die kennis in de ontwikkeling van een strategie (in het bijzonder toepassing van virale gentherapie) om het verlies van zenuwcellen te voorkomen of om de uitgroei van beschadigde zenuwuitlopers te stimuleren. Het onderzoek is primair fundamenteel wetenschappelijk van karakter. De verwachting is dat de resultaten op den duur kunnen bijdragen aan nieuwe therapieën om de gevolgen van zenuwweefselschade voor patiënten te verminderen. Voor een grote groep patiënten met diverse typen zenuwweefselschade van is het van aanzienlijk belang dat er uitzicht ontstaat op nieuwe therapieën die de kwaliteit van hun leven aanmerkelijk zal kunnen verhogen.

Het fundamenteel wetenschappelijke onderzoek in dit project is van aangetoonde en excellente kwaliteit. De onderzoeksgroep beschikt over ruime ervaring met de gekozen onderzoeksstrategie en met de vijf beschreven type dierproeven.

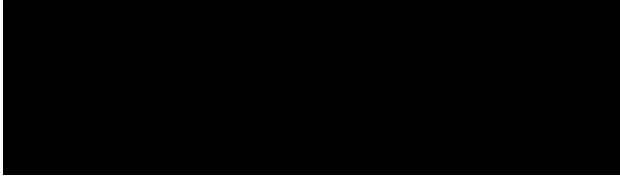
De classificatie van het ongerief van de dieren in de verschillende typen dierproeven is licht of matig. De intrinsieke waarde van het dier wordt door de laesiemodellen in lichte mate aangetast wanneer de toegebrachte schade resulteert in een lichte verlamming. Bij de uitvoeren van de dierproeven wordt een adequate invulling gegeven aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en verfijning van de dierproeven. De DEC onderschrijft dat de doelstellingen niet zonder het gebruik van proefdieren kunnen worden behaald.


De DEC is van mening dat de resultaten van dierproeven zullen bijdragen aan het behalen van het geformuleerde doel en schat de kans op het realiseren van de fundamenteel wetenschappelijke doelstellingen in als hoog. Het project is uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord. De verkregen fundamenteel wetenschappelijke kennis is essentieel om te komen tot een toepassing van regeneratieve (gen)therapieën in patiënten met zenuwweefselschade. De verwachting is dat deze nieuwe therapieën effectiever zullen zijn dan de huidige therapieën. Het gaat om een grote groep patiënten met uiteenlopende, op dit moment nog slecht behandelbare, aandoeningen. Het maatschappelijk belang is daarom groot.

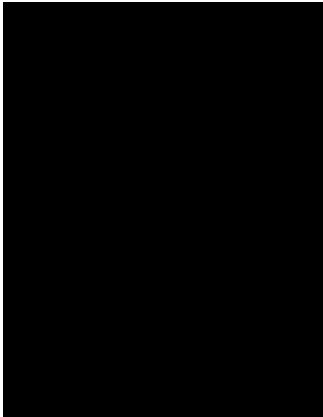
De DEC komt tot de conclusie dat de doeleinden van het project het voorgestelde gebruik van de proefdieren en het daarmee samenhangende ongerief van de proefdieren rechtvaardigt.

E. Advies


1. Advies aan de CCD
 - ✓ **De DEC adviseert de vergunning te verlenen**
2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.
3. Er zijn geen knelpunten of dilemma's gesignaleerd tijdens het beoordelen van de aanvraag of het formuleren van het advies.



Aan de CCD
t.a.v. 
Postbus 20401
2500 EK Den Haag



Amsterdam, 12 juni, 2015

Geachte mevrouw 

Hierbij beantwoord ik uw vragen betreffende het project "Developing strategies to promote repair or plasticity of the central and peripheral nervous system" met nummer AVD 801002015104 zoals gesteld in uw e-mails van 5 juni en 11 juni j.l.


Uw vraag (5 juni): In de beschrijving dierproeven 3.4.4.3; Injury models: Bij punt B beschrijft u in de eerste alinea een aantal van 750 genetisch gemodificeerde of WT muizen. Verderop in de tekst berekend u voor de injury models 900 ratten en 900 muizen. Het wordt uit de tekst niet helemaal helder of het totale aantal 750 GGO muizen + 900 ratten + 900 muizen is. Kunt u dit toelichten en als nodig in de tekst aanpassen?

Mijn antwoord: er zijn voor dit type dierproef in totaal 900 muizen en 900 ratten nodig. De berekening van het aantal muizen op 750 berust op een (reken)fout. In de tekst van 3.4.4.3 is voor beide diersoorten nu 900 aangehouden. In de NTS stond het juiste aantal dieren aangegeven. Bijgevoegd is een tabel met de dieren aantallen per appendix uitgesplitst naar diersoort en verwacht ongerief (Bijlage Table of Groups). Wij verzoeken u deze tabel als bijlage bij de PVA op te nemen in het dossier.

Uw vraag (5 juni): In beschrijving dierproeven 3.4.4.4; testing of the quality of viral vector batches, zit een tekstuele inconsequentie: bij punt A beschrijft u dat de handelingen "without surgically inflicted damage" plaatsvinden. Bij punt D refereert u aan "all surgical procedures". Kunt u bevestigen dat deze handelingen zonder chirurgie plaatsvinden? Mocht er wel chirurgie noodzakelijk zijn dan zou dit consequenties voor de ongerief inschatting "licht" kunnen hebben, kunt u dit toelichten?

Mijn antwoord: "all surgical procedures" onder punt D refereert naar de procedures die nodig zijn om de vector te injecteren en refereert niet naar het maken van een laesie. Het maken van een laesie is in dit type dierproef niet aan de orde. Dit is nu verwoord in de tekst van 3.4.4.4 onder D waar is toegevoegd:REQUIRED FOR VECTOR INJECTION....

Uw vraag (11 juni): U beschrijft het gebruik van ratten en muizen, de CCD hecht eraan het aantal in voorraad gedode dieren terug te dringen en heeft daarom de vraag of u in zijn algemeenheid kunt toelichten of u (behalve voor de fok); voor de experimentele procedures beide geslachten kunt gebruiken of in het geval u 1 geslacht gebruikt motiveren waarom dit is?





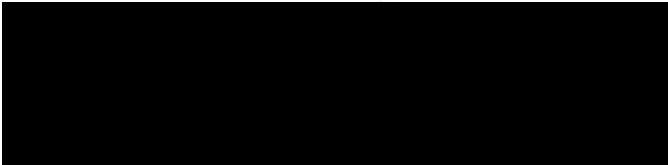
Mijn antwoord: we streven ernaar transgene lijnen te genereren en in stand te houden met een minimaal fokoverschot en gebruiken hiervoor zowel mannen als vrouwen. De experimentele procedures met *muizen* beschreven in Appendices 1 t/m 4 worden uitgevoerd op zowel vrouwen als mannen. Voor *ratten* geldt dat we deze aanschaffen bij een commerciële fokker. Vrijwel al onze experimentele procedures met ratten doen we met vrouwen omdat we willen uitsluiten dat er extra variatie ontstaat t.g.v. eventuele geslachtsverschillen.

Uw vraag (11 juni): In Bijlage 3.4.4.5. beschrijving dierproeven is punt H. niet volledig ingevuld, wij interpreteren dit als dat er NO in plaats van YES aangekruist had moeten worden.

Mijn antwoord: De muizen in Appendix 5 opgevoerd voor ongeriefmonitoring (n=840) zullen naar onze inschatting geen pijn ondervinden (licht ongerief) . Echter de muizen benodigd voor het genereren van TG lijnen (n=2250; gevasectomeerde mannen, donoren, fosters) zullen wel pijn ondervinden (matig ongerief). Zie ook de bijlage "Bijlage Table of Groups". Dit is de reden waarom we YES hebben aangekruist. De vraag is hoe binnen de kaders van het formulier duidelijk te maken dat er ook dieren zijn waarvoor NO van toepassing is. Ons voorstel is om zowel NO als YES aan te kruisen met een korte toelichting onder het YES met de volgende tekst: "Animals involved in welfare assessment (n = 840) will experience no pain. Animals involved in the generation of TG lines (n=2250) will experience pain as a consequence of the procedures and they receive adequate anaesthesia and analgesia."

Hopende u hiermee voldoende te hebben geïnformeerd.

Met vriendelijke groet,



Bijlagen:
Appendices 3, 4, 5 met correcties
AVD801002015104 - Bijlage Table of Groups

cc. DEC-KNAW



Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website (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'.

NVWA 80101

- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.

Netherlands Institute for Neuroscience

- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
#3	Injury models (functional and histological analysis): Injection of cells or viral vectors in lesioned animals.

Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

Our aim is to determine whether our identified target molecules and intervention methods (i.e. viral vector or cell-mediated gene delivery of a target, by using transgenic mice with overexpression or knock-down of a target) will improve both anatomical and functional recovery following a lesion to the brain, spinal cord, or peripheral nerve. Therefore, following a lesion we will perform several non-invasive function tests and/or an electrophysiological test on each

animal at several time points after induction of the lesion and the therapeutic intervention. This will provide insight in the full spectrum of the induced functional deficit and the degree of subsequent recovery of function per animal in time.

The brain, spinal cord or peripheral nerve lesions will be made by means of well-established surgical procedures. These lesion types are chosen because they represent clinically relevant injuries in which we can test the efficacy of a specific intervention. In different parts of the CNS different processes underlie degeneration and regeneration and it is therefore important to study different parts of the CNS (brain, spinal cord, spinal ganglion, peripheral nerve) and innervated target muscles.

The cells or viral vectors will be injected via small needles in the area of study.

Activation or inhibition of transgenes encoded in the viral vectors or transgene mouse via pharmaceuticals (e.g. doxycycline, tamoxifen) might be necessary to regulate transgene expression in time.

Intravenous application of a substrate (e.g. luciferine) might be necessary to perform an imaging study and visualize viral vector mediated expression of the reporter gene luciferase.

Assessment of recovery of function is obtained by performing multiple function tests at multiple time points.

Animals might be injected under anaesthesia with an antero/retrograde tracer prior to killing the animals to allow histological assessment of regeneration/sprouting process at the intermediate or the final stages of recovery.

At the end of the experiments in all cases the animals will be killed and tissues will be harvested for further analysis, allowing direct correlation between the individual degree of function recovery and histological parameters. These tissues can be subjected to: histological sectioning followed by immunohistochemical- or in-situ hybridisation staining or biochemical analysis (ELISA, FACS, Microarray, RNA/ DNA/ Protein extraction).

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

This procedure will consist of the following steps:

- 1) *Pre-training and baseline measurement of the animals using behavioural function tests.* Acclimatization of the animals to both the handling and testing-environment will result in reliable baseline data with little variation. This step involves:
 - a. Pre-training on our non-invasive function tests performed on freely moving animals to obtain baseline values (*max: 1x exposure/ test/ day, for 2 weeks*). In general, animals performing one or more non-invasive function tests including, for example: 1) cross a beam, rope or narrow corridor, walking from platform to platform without being forced. 2) Grip a horizontal bar and pull after which the maximum applied force is measured. 3) Walk in an open field or cylinder while being observed by the researcher who is scoring naturally behaviour 'events'. Dependent on the aim of the experiment the relevant test(s) and variants thereof will be selected and applied.
- 2) Baseline measurement of electrophysiological (CMAP) measurement under adequate anaesthesia. (*max: 2x*)
- 3) *Application of a lesion to the brain, spinal cord or peripheral nerve.* Under adequate anaesthesia and postoperative analgesia, the skull, spinal cord or peripheral nerve is exposed and a unilateral or bilateral lesion is made by means of damaging of a nerve tract.
 - a. *Brain:* injection of a toxin systemically (I.P.) or intracranially, or by means of mechanical injury with microscissors (*max 1x*).
 - b. *Spinal cord:* At cervical or thoracic or lumbar level, access to the spinal cord is gained and a uni- or bilateral lesion of the rubrospinal tract, corticospinal tract, dorsal column or dorsolateral columns is performed by means of microscissors (*max 1x*).
 - c. *Peripheral nerve:* After gaining access to the peripheral nerve lesion site, unilateral crush or transection or spinal root avulsion is performed. (*max 1x*).
- 4) *Viral vector or cell-mediated gene delivery of a target.* Under adequate anaesthesia and postoperative analgesia a (stereotaxic) injection of a viral vector (an control vector encoding GFP or 'repair experiments' with an experimental vector encoding a target gene) or of cells (control cells expressing GFP or cells expressing an experimental target gene), or of tissue grafts (virally transduced or not), in a specific brain area, spinal cord, spinal ganglion, peripheral nerve, or target muscle is performed.
 - a. In 80% of the experiments, the injection of the viral vector is performed simultaneously with the lesioning procedure resulting in only one

- exposure of the animal to surgery (*max 1x*).
- b. In 20% of the experiments, the target expression needs to be present prior- or after the lesion has been applied resulting in a separate surgery (*max 1x*).
- 5) Dependent on the viral vector system or transgenic mouse used, administration of transgene-inducing agent or pharmaceuticals are needed continuously or alternating, as follows:
 - a. Enteral: diet supplemented with doxycyclin (during certain periods of the experiment)
 - b. Parenteral: intravenous, intramuscular, intraperitoneal injection of luciferine a substrate for luciferase a reporter gene used to monitor the activity of some vectors. Subsequent imaging to visualize viral vector mediated expression of the reporter gene luciferase is performed in the IVIS under isoflurane anaesthesia. These measurements generally take 5 minutes, but maximally 30 minutes (*max 1x/wk, max 24x*).
 - c. Parenteral: I.P. injection of tamoxifen (*max 3x*).
 - 6) *Testing the efficacy of the treatment by assessment of recovery of function:* The initial loss and gradual gain of function occurs over a period of maximal 12 months and will be evaluated by performing a subset of the function tests as described in (1). The frequency of testing is:
 - a. Early following the lesion (first 4-8 weeks), (bi-) weekly tests need to be performed in order to evaluate the dynamics of this initial recovery phase.
 - b. After 4-8 weeks, gain of function will start to level off and a weekly- to bimonthly testing frequency up to the final 12th month is sufficient.
 - 7) *Testing the efficacy of the treatment by assessment of anatomical parameters:*
 - a. *Retrograde tracing to histologically visualize treatment efficacy prior to sacrifice.* Administration of an antero- or retrograde tracer by:
 1. Surgically exposing the peripheral nerve followed by tracer application under adequate anesthesia and analgesia (*max. 1x*)
 2. Surgically exposing the skull/spinal cord followed by intracranial or intraspinal tracer injection under adequate anesthesia and analgesia (*max.1 x*)
 - b. Perfusion fixation of animals at specific time points after the lesion by sacrificing the animals by administration of an overdose of barbiturate (I.P) followed by transcardial perfusion/fixation, or via CO₂/O₂ sedation followed by dissection of the relevant tissues for extensive histological analysis of the tissue response to the treatment.
 - 8) (Optional) Withdrawal of blood samples without anesthesia in the mouse, or under adequate anaesthesia in the rat. (*max 5x*).
 - 9) (Optional) Imaging by a light source (luminescence): the intravenous or intraperitoneal administration of luciferin under isoflurane anesthesia for a period of max 10 minutes (*max 2x week up over a period of maximally 12 months*).
 - 10) The animals will be sacrificed by administration of an overdose of barbiturate (I.P) followed by transcardial perfusion/fixation, or via CO₂/O₂ sedation followed by decapitation.

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

Quantitative analysis: prior to performing an experiment we perform statistical analysis (a power analysis) to ensure that we use the minimum number of animals per group that will be statistically sound and biological relevant.

Qualitative analysis (most of our experiments): the number is based in literature and/or years of experience with similar type of experiments. Moreover, these types of experiments will be performed sequentially in order to ensure that we will use the minimum number of rats or mice per group that is informative resulting in scientifically sound conclusions.

B. The animals

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

Mice: genetically modified and wild type; The mice are obtained from our own breedings or from a commercial licensed breeder.

Mice (adult): 900.

Rat (adult): 900. The rats are obtained from a commercial licensed breeder

The estimate of the total number of animals is primarily based on our experience over the past 5 years. This number of experiments and therefore the number of animals is dependent upon the number of involved researchers which is strongly dependent on the available funding. However, in general, an estimate for the total number of rats and mice is as follows: Function studies contain an average of 60 rats (containing experimental groups, positive-negative- and biological controls). In average 3 of these studies are performed each year, resulting in a total of 900 rats (5 year x 3 studies x n=60). The same is true for mouse function studies, resulting in 900 mice total.

Before we start our experiments we will write an application to the IvD. In this application we will exactly describe (among others) which considerations, facts and results have led to the proposition of the experiments, which specific question(s) we are trying to answer with the proposed animal experiments and what the ultimate goal is for the proposed experiments. Moreover we will describe in full detail the experimental design, argue the number of animals in the experiments, describe (i.a.) human endpoints, alternatives, nature of discomfort. Experiments will only be started upon IvD approval.

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.

The procedures described in this project are based on a large body of scientific- and experimental experience in both rats and mice. Testing of the intervention-techniques will be performed *in-silico* and *in-vitro* as much as possible prior to performing an animal experiment. However, to fully understand and study the proposed mechanisms/targets, animal studies are necessary as the complexity of the processes occurring following a lesion can only be achieved in a complete organism.

These studies are conducted in both rat and mouse worldwide, making translation and extrapolation of data between research-groups more feasible.

Experiments will be executed in succession and, if needed, small explorative studies will be performed to provide the necessary insight in variation and expected results. On basis of this previous work and experience, statistical analysis can be performed to determine the maximum number of animals needed to obtain valuable data.

In the case when transgenic mice are used; presence of an existing mouse line is checked, and/or an attempt is made to obtain the target transgenic mouse in as little breeding steps as possible, reducing breeding time and number of animals. In addition, mice with inducible alleles will be used when possible, resulting in a normal phenotype until induction.

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

All surgical procedures resulting in animal suffering or pain will be performed under adequate anaesthesia and analgesia. Close postoperative monitoring will be performed and humane endpoints applied. All available resources to reduce pain, fear or suffering will be employed. Procedures will only be performed by competent personnel, as mandatory. Adverse environmental effects are not present. All rats and mice will be socially housed and provided with tools for environmental enrichment. For some periods during the experiments they are housed under strict DM2, DM1 regulations (no discomfort consequences).

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 required.

The proposed experiments are not carried out as a result of legal requirements.

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 I.

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

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

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

anaesthesia and analgesia is used.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

As a result of the applied loss of innervation/ neurodegeneration, autotomy, a response consisting of excessive licking and biting at the affected area, might occur. In time this can lead to tissue damage. In our experience this behavior occurs mainly between 2-8 weeks post lesion and is *not* present in all types of lesions. Spinal cord and dorsal root lesions are the types of lesions were this occurs most frequently.

It is expected that in 33% of the experiments 2-5% of all animals will be experiencing these adverse effects to different degrees.

All animals will be frequently monitored for possible side effects.

Animals exhibiting any unexpected phenotype will be killed within a day.

Explain why these effects may emerge.

The precise mechanism behind autotomy is still largely unknown. This behaviour only occurs in an denervated area/limb and is in the majority of cases transient.

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

Animals will be monitored daily and if possible treatment will be initiated (topically or systemic).

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.

Weight loss (>20% weight loss compared to pre-operative bodyweight), abnormal/unexpected behaviour and/or posture, general signs of illness and/or discomfort. Autotomy. The discomfort will never be more that moderate.

Indicate the likely incidence.

Expected 2-5 % within time frame of the experiment.

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').

Moderate 100%. In most of the cases this discomfort is transient (1-2 days).

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 rats or mice will be killed for histological analysis.

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



Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website (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'.	NVWA80101	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Netherlands Institute for Neuroscience	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
	# 4	Testing of the quality of viral vector batches

Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

A primary aim of our research is to unravel new mechanisms that govern or hamper neuroregeneration or neuroplasticity. A key approach that we use to test the efficacy of a specific target molecule is viral vector-mediated gene transfer to neurons or glia cells. Although the viral vector technique has become more and more a standard technique, the generation of new viral vectors with potentially improved performance is an ongoing endeavor. For instance, of one of the most used viral vectors (adeno-associated viral vectors - AAV) an increasing number of variants ("serotypes") with specific cellular transduction profiles have

become available. Moreover we are currently developing vectors with regulatable transgene expression. Therefore it is necessary to have a protocol in place that allows testing the performance of newly generated vectors in small scale prior to their use in large animal experiments. A new vector batch that needs to be tested will only be tested in the tissue for which it is intended to be used later in the large experiment in which its efficacy is tested. Therefore this test protocol includes injections in the brain, spinal cord, peripheral nerve, and muscle without surgically inflicted damage.

Injection of a viral vector in the brain, spinal cord or the peripheral nerve or muscle will be performed by means of well-established (stereotactic) injection procedures. The typical primary outcome parameters that will be studied are: the transduction efficiency (number of cells transduced), the level of transgene expression per cell, the spread and cell type specificity obtained with a viral vector and, in the case of a regulatable viral vector, the inducibility and subsequent silencing of transgene expression.

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

This procedure can consist of the following steps:

- 1) Injection of a vector in the brain, spinal cord or the peripheral nerve or muscle. Dependent on the specific aim of the project for which the vector is generated the vector will be tested in the tissue of interest for that project (max. 1 x) For most vectors it will be sufficient to test the performance on a limited number of post-injection times, e.g. 2 weeks and 4 weeks. For other tests of viral vectors more elaborate testing will be required, e.g. for regulatable vectors where a gene is turned on and off.
- 2) Specific virus batch-dependent situations:
- 3) Dependent on the viral vector system or transgenic mouse used, administration of transgene-inducing agent or pharmaceuticals are needed continuously or alternating, as follows:
 - a. Enteral: diet supplemented with doxycyclin (during certain periods of the experiment)
 - b. Parenteral: intravenous, intramuscular, intraperitoneal injection of luciferine a substrate for luciferase a reporter gene used to monitor the activity of some vectors. Subsequent imaging to visualize viral vector mediated expression of the reporter gene luciferase is performed in the IVIS under isoflurane anaesthesia. These measurements generally take 5 minutes, but maximally 30 minutes (*max 1x/wk, max 24x*).
 - c. Parenteral: I.P. injection of tamoxifen (*max 3x*).

Vectors encoding the recombinase Cre will be tested in genetically modified mice that carry a floxed gene of interest or a floxed reporter gene which requires i.p injection of tamoxifen

- 4) At the end of the experiment the animals will be sacrificed by administration of an overdose of barbiturate (I.P) followed by transcardial perfusion/fixation, or via CO₂/O₂ sedation followed by decapitation. The expression of the transgene will be studied by histological analysis of the tissue or by biochemical analysis, e.g. and ELISA for GFP or GDNF.

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

We will not use statistical method to determine the number of animals in this particular procedure because the aim of this procedure is not to compare groups with different treatments. Based on previous experiments we know that an N=4 per group is normally sufficient to determine whether a viral vector batch works well or not. The N=4 is based on the following consideration: our injection techniques are well-established, however, occasionally we lose an animal because the injections does not go optimal. With an N=4 we always have at least 3 animals in which we will be able to investigate transgene expression.

B. The animals

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

Mice (adult): 180. Either commercial or wildtype/transgenic mice from our own breeding facility.

Rat (adult): 460. Commercially available.

The estimate of the total number of animals is primarily based on our experience over the past 5 years.

The number of experiments and therefore the number of animals is dependent upon the number of involved researchers which is strongly dependent on the available funding.

Adult mice. We estimate that a total number of 7 viral vector batches have to be tested in mice. We expect that 1 batch will have to be tested on 3 time points with 4 mice per time point. For the other 6 batches one time point would be sufficient, 4 mice per time point. Per year we need 36 mice. Total per 5 years: 180 mice. The justification of the use of mice is that we use viral vectors that express Cre, a recombinase, to knock-out a specific gene that is floxed in mice. The advantage of the use of Cre expressed via a viral vector is that this can be done in adult animals, that is in circumstances where the development of the animal has been completely normal.

Adult rats. We estimate that a total of 15 viral vector batches have to be tested in rats. Total rats per 5 years is 460. The justification of the use of rats is that our lesion and regeneration models are established in rats.

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.

The aim of this protocol is to test the performance of viral vector batches prior to their use in larger animal experiments. This avoids that batches that do not perform as required are not used in larger animal experiments. This "pre-screening" of the performance of a viral vector batch results in the reduction of the use of animals because it avoids the use of a "bad" batch in larger experiments that would fail if the pre-screen would not have been done. Pre-screening is also a form of refinement.

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

All surgical procedures **REQUIRED FOR VECTOR INJECTION** resulting in animal suffering or pain will be performed under adequate anaesthesia and analgesia. Close postoperative monitoring will be performed and humane endpoints followed. All available resources to reduce pain, fear or suffering will be employed.

Procedures will only be performed by competent personnel, as mandatory.

Adverse environmental effects are not present.

All rats and mice will be socially housed with the appropriate environmental enrichment under standard and when required DM2, DM1 conditions.

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 required.

The proposed experiments are not carried out as a result of legal requirements.

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 I.

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

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

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

anaesthesia and analgesia is used

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Effects due to the performed surgery.

Effects as a consequence of the biological effects of the applied vector. No discomfort is expected.

All animals will be frequently monitored for possible side effects. Animals exhibiting any unexpected phenotype? will be killed within a day.

Explain why these effects may emerge.

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

Animals will be monitored daily and if possible treatment will be initiated (topically or systemic).

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.

Weight loss (>20% weight loss compared to pre-operative bodyweight), abnormal/unexpected behaviour and/or posture, general signs of illness and/or discomfort.

Indicate the likely incidence.

Expected 2-5 % within time frame of the experiment.

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').

Mild 100%

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 rats or mice will be killed for histological analysis.

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



Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website (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 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|--------------------------------------------------------------|
| # 5 | Monitoring and generation of novel genetically modified mice |

Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

This procedure concerns the creation of genetically mice via DNA/RNA injection into oocyte, injection of genetically modified ES cells into blastocysts and/or via the CRISPR/Cas9 system. Moreover this procedure concerns the generation of crosses between mice with a floxed allele and Cre-expression mice lines in order to generate conditional null-mutant mice. As a consequence of this advanced breeding procedure mice may only have a gene deletion in a particular neuron or glia cell.

Welfare assessment of the novel mouse models will be performed according to the guidelines of the new EU directive. New transgenic lines and/or KO lines generated via classical methods and/or novel combinations of these aforementioned lines will be monitored for 2 generations to determine the absence or presence of mice with a deviant or hampered phenotype. Since whole body (compound) knock-outs will now be mostly replaced by cell specific knock-outs we expect that phenotypes will display considerable less adverse effects.

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

Generation of the mice according to classical methods:

1) Superovulation of donor mice.

- a) Administration of gonadotropin's (2 times) by subcutaneous or intraperitoneal injections followed by mating.
- b) Animals will be killed for the isolation of early (usually two or four cell stage) embryos.

2) Embryo recipients.

- a) Recipients for embryo transfer will be rendered pseudo pregnant by mating with a sterile (vasectomized) male.
- b) Genetically modified embryos will be implanted surgically or non-surgically into the reproductive tract.
- c) Embryo recipients, not as part of an experiment, will be killed after weaning of the pups at three weeks of age.

3) Weaned pups at 3 weeks of age: Tissue sampling for genotyping and/or identification via tail and earcut, respectively, under anesthesia (isoflurane).

Animals are killed by O2/CO2 method.

Welfare assessment:

Daily checks of the welfare of the mice on several common parameters (overall appearance, size, confirmation and growth, coat condition, behavior, clinical signs, relative size and numbers) as has been described in the Directive 2010/63/EU: corrigendum of 24 Jan. 2013

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

For these type of experiments statistical analysis is not performed since the purpose of the experiment is not to compare groups but to create viable novel mice lines for follow-up experiments. All techniques are state of the art and have been shown to be effective in generating GM mice with a smallest number of mice possible.

B. The animals

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

Mouse; *Mus musculus*: genetically modified and wild type adult mice. All mice are derived from the NIN, an establishment licensed by the NVA, or from a registered commercial company.

For generation of GM mice we expect, based on our extensive experience, to generate max. 15 new lines over the next 5 years. For the creation of a new GM mouse lines we will use on average max. 150 mice (according to the besluit biotechnologie). Based on these numbers in total a maximum of 2250 mice will be required.

Welfare assesment: we expect to generate over the next 5 years 15 new GM lines for which we have to perform the welfare assesment. For 2 generations, 7 males and 7 females control and GM mice. We therefore need in total: 15 (new (compound) lines) * 2 (generation) * 28 ((7 male +7 female = 14 GM mice +

(7 male + 7 female = 14 control mice)) = 840 mice for the welfare assessment.

Taken together within the context of this procedure we need 2250 + 840 mice = 3090 mice

A large portion of the newly generated GG mice will be floxed mice, which have no phenotype by definition, and which are not part of the welfare assessment protocol. We will not breed new GM mice showing a hampered phenotype.

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.

- (Vasectomized) males will also be used by the other groups of the NIN if required for their experiments, thereby reducing the number of (vasectomized) males used for the generation of GM mice.

Mice used for welfare assessment, might be used for experiments described in procedures 3.4.4.1, 3.4.4.2 and 3.4.4.3.

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.

We start the generation of a new GM mouse line only after we are convinced that based on molecular screens in human tissue or animals (procedure 3.4.4.1), and in vitro experiments (procedure 3.4.4.2) the creation of a new line is essential for in vivo functional and mechanistic studies. Animal studies are essential unavoidable if we want to obtain comprehensive knowledge on the function of specific genes in processes of neuroregeneration and plasticity. The CRISPR/Cas9 system allows us, if required, to genetically modify multiple (that is up to 5 different) genes in a single experiments. This may strongly reduce the number of mice used for the generation and/or breeding of these GM mice.

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

All possibilities to reduce pain, fear or suffering will be used. There are no negative environmental effects; all mice will be housed under well-controlled DM1 conditions.

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 required.

The proposed procedures are just fundamental research, it does not consist of legally required research.

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 I.

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

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

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

Animals involved in welfare assessment (n = 840) will experience no pain. Animals involved in the generation of TG lines (n=2250) will experience pain as a consequence of the procedures and they receive adequate anaesthesia and analgesia.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

We do not expect to find additional adverse effect. This is the direct result of how we create our constructs for the generation of GM mice.

Explain why these effects may emerge.

We do not expect to find other adverse effect.

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

Daily monitoring of our mice; immediate action will be taken immediately if unexpectedly any adverse effect will become visible.

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').

Vasectomized males: moderate

Donors: moderate 100%

Foster mothers: moderate 100%

GM mice: no to mild 100% (welfare assessment).

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 donor females will be killed as part of the experiments.

The foster females will be killed after the experiment (at the stage of weaning of the pups).

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

Type dierproef 1

Groep 1a	> ratten – adult – matig ongerief	240
Groep 1b	> muizen – adult – matig ongerief	240

Type dierproef 2

Groep 2a	> ratten – adult – licht ongerief	125 + 100
Groep 2b	> ratten – embryo's – licht ongerief	1000
Groep 2c	> ratten – pups (P1-P7) – licht ongerief	375
Groep 2d	> muizen – adult – licht ongerief	125 + 100
Groep 2e	> muizen – embryo's – licht ongerief	1000
Groep 2f	> muizen – P1-P7 – licht ongerief	375

Type dierproef 3

Groep 3a	> ratten – adult – matig ongerief	900
Groep 3b	> muizen – adult – matig ongerief	900

Type dierproef 4

Groep 4a	> ratten – adult – licht ongerief	460
Groep 4b	> muizen – adult – licht ongerief	180

Type dierproef 5

Groep 5a	> muizen – adult – licht ongerief	840	(welfare assessment)
Groep 5b	> muizen – adult – matig ongerief	2250	(generatie transgenen)

Cumulatief ratten: 3200

Ratten licht: $125 + 100 + 1000 + 375 + 460 = 2060 \Rightarrow 65\%$

Ratten matig: $240 + 900 = 1140 \Rightarrow 35\%$

Cumulatief muizen: 6010

Muizen licht: $125 + 100 + 1000 + 375 + 180 + 840 = 2620 \Rightarrow 44\%$

Muizen matig: $240 + 900 + 2250 = 3390 \Rightarrow 56\%$



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

KNAW,
Postbus 19121
1000GC Amsterdam

**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

T 0900-2800028 (10 ct /min)
ZBO-CCD@minez.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD801002015104

Uw referentie
-

Bijlagen
1

Datum 24 juni 2015
Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte

Op 22 mei 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven digitaal ontvangen. Het gaat om uw project "Developing strategies to promote repair or plasticity of the central and peripheral nervous system" met aanvraagnummer AVD801002015104. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 12 juni 2015 heeft u uw aanvraag aangevuld op basis van door het secretariaat van de CCD gestelde vragen.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag onder voorwaarde goed op grond van artikel 10a van de Wet op de dierproeven (hierna de wet). U kunt met uw project "Developing strategies to promote repair or plasticity of the central and peripheral nervous system" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 juli 2015 tot en met 30 juni 2020.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-KNAW 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- en regelgeving liggen ten grondslag aan 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 gegevens in het colofon.

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.

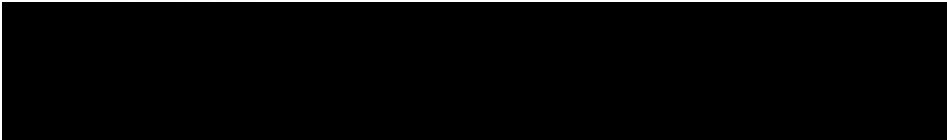
Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op <http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

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 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:
- DEC-advies
 - Weergave wet- en regelgeving



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan
Naam: KNAW, Nederlands Herseninstituut
Adres: Postbus 19121
Postcode en woonplaats: 1000 GC Amsterdam
Deelnemersnummer: 80100

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 juli 2015 tot en met 30 juni 2020, voor het project "Developing strategies to promote repair or plasticity of the central and peripheral nervous system" met aanvraagnummer AVD801002015104, volgens advies van dierexperimentencommissie DEC-KNAW.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is group leader, group regeneration of sensory motor systems.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 22 mei 2015.
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 22 mei 2015;
 - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 22 mei 2015;
 - c. Advies van dierexperimentencommissie d.d. 22 mei 2015, ontvangen op 22 mei 2015.
 - d. Aanvullingen ontvangen op 12 juni 2015

Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst
Dierproef 1: Molecular screens: Sacrifice of mice or rats following a lesion and/or intervention with a viral vector to obtain neural tissue for molecular screens	Ratten- adult	240	Matig
	Muizen -adult	240	Matig
Dierproef 2: Sacrifice of embryos of rats or mice or of adult rats or mice to obtain tissues for cell culture and bioassays.	Ratten -adult	225	Licht
	Ratten-embryo	1000	Licht
	Ratten- P1-P7	375	Licht
	Muizen -adult	225	Licht
	Muizen-embryo	1000	Licht
Dierproef 3: Injury models (functional and histological analysis): Injection of cells or viral vectors in lesioned animals.	Ratten- adult	900	Matig
	Muizen -Adult	900	Matig
Dierproef 4: Testing of the quality of viral vector batches	Ratten -Adult	460	Licht
	Muizen -Adult	180	Licht
Dierproef 5: Monitoring and generation of novel genetically modified mice	Muizen- adult	840	Licht
	<i>Welfare assessment</i>		
	Muizen -adult <i>Genereren transgenen</i>	2250	Matig

Aanvullende voorwaarden:

In Artikel 10, eerste lid, onder a, Wet op de dierproeven, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

Volgens artikel 10c van de Wet op de dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g. 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 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.

[REDACTED]

Van: ZBO-CCD
Verzonden: vrijdag 22 mei 2015 14:32
Aan: 'secretariaat DEC'
CC: [REDACTED]
Onderwerp: ontvangstbevestiging AVD801002015104
Bijlagen: ontvangsbevestiging aanvraag projectvergunning dierproeven AVD
801002015104.pdf

Geachte heer/mevrouw,

Hierbij zenden wij u per mail een ontvangstbevestiging AVD/801002015104: Ontwikkeling van strategieën om zenuwweefselregeneratie te bevorderen. Deze zal ook per post worden verzonden.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven www.zbo-ccd.nl
Nationaal Comité advies proefdierbeleid

Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag

[REDACTED]

Van: ZBO-CCD
Verzonden: vrijdag 5 juni 2015 15:40
Aan: [REDACTED]
Onderwerp: tekstuele aanpassing AVD801002015104

Geachte meneer [REDACTED]

Zojuist heb ik gevraagd om enkele tekstuele verduidelijking voor projectaanvraag: "Developing strategies to promote repair or plasticity of the central and peripheral nervous system" met nummer AVD 801002015104 . Omdat dit om enkel tekstuele verduidelijking gaat en niet om inhoudelijke vraagstelling wordt deze mail parallel aan aanvrager en DEC gestuurd,

Vraag:

In de beschrijving dierproeven 3.4.4.3 ; Injury models: Bij punt B beschrijft u in de eerste alinea een aantal van 750 genetisch gemodificeerde of WT muizen. Verderop in de tekst berekend u voor de injury models 900 ratten en 900 muizen. Het wordt uit de tekst niet helemaal helder of het totale aantal 750 GGO muizen + 900 ratten + 900 muizen is. Kunt u dit toelichten en als nodig in de tekst aanpassen?

In beschrijving dierproeven 3.4.4.4; testing of the quality of viral vector batches, zit een tekstuele inconsequentie: bij punt A beschrijft u dat de handelingen "without surgically inflicted damage" plaatsvinden . Bij punt D refereert u aan "all surgical procedures" . Kunt u bevestigen dat deze handelingen zonder chirurgie plaatsvinden? Mocht er wel chirurgie noodzakelijk zijn dan zou dit consequenties voor de ongerief inschatting "licht" kunnen hebben, kunt u dit toelichten?

Vriendelijke groet, [REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven
www.zbo-ccd.nl

.....
Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag
.....

[REDACTED]

Van: ZBO-CCD
Verzonden: donderdag 11 juni 2015 14:47
Aan: [REDACTED]
Onderwerp: FW: AVD801002015104 tekstuele uitleg/aanpassing

Geachte [REDACTED]

In aanvulling op onderstaande mail betreffende uw project: "Developing strategies to promote repair or plasticity of the central and peripheral nervous system" met nummer AVD 801002015104. Zijn er nog een paar vragen. Excuses dat deze beoordeling gefaseerd gaat, hopelijk is het voor u nog mogelijk de antwoorden in een keer te doen en hebben deze berichten elkaar niet gekruist.

U beschrijft het gebruik van ratten en muizen, de CCD hecht eraan het aantal in voorraad gedode dieren terug te dringen en heeft daarom de vraag of u in zijn algemeenheid kunt toelichten of u (behalve voor de fok) ; voor de experimentele procedures beide geslachten kunt gebruiken of in het geval u 1 geslacht gebruikt motiveren waarom dit is?

In Bijlage 3.4.4.5. beschrijving dierproeven is punt H. niet volledig ingevuld, wij interpreteren dit als dat er NO in plaats van YES aangekruist had moeten worden.

Met vriendelijke groet [REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag
.....

Van: ZBO-CCD
Verzonden: vrijdag 5 juni 2015 15:33
Aan: [REDACTED]
Onderwerp: AVD801002015104 tekstuele uitleg/aanpassing

Geachte [REDACTED]

Uw aanvraag getiteld ; "Developing strategies to promote repair or plasticity of the central and peripheral nervous system" met nummer AVD 801002015104 is ontvangen en in behandeling genomen. Er zijn twee tekstuele onduidelijkheden in de bijlage dierproeven waarvan we u willen vragen deze te verduidelijken en aan te passen zodat het aantal dieren en ongerief inschatting met elkaar in overeenstemming is.

In de beschrijving dierproeven 3.4.4.3 ; Injury models: Bij punt B beschrijft u in de eerste alinea een aantal van 750 genetisch gemodificeerde of WT muizen. Verderop in de tekst berekend u voor de injury models 900 ratten en 900 muizen. Het wordt uit de tekst niet helemaal helder of het totale aantal 750 GGO muizen + 900 ratten + 900 muizen is. Kunt u dit toelichten en als nodig in de tekst aanpassen?

In beschrijving dierproeven 3.4.4.4; testing of the quality of viral vector batches, zit een tekstuele inconsequentie: bij punt A beschrijft u dat de handelingen "without surgically inflicted damage" plaatsvinden . Bij punt D refereert u aan "all surgical procedures" . Kunt u bevestigen dat deze handelingen zonder chirurgie plaatsvinden? Mocht er wel chirurgie noodzakelijk zijn dan zou dit consequenties voor de ongerief inschatting "licht" kunnen hebben, kunt u dit toelichten?

Met vriendelijke groet, [REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven

www.zbo-ccd.nl

.....

Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag

.....

[REDACTED]

Van: secretariaat DEC [REDACTED]
Verzonden: vrijdag 12 juni 2015 13:28
Aan: [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: AVD-801002015-104 tekstuele uitleg/aanpassing

Categorieën: [REDACTED]

Geachte mevrouw [REDACTED]

Namens [REDACTED] heb ik zojuist via Webftp een aantal files gestuurd met een brief met de antwoorden op de gestelde vragen alsmede een bijstelling van een aantal bijlagen en een tabel met een overzicht van het aantal dieren.

Met vriendelijke groeten,

[REDACTED] DEC-KNAW

From: [REDACTED]
Sent: Thursday, June 11, 2015 2:49 PM
To: secretariaat DEC
Subject: FW: AVD801002015104 tekstuele uitleg/aanpassing

Geachte heer [REDACTED]

Onderstaande mail is zojuist aan de onderzoeker verzonden met het verzoek op het punt van het gebruik van beide geslachten nog een toelichting te geven.

Vriendelijke groet, [REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag
.....

Van: ZBO-CCD
Verzonden: donderdag 11 juni 2015 14:47
Aan: [REDACTED]
Onderwerp: FW: AVD801002015104 tekstuele uitleg/aanpassing

Geachte [REDACTED],

In aanvulling op onderstaande mail betreffende uw project: "Developing strategies to promote repair or plasticity of the central and peripheral nervous system" met nummer AVD 801002015104. Zijn er nog een paar vragen. Excuses dat deze beoordeling gefaseerd gaat, hopelijk is het voor u nog mogelijk de antwoorden in een keer te doen en hebben deze berichten elkaar niet gekruist.

U beschrijft het gebruik van ratten en muizen, de CCD hecht eraan het aantal in voorraad gedode dieren terug te dringen en heeft daarom de vraag of u in zijn algemeenheid kunt toelichten of u (behalve voor de fok) ; voor de

experimentele procedures beide geslachten kunt gebruiken of in het geval u 1 geslacht gebruikt motiveren waarom dit is?

In Bijlage 3.4.4.5. beschrijving dierproeven is punt H. niet volledig ingevuld, wij interpreteren dit als dat er NO in plaats van YES aangekruist had moeten worden.

Met vriendelijke groet [REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag
.....

Van: ZBO-CCD
Verzonden: vrijdag 5 juni 2015 15:33
Aan: [REDACTED]
Onderwerp: AVD801002015104 tekstuele uitleg/aanpassing

Geachte [REDACTED]

Uw aanvraag getiteld ; "Developing strategies to promote repair or plasticity of the central and peripheral nervous system" met nummer AVD 801002015104 is ontvangen en in behandeling genomen. Er zijn twee tekstuele onduidelijkheden in de bijlage dierproeven waarvan we u willen vragen deze te verduidelijken en aan te passen zodat het aantal dieren en ongerief inschatting met elkaar in overeenstemming is.

In de beschrijving dierproeven 3.4.4.3 ; Injury models: Bij punt B beschrijft u in de eerste alinea een aantal van 750 genetisch gemodificeerde of WT muizen. Verderop in de tekst berekend u voor de injury models 900 ratten en 900 muizen. Het wordt uit de tekst niet helemaal helder of het totale aantal 750 GGO muizen + 900 ratten + 900 muizen is. Kunt u dit toelichten en als nodig in de tekst aanpassen?

In beschrijving dierproeven 3.4.4.4; testing of the quality of viral vector batches, zit een tekstuele inconsequentie: bij punt A beschrijft u dat de handelingen "without surgically inflicted damage" plaatsvinden . Bij punt D refereert u aan "all surgical procedures" . Kunt u bevestigen dat deze handelingen zonder chirurgie plaatsvinden? Mocht er wel chirurgie noodzakelijk zijn dan zou dit consequenties voor de ongerief inschatting "licht" kunnen hebben, kunt u dit toelichten?

Met vriendelijke groet, [REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven
www.zbo-ccd.nl

.....
Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag
.....

De Rijksdienst voor Ondernemend Nederland (RVO.nl) stimuleert Duurzaam, Agrarisch, Innovatief en Internationaal ondernemen. RVO.nl is per 2014 ontstaan uit de fusie van Agentschap NL en Dienst Regelingen.

Dit bericht kan informatie bevatten die niet voor u is bestemd. Indien u niet de geadresseerde bent of dit bericht abusievelijk aan u is gezonden, wordt u verzocht dat aan de afzender te melden en het bericht te verwijderen.

De Staat aanvaardt geen aansprakelijkheid voor schade, van welke aard ook, die verband houdt met risico's verbonden aan het elektronisch verzenden van berichten.

This message may contain information that is not intended for you. If you are not the addressee or if this message was sent to you by mistake, you are requested to inform the sender and delete the message.

The State accepts no liability for damage of any kind resulting from the risks inherent in the electronic transmission of messages.

[REDACTED]

Van: ZBO-CCD
Verzonden: donderdag 18 juni 2015 16:37
Aan: [REDACTED]
Onderwerp: betaling AVD2015104 mogelijk dubbel ontvangen

Geachte [REDACTED]

Voor uw project aanvraag hebben wij de leges ontvangen, maar uit onze administratie blijkt dat wij deze betaling mogelijk 2x hebben ontvangen op zowel 9-6-15 als op 16-6-15. Omdat ik geen gegevens van uw financiële afdeling heb hoop ik dat u deze vraag door kunt sturen.

Ik voeg de betalingskenmerken bij,

[REDACTED]

[REDACTED]

Vriendelijke groet, [REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag
.....

Inventaris Wob-verzoek W15-11									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTS 2015116								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Niet-technische samenvatting	x							
3	Projectvoorstel				x			x	
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1				x			x	
5	Melding machtiging				x		x	x	
6	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
7	DEC-advies				x		x	x	
8	Advies CCD		x						x
9	Mail vraag DEC 17-7-2015				x		x	x	
10	Beschikking en vergunning				x		x	x	



09 JULI 2015

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 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 77100 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen																								
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">Naam instelling of organisatie</td> <td colspan="2">Stichting AERES groep</td> </tr> <tr> <td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td> <td colspan="2">[REDACTED]</td> </tr> <tr> <td>KvK-nummer</td> <td>41246832</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Straat en huisnummer</td> <td>Bovenbuurtweg</td> <td>27</td> </tr> <tr> <td>Postbus</td> <td colspan="2">245</td> </tr> <tr> <td>Postcode en plaats</td> <td>6717 XA</td> <td>Ede</td> </tr> <tr> <td>IBAN</td> <td colspan="2">NL46ABNA0546859348</td> </tr> <tr> <td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td> <td colspan="2">AERES Groep in Ede</td> </tr> </table>	Naam instelling of organisatie	Stichting AERES groep		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]		KvK-nummer	41246832		Straat en huisnummer	Bovenbuurtweg	27	Postbus	245		Postcode en plaats	6717 XA	Ede	IBAN	NL46ABNA0546859348		Tenaamstelling van het rekeningnummer	AERES Groep in Ede	
Naam instelling of organisatie	Stichting AERES groep																									
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]																									
KvK-nummer	41246832																									
Straat en huisnummer	Bovenbuurtweg	27																								
Postbus	245																									
Postcode en plaats	6717 XA	Ede																								
IBAN	NL46ABNA0546859348																									
Tenaamstelling van het rekeningnummer	AERES Groep in Ede																									
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>	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">(Titel) Naam en voorletters</td> <td>[REDACTED]</td> <td><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td colspan="2">PTC+ Barneveld</td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> <td colspan="2">[REDACTED]</td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td colspan="2">[REDACTED]</td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie	[REDACTED]		Afdeling	PTC+ Barneveld		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]										
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.																								
Functie	[REDACTED]																									
Afdeling	PTC+ Barneveld																									
Telefoonnummer	[REDACTED]																									
E-mailadres	[REDACTED]																									
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">(Titel) Naam en voorletters</td> <td>[REDACTED]</td> <td><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td colspan="2">Groenhorst Barneveld</td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> <td colspan="2">[REDACTED]</td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td colspan="2">[REDACTED]</td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie	[REDACTED]		Afdeling	Groenhorst Barneveld		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]										
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.																								
Functie	[REDACTED]																									
Afdeling	Groenhorst Barneveld																									
Telefoonnummer	[REDACTED]																									
E-mailadres	[REDACTED]																									
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">(Titel) Naam en voorletters</td> <td>[REDACTED]</td> <td><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td colspan="2">Groenhorst Barneveld</td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> <td colspan="2">[REDACTED]</td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td colspan="2">[REDACTED]</td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie	[REDACTED]		Afdeling	Groenhorst Barneveld		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]										
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.																								
Functie	[REDACTED]																									
Afdeling	Groenhorst Barneveld																									
Telefoonnummer	[REDACTED]																									
E-mailadres	[REDACTED]																									

- 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 [redacted] Dhr. Mw.
- Functie [redacted]
- Afdeling PTC+ Barneveld
- Telefoonnummer [redacted]
- E-mailadres [redacted]
- 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 1 - 1 - 2016
- Einddatum 1 - 1 - 2019
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Onderzoek naar alternatief huisvestingssysteem voor vleeskuikens
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Onderzoek naar alternatief huisvestingssysteem voor vleeskuikens
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC DEC Consult
- Postadres [redacted]
- E-mailadres [redacted]

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- Nieuwe aanvraag Projectvergunning € Lege
- Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
- Via een eenmalige incasso
- Na ontvangst van de factuur
- 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.*

5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
- Verplicht
- Projectvoorstel
- Niet-technische samenvatting
- Overige bijlagen, indien van toepassing
- Melding Machtiging
-

6 Ondertekening

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

Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). 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 [REDACTED] Portefeuillehouder en projectverantwoordelijke

Plaats [REDACTED]

Datum [REDACTED] 8 - 7 - 2015

Handtekening [REDACTED]



Format Projectvoorstel dierproeven

- Dit format gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
- Bij dit format hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
- Meer informatie over het projectvoorstel vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul de titel van het project in.

2 Categorie van het project

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

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

Licht het project toe. Beschrijf de aanleiding, de achtergrond en de context. Besteed aandacht aan de bij vraag 2 aangekruiste categorieën.

- Geef in geval van 'wettelijk vereiste dierproeven' aan welke wettelijke eisen (in relatie tot beoogd gebruik en markttoelating) van toepassing zijn.
- Geef in geval van 'routinematige productie' aan welk(e) product(en) het betreft en voor welke toepassing(en).
- Geef in geval van 'hoger onderwijs of opleiding' aan waarom in dit project, in relatie tot het

opleidingsprogramma en eindtermen, is gekozen voor dierproeven.

In Europa en Nederland worden voor vleeskuikens diverse huisvestingssystemen met verschillende typen strooisel toegepast. Volgens de bestaande wet- en regelgeving dienen vleeskuikens in de toegestane dierbezetting per m² de beschikking te hebben over voldoende strooisel van goede kwaliteit en strooisel in goede conditie. In de praktijk zijn een aantal zaken, die in meerdere of mindere mate met het gebruik van strooisel (dat tijdens het verblijf van de vleeskuikens in toenemende mate met mest vervuild wordt) gerelateerd zijn:

- De ontwikkeling van hoge ammoniakgehalten in de leefomgeving van de vleeskuikens (en tevens in de omgeving van de stal)
- Het ontstaan van hoge fijn stof gehalten in de stal en de omgeving
- Voetzoollaesies en borstblaren bij de vleeskuikens door het intensieve contact met vervuild strooisel
- Luchtweginfecties bij de vleeskuikens als gevolg van de veranderingen in stalklimaat en stallucht door genoemde niet optimale ammoniak- en fijn stof gehalten
- Als gevolg van deze aandoeningen verhoogd gebruik van antibiotica
- Hierdoor verhoogd risico op het ontstaan van antibiotica resistentie (voor mens en dier)

Mogelijk zijn er hierbij verschillen tussen rassen/merken vleeskuikens (o.a. met verschil in groeisnelheid); dit wordt in het project meegenomen als speerpunt.

Buiten Europa en met name in Azië is het gebruikelijk om dieren op kunststof roosters te houden. Vanuit [REDACTED] is daar ervaring mee opgedaan door het [REDACTED] te introduceren. Dieren leven in het [REDACTED] op kunststof roosters en blijven dan in het algemeen vrij van borstblaren, voetzoollaesies. Onderzoek heeft uitgewezen, dat de dieren gezonder zijn, sneller groeien, minder energie verspillen (lagere FCR [voederconversie, dus minder voerverbruik per kg groei] en minder antibiotica nodig hebben.

In Europa is er in de hier gebruikte huisvestingssystemen ervaring met NH₃-reductie door middel van mestbandbeluchting en mestdroogtunnels.

Deze beide technieken (Alternatief huisvestingsstelsel + klimaatoptimalisatie/ionisatie) worden in dit project geïntegreerd in één integraal stalconcept: weliswaar een innovatie, maar waarvan alle afzonderlijke delen reeds beproefd zijn. De risico's voor de dieren van deze integratie van de delen zijn beperkt en overzichtelijk.

Er is er voor gekozen om dit nieuwe stalconcept in een experimentele setting te onderzoeken. De omvang van deze setting (het aantal gehuisveste vleeskuikens) is de minimale omvang waarbij voor de praktijk nog zinvolle en relevante conclusies kunnen worden getrokken. In kleinere units zijn bijvoorbeeld de bestaande technische installaties niet toepasbaar.

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

- In het geval het project gericht is op één of meer onderzoeksdoelen: op welke vra(a)g(en) dient dit

project antwoord(en) te verschaffen?

- In geval het een ander dan een onderzoeksdoel betreft: in welke concrete behoefte voorziet dit project?

Het uiteindelijke doel is een compleet beeld te krijgen van de meerwaarde van het innovatieve houderijconcept (het alternatieve stalsysteem + mestdroging) op het gebied van diervriendelijkheid, milieu, gezondheid, voedselveiligheid en economie.

Concreet richt het in dit project voorgestelde onderzoek zich op de wetenschappelijke onderbouwing van de onderstaande verwachtingen. Tevens wordt het systeem in de praktische situatie van de vleeskuikenunit met vleeskuikens getoetst en evt. verder doorontwikkeld.

:

1. Verbetering van gezondheid en welzijn van vleeskuikens door ammoniak- en fijn stof reductie verlaging van de hoeveelheid mest in de omgeving van de dieren
2. Door verbetering van het stalklimaat zijn er minder gezondheidsaandoeningen en daardoor minder gebruik van antibiotica en andere medicijnen.
3. Door verminderd contact met mest zal het aantal borstblaren en voetzoollaesies afnemen en daardoor zullen er minder afkeuringen bij het slachten zijn.
4. Het ontladen van de kuikens aan het einde van de ronde middels het inzetten van de transportbanden voorkomt ruw omgaan met de dieren, voorkomt uitval, verhoogt het rendement en reduceert dierenleed.
5. Bij het verwachte hoge reductiepercentage van ammoniak en fijn stof in de stal, zijn (vaak duurdere) nageschakelde technieken overbodig.
6. Gedroogde mest is een te verkopen product.
7. Door een verbeterd stalklimaat en gezondere vleeskuikens kunnen de technische resultaten van de kuikens toenemen, met name door een verbetering van de voerefficiëntie. Verminderd energieverbruik en verbeterde voerconversie leveren de vleeskuikenhouder economisch voordeel op.
8. Dossieropbouw voor toelating van dit systeem op de Europese markt

Naast deze technische en economische aspecten zullen in het kader van dit project ook de volgende zaken worden onderzocht:

9. De effecten van flexibele plastic roostervloeren op het gedrag van de kuikens.
10. De rol van zowel de gewenste verhouding strooisel- en roosteroppervlakte, het moment en de frequentie van aanbieden van nieuw strooisel en optimale indeling in andere benodigde functiegebieden op het gedrag van de kuikens.
11. Zijn er hierbij verschillen tussen verschillende rassen/merken vleeskuikens?

De stalunit, waarin het project plaats vindt, wordt door een samenwerkingsverband van bedrijven en organisaties in een nieuwbouwsituatie gerealiseerd. De vleeskuiken unit en de technische installaties zijn geheel op maat voor de (innovatieve) projectsituatie ingericht. De partners in het samenwerkingsverband hebben allen reeds tientallen jaren ervaring op hun expertisegebied. Leading partners in het project is de [REDACTED] (kennisinstelling op HBO, MBO en VMBO niveau met specialisme op het gebied van pluimvee-onderwijs en praktijkonderzoek) [REDACTED] heeft een lectoraat gezonde pluimveehouderij (hierbinnen worden HBO studenten ingezet voor praktijkonderzoek). Totaal 8500 studenten en meer dan 100 medewerkers. [REDACTED] en haar rechtsvoorgangers bestaan reeds 60 jaar, het specialisme pluimvee eveneens. Sinds 2013 is [REDACTED] de projectleider van het [REDACTED]. De belangrijkste bedrijven in het samenwerkingsverband van het project zijn [REDACTED]

[REDACTED]

3.3 Belang

Beschrijf het wetenschappelijk en/of maatschappelijk belang van de hierboven beschreven doelstelling(en).

Wetenschappelijk belang:

Het op een systematische wetenschappelijk verantwoorde wijze evalueren van een innovatief huisvestingsysteem voor vleeskuikens. Dit is een belangrijke bijdrage aan de tot nu toe niet systematisch verzamelde data met betrekking tot dit huisvestingsysteem. Het biedt een beter uitzicht op een verantwoorde afweging/vergelijking met de op dit moment gangbare huisvestingsystemen voor vleeskuikens in Europa. Het project betreft een studie die past in de context van bestaande houderijsystemen.

Maatschappelijk belang

- Consument kan een hoogwaardiger product verwachten: gezonder, minder restproducten
- Welzijnsverbetering van vleeskuikens
- Reductie van ammoniak en fijn stof in milieu
- Reductie van antibiotica gebruik in de vleeskuikenhouderij

Economisch voordeel voor de vleeskuikenhouder.

3.4 Onderzoeksstrategie

3.4.1 Geef een overzicht van de algemene opzet van het project (strategie).

Vergelijkbare systemen van flexibele roostervloeren zijn in het buitenland reeds op uitgebreide schaal (ook met koppels vleeskuikens groter dan 1000) getest. Hier zijn niet systematisch data van verzameld. Het voor dit project gebruikte systeem is verder ontwikkeld en geïnnoveerd.

De flexibele kunststof roostervloeren, het strooisel en het overige equipment (o.a. mestbanden) worden voordat de eerste ronde vleeskuikens geplaatst is, getest op werking en deugdelijkheid in de praktijk. Zo nodig worden aanpassingen toegepast (op basis van de ervaringen tijdens het project worden zaken aangepast). Het doel is dat aan het einde van de projectperiode een voor de praktijk optimaal systeem is ontwikkeld dat voldoet aan de regelgeving en als zodanig op de markt kan worden gebracht.

De resultaten zullen in alle gevallen worden vergeleken met de op grote schaal aanwezige historische data van vleeskuikens in de gebruikelijke houderij systemen. (Aanvullende) veldstudies maken geen onderdeel uit van dit project.

Afhankelijk van de resultaten van het project zal het houderijsysteem op de gebruikelijke schaal in pluimveestallen worden getest en geïmplementeerd. Het te beproeven huisvestingsysteem is wettelijk nog niet toegestaan, hiervoor dient separaat toestemming te worden aangevraagd. Afhankelijk van de afweging/beoordeling of de strooiseldouche voldoet aan de huidige regelgeving kan dit binnen de bestaande regelgeving of dient de regelgeving te worden aangepast.

3.4.2 Geef een overzicht op hoofdlijnen van de verschillende onderdelen van het project en de daarbij gebruikte type(n) dierproef of dierproeven.

Er is in dit project in feite sprake van één hoofdlijn en één type dierproef. Deze staat

beschreven in appendix (3.4.4.1)

Binnen deze hoofdlijn en door verschillende keren in feite hetzelfde experiment met al of niet andere waarden van de experimentele parameters uit te voeren worden de volgende aspecten van het houderijsysteem onderzocht:

- Technische aspecten
- Economische aspecten
- Milieu effecten
- Dieren gedrag/welzijnsaspecten.

De resultaten zullen in alle gevallen worden vergeleken met de op grote schaal aanwezige historische data van vleeskuikens in de gebruikelijke houderij systemen.

3.4.3 Beschrijf en benoem de logische samenhang van deze verschillende onderdelen en de eventuele fasering in de uitvoering. Vermeld eventuele mijlpalen en keuzemomenten.

Alle experimenten hebben het zelfde design en worden uitgevoerd in de experimentele vleeskuikenuit met elke keer 1000 vleeskuikens. Elke ronde vormt (o.a. door de variabelen aan te passen en het systeem van flexibele kunststofroosters, mestband, strooiselvoorziening op basis van de verzamelde data en ervaringen telkenmale te optimaliseren) een logisch onderdeel voor het verkrijgen van een onderbouwing met data voor de hypothese dat de in de praktijksituatie/-proeven met dit innovatieve houderijsysteem de onder 3.2 genoemde doelen gerealiseerd worden. Hiertoe vindt, zoals aangegeven, tijdens de rondes dagelijks of periodiek onderzoek plaats en worden technische, economische, milieu en diergedrag/welzijn data verzameld. De drie belangrijkste variabelen in deze experimenten zijn:

1. Type vleeskuikens (snel groeiend – langzaam groeiend)
2. Soort voer en voerverstrekking (met name i.v.m. relatie voer[eiwit] en het optreden van voetzollaesies)
3. Toepassingsvormen van de strooiseldouche

Inherent aan de aanwezigheid van één onderzoeksofstelling worden alle experimenten gefaseerd uitgevoerd en bepalen de verkregen uitkomsten de keuze van de experimentele variabelen in het volgende experiment.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Onderzoek naar een flexibel kunststof vloersysteem en strooiseldouche voor vleeskuikens
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Bijlage

Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	77100				
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Stichting AERES groep Bovenbuurtweg 27 6717 XA Ede				
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in. <i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>	<table><thead><tr><th>Volgnummer</th><th>Type dierproef</th></tr></thead><tbody><tr><td>1</td><td>Onderzoek naar een flexibel kunststof vloersysteem en strooiseldouche voor vleeskuikens</td></tr></tbody></table>	Volgnummer	Type dierproef	1	Onderzoek naar een flexibel kunststof vloersysteem en strooiseldouche voor vleeskuikens
Volgnummer	Type dierproef					
1	Onderzoek naar een flexibel kunststof vloersysteem en strooiseldouche voor vleeskuikens					

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Het project wordt uitgevoerd in een experimentele vleeskuikenuit, waarin voer- en watervoorziening en de overige verzorging van de dieren in overeenstemming is met de geldende normen. In deze unit worden in elke ronde (=experiment) 1000 vleeskuikens gehouden. Elke ronde vormt (o.a. door het toepassen van verschillende experimentele variabelen en het systeem van flexibele kunststofroosters, mestband, strooiselvoorziening op basis van de verzamelde data en ervaringen telkenmale te optimaliseren) een logische stap in het verkrijgen van een onderbouwing voor de hypothesen die ten grondslag liggen aan dit project. Binnen het voorgestelde onderzoek zijn de drie belangrijkste variabelen:

- 1. Type vleeskuikens (snel groeiend – langzaam groeiend)
- 2. Soort voer en voerverstrekking (met name i.v.m. relatie voer[eiwit] en het optreden van voetzoollaesies)
- 3. Toepassingsvormen van de strooiseldouche

Elke variabele wordt (afhankelijk van de uitkomsten) minimaal in 3 rondes onderzocht om voldoende en wetenschappelijk verantwoorde data te kunnen verzamelen.

Dit zou bijvoorbeeld kunnen betekenen:

Ronde 1 t/m 3: snelgroeiende kuikens, voer A en strooiseldouche A

Ronde 4 t/m 6: langzaam groeiende kuikens, voer A en strooiseldouche A

Ronde 7 t/m 9: Kuikens type A (b.v. langzaam groeiend), voer B en strooiseldouche A

Ronde 10 t/m 12: Kuikens type A, voer A en strooiseldouche B

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

Er wordt gewerkt met telkenmale een unit met 1000 dieren. Dit is kleinst mogelijke schaal waarop extrapolatie naar de praktijksituatie mogelijk en representatief is. Bijvoorbeeld In kleinere units zijn de gebruikte technische installaties niet meer toepasbaar.

Elke variabele wordt (afhankelijk van de uitkomsten) minimaal gedurende 3 rondes getoetst. Op basis van het belang van de specifieke meetparameter en de gevonden interassay variabiliteit zal indien mogelijk ook statistisch het aantal benodigde rondes worden bepaald

B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levensstadia. Onderbouw deze keuzes.

Vleeskuikens

Herkomst broederij

Ca. 1000 per ronde (aantal rondes maximaal 5 per jaar, project duurt minimaal 3 jaar om voldoende data te verkrijgen en voor voldoende onderbouwde resultaten)

Het exacte aantal experimenten/rondes is op dit moment nog niet te geven. Dit wordt mede bepaald door de tijdens het onderzoek verkregen data.

Een voorbeeld hoe de verschillende experimenten eruit zouden kunnen zien is aangegeven in het antwoord op vraag 2A.

Leeftijd 0 tot en met slachtleeftijd (afhankelijk van groeisnelheid gekozen type kuikens)

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

De proef wordt meerdere rondes toegepast in een stalafdeling van maximaal 1000 slachtkuikens, die representatief zijn voor de praktijk. De meetdata worden verkregen door gebruik te maken van het minimaal mogelijke aantal dieren. Na vastgesteld resultaat wordt het systeem, dat dan gelegaliseerd/gecertificeerd is, eventueel in de grootschalige praktische situatie geïntroduceerd (dit is geen onderdeel van het project). M.a.w. in het project wordt de proef voor de praktijk voldoende representatieve zo kleinschalig mogelijke situatie met 1000 vleeskuikens uitgevoerd. Deze werkwijze betekent een enorme reductie van het aantal dieren ten opzicht van het onderzoek onder reguliere bedrijfsomstandigheden.

Het doel van dit onderzoek is in feite de ontwikkeling/validatie van een verfijningsalternatief voor de huisvesting van vleeskuikens in de reguliere praktijk.

Onderzoek vindt rechtstreeks aan de doeldieren plaats. Er worden in het kader van het onderzoek geen metingen aan de dieren gedaan die aanleiding zouden kunnen geven tot additioneel ongerief (bijvoorbeeld bloedafnames). Het dagelijkse en periodieke onderzoek aan de dieren wijkt niet af van de standaardpraktijk, uitgezonderd extra controles op voetzollaesies. Voor deze controle worden de betreffende dieren opgepakt en geïnspecteerd op het oog Door deze intensievere controles wordt de kans enorm gereduceerd dat situaties die het toepassen van humane eindpunten zouden rechtvaardigen, worden gemist.

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

Verwachting is dat geen pijn, lijden of angst en schadelijke milieu effecten van de proef als zodanig ontstaan, anders dan die ook voorkomen in de gangbare vleeskuikenhouderij. Daarentegen, in het in de proef gebruikte systeem wordt juist een reductie van pijn, lijden of angst en schadelijke milieu effecten verwacht. Dit is geen onderzoek in het kader van een wettelijke bepaling

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

Dit is geen onderzoek in het kader van een wettelijke bepaling

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

Er wordt in principe geen welzijnsaantasting boven standaard houderij verwacht. De verwachting is zelfs dat er sprake van minder risico op ongerief zal zijn.

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

X Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

Geen pijn als direct gevolg van de proef. In zijn algemeenheid zijn er in de vleeskuikenhouderij (met bestaand uitgangsmateriaal = kuikens en bestaande huisvestings- en voedings-/verzorgingssystemen) wel een aantal specifieke problemen, die waarschijnlijk

aanleiding tot pijn kunnen zijn (bijvoorbeeld gewrichtsproblemen en voetzollaesies). Verwacht wordt dat deze problemen (en hieraan gekoppeld antibiotica en medicijngebruik) in het in de dierproeven te toetsen systeem minder in omvang en kwantiteit zullen zijn. Het individuele dier verkrijgt de nodige en gebruikelijke veterinaire zorg. In het geval van voetzollaesies of gewrichtsproblemen (ongeriefscore 2: diepe laesies met openliggende zweren) bestaat de interventie eruit dat het betreffende dier wordt gedood volgens een methodiek volgens bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Nee, niet als gevolg van de proef. Er is overigens, doordat het een experimentele opstelling is, niet uit te sluiten dat dieren door onvoorzien omstandigheden gedurende korte tijd geconfronteerd worden met meer dan het ongerief waarmee ze ook geconfronteerd zouden worden in een regulier huisvestingsstelsel. Net als in de gangbare houderij zullen tijdens de proef aandoeningen, zoals voetzollaesies en borstblaren, voorkomen. Vleeskuikens, die pijn hebben door ernstige voetzollaesies (score 2: duidelijke afwijkingen met pijn), die geconstateerd worden bij de dagelijkse gezondheidscontrole, zullen uit de proef worden genomen en worden gedood. Ook bij andere ernstige aandoeningen wordt euthanasie toegepast. Het is de verwachting dat dit de huidige praktijk niet zal overstijgen. De verwachting is dat dit zelfs minder zal zijn.

Het dagelijkse en periodieke onderzoek aan de dieren wijkt niet af van de standaardpraktijk, uitgezonderd extra controles op voetzollaesies. Voor deze controle worden de betreffende dieren opgepakt en geïnspecteerd op het oog.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Zie boven

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

Het inherent aan de proef uitgebreide monitoren van de systemen, het milieu en de dieren zal naar verwachting leiden tot een vermindering van het risico op ongerief bij de vleeskuikens ten opzichte van de gangbare huisvestingsystemen. Monitoring vindt plaats via frequente, dagelijkse controle van de vleeskuikens. Bij afwijkingen van de normale omstandigheden (b.v. afwijkingen in stalomstandigheden/-klimaat, uitval van systemen, negatieve gevolgen van aanpassingen in roostervloeren) wordt de afwijking onmiddellijk hersteld. Door de intensievere monitoring wordt de kans tot nul gereduceerd dat situaties die aanleiding zijn tot het toepassen van humane eindpunten worden gemist.

De dagelijkse verantwoordelijkheid voor de uitvoering van de verzorging van en handelingen aan de dieren vindt plaats door een aan AERES verbonden erkende en competente deskundige.

J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Er worden bovenop de uitval in de reguliere houderijsystemen specifiek als gevolg van de dierproef geen omstandigheden verwacht waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is. In zijn algemeenheid kunnen, net als in de reeds in de praktijk toegepaste systemen, gezondheidsaandoeningen, zoals voetzollaesies en andere pootproblemen, maar ook luchtweg- en spijsverteringsaandoeningen optreden. De verwachting is dat m.n. voetzollaesies minder in aantal zullen voorkomen tijdens de proeven. Indien de score 2 aan de orde is, zal dit als humaan eindpunt worden gehanteerd. Alle ernstige aandoeningen al dan niet gerelateerd aan

het experiment, die gepaard gaan met lijden en/of pijn, zullen als humane eindpunten worden gehanteerd.

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

Maximaal aantal dieren dat spontaan dood gaat of humane eindpunten bereikt zal lager liggen dan in de normale praktijksituatie. In de huidige normale praktijksituatie is dit maximaal 3-5%.

K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

Licht ongerief

Einde experiment

L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

Nee

X Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

Dieren worden geslacht op de slachterij. Evt. worden dieren die het humane eindpunt bereikt hebben individueel gedood. Het betreffende dier wordt gedood volgens een methodiek volgens bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

X Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Er worden standaard slacht methodes in slachterijen toegepast. De vleeskuikens worden ook normaal voor menselijke consumptie aangeboden. Data, die verzameld worden van de kuikens bij de keuring tijdens de slacht zijn belangrijke meetparameters in het experiment. Bij individuele dieren met humaan eindpunt wordt wel de richtlijn 2010/63/EU toegepast.

Ja



Melding Machtiging

- U kunt met dit formulier een machtiging afgeven of beëindigen.
- U machtigt een natuurlijk persoon (zoals een adviseur) of een rechtspersoon (zoals een BV, stichting, vereniging) om uw zaken voor u te behartigen. De machtiging is voor maximaal vijf jaar geldig.
- Meer informatie vindt u op www.zbo-ccd.nl.

1 Gegevens aanvrager

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

Naam van de portefeuillehouder	Stichting AERES Groep Bovenbuurtweg 22 6717 XA Ede
KvK-nummer	41246832
NVWA deelnemernummer	77100

2 Gegevens gemachtigde

2.1 Vul één van deze nummers van de gemachtigde in: KvK-nummer, of Burgerservicenummer (BSN) Geef aan welk nummer u invult.

<input type="checkbox"/> KvK-nummer	Nvt
<input type="checkbox"/> BSN	[Redacted]

2.2 Wat zijn de gegevens van de gemachtigde?

Naam gemachtigde	[Redacted]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
Adres of postbus	[Redacted]	
Postcode en Plaats	[Redacted]	[Redacted]

3 Inhoud machtiging

- 3.1 Wilt u een nieuwe machtiging afgeven?
 Ja > Geef bij vraag 3.3 aan wat de gemachtigde voor u mag doen.
 Nee
- 3.2 Wilt u een machtiging intrekken?
 Ja > Ga door naar vraag 4
 Nee
- 3.3 Wat mag de gemachtigde voor u doen?
 Een projectvergunning aanvragen
 Een wijziging op een verleende projectvergunning aanvragen
 Een melding doorgeven op een verleende projectvergunning
 Een bezwaarschrift indienen en daarover communiceren met de Centrale Commissie Dierproeven en alle andere handelingen verrichten die nodig zijn voor een goede afwikkeling van het bezwaarschrift.
 Alle bovenstaande opties

4 Ondertekening

- 4.1 Onderteken het formulier en stuur het als bijlage met uw aanvraag mee via de beveiligde e-mailverbinding of per post:

Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Ik heb dit formulier volledig en naar waarheid ingevuld. Ik verklaar dat ik bekend ben met alle voorwaarden van wet en regelgeving (Wod, dierproevenbesluit en dierproevenregeling).

Naam gemachtigde 

Datum 08-05-2015

Handtekening
portefeuillehouder
van de instelling 

Handtekening
gemachtigde 



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Aeres Groep

p/a



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.zbo-ccd.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD771002015116

Bijlagen

2

Datum 09-07-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw ,

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 8 juli 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD771002015116. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

Als wij nog informatie van u nodig hebben dan ontvangt u daarover bericht. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn bijgeschreven op de rekening van de CCD. Zodra uw aanvraag compleet is, ontvangt u binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. In geval van een complexe aanvraag kan deze termijn met maximaal vijftien werkdagen verlengd worden. U krijgt bericht als de beslisperiode van uw aanvraag vanwege complexiteit wordt verlengd. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Factuur

Bijgaand treft u de factuur aan voor de betaling van de leges. Wij verzoeken u de leges zo spoedig mogelijk te voldoen, zodat we uw aanvraag in behandeling kunnen nemen. Is uw betaling niet binnen dertig dagen ontvangen, dan wordt uw aanvraag buiten behandeling gesteld. Dit betekent dat uw aanvraag niet beoordeeld wordt en u uw project niet mag starten.

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 77100
Naam instelling of organisatie: Aeres Groep
KvK-nummer: 41246832
Straat en huisnummer: Bovenbuurtweg 27
Postcode en plaats: 6717 XA EDE
IBAN: NL46ABNA0546859348
Tenaamstelling van het rekeningnummer: AERES Groep in Ede

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: 
Functie: 
Afdeling: PTC+Barneveld
Telefoonnummer: 
E-mailadres: 

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Afdeling: Groenhorst Barneveld
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Afdeling: PTC+Barneveld
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Gegevens gemachtigde

BSN: [REDACTED]
Adres: [REDACTED]
Postcode en plaats: [REDACTED]

Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Ja

Wat mag de gemachtigde doen?

- Een projectvergunning aanvragen
- Een wijziging op een verleende projectvergunning aanvragen
- Een melding doorgeven op een verleende projectvergunning
- Een bezwaarschrift indienen en daarover communiceren met de Centrale Commissie Dierproeven en alle andere handelingen verrichten die nodig zijn voor een goede afwikkeling van het bezwaarschrift
- Alle bovenstaande opties

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u?

- Nieuwe aanvraag
- Wijziging op een (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
- Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

Over uw project

Geplande startdatum: 1 juni 2016
Geplande einddatum: 1 juni 2019
Titel project: Onderzoek naar alternatief huisvestingssysteem voor vleeskuikens
Titel niet-technische samenvatting: Onderzoek naar alternatief huisvestingssysteem voor vleeskuikens
Naam DEC: DEC-Consult
E-mailadres DEC: [REDACTED]

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 741,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen: Projectvoorstel
 Beschrijving Dierproeven
 Niet-technische samenvatting
Overige bijlagen: Melding Machtiging
 DEC-advies

Ondertekening

Naam: [REDACTED]
Functie: Portefeuillehouder en projectverantwoordelijke
Plaats: [REDACTED]
Datum: 8 juli 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Aeres Groep
p/a



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.zbo-ccd.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD771002015116

Bijlagen

2

Datum 09-07-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 9 juli 2015

Vervaldatum: 8 augustus 2015

Factuurnummer: 201570116

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvegrunning dierproeven Betreft aanvraag AVD771002015116	€ 741,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL28RBOS 056.99.96.066 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.

Format DEC-advies

Maak bij de toepassing van dit format gebruik van de bijbehorende toelichting, waarin elke stap in het beoordelingsproces wordt toegelicht

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: AVD7710020155116
2. Titel van het project: Onderzoek naar alternatief huisvestingssysteem voor vleeskuikens
3. Titel van de NTS: Onderzoek naar een alternatief huisvestingssysteem voor vleeskuikens
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
 - wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: DEC-Consult
 - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
 - mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: 19 mei 2015
 - aanvraag compleet: 16 juni 2015
 - in vergadering besproken: 27 mei 2015/16 juni 2015
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van / tot
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag Ontvangen dd. 16 juni 2015
 - advies aan CCD
7. Eventueel horen van aanvrager –n.v.t.
8. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum: 31 mei 2015
 - Strekking: completering van de aanvraag; de vragen hadden betrekking op de volgende punten:

- tekstueel en redactioneel (verduidelijking en onderlinge afstemming van bepaalde tekstpassages en correcte invulling van het formulier)
 - aanvullende informatie m.b.t. de wijze van doden van dieren die het humane eindpunt bereiken.
 - Verantwoordelijkheid en deskundigheid bij uitvoering experimenten en toepassen humane eindpunten
 - Controle, klinisch onderzoek, voer en water voorziening conform standaardpraktijk
- Datum antwoord: 16 juni 2015
 - Strekking van het (de) antwoord(en). Geheel in de lijn der verwachting, aanvraag na aanpassing volledig en duidelijk.
 - De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag
9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC) n.v.t., de DEC zelf beschikt over de relevante expertise.

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag
3. De DEC is competent om hierover te adviseren
4. Geen van de DEC-leden is betrokken bij het betreffende project of de aanvrager.

C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:
 - X uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord
 - uit onderwijskundig oogpunt verantwoord
 - uit het oogpunt van productiedoeleinden verantwoord
 - wettelijk vereist
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. In Europa en Nederland worden voor vleeskuikens diverse huisvestingssystemen met verschillende

typen strooisel toegepast. In de praktijk blijken aan deze wijze van huisvesting nadelen verbonden, zoals een negatieve invloed op de leefomgeving van de dieren en op de directe omgeving (ammoniakgehalten in de stal, fijn stofgehalten in de stal en daarbuiten). Deze hebben effecten op de gezondheid van de dieren (ontstaan van voetzollaesies en borstblaren, luchtweginfecties). Deze gezondheidsproblemen leiden tot welzijnsaantasting en een verhoogd gebruik van antibiotica met als ongewenst neveneffect een verhoogd risico op het ontstaan van resistentie bij mens en dier. Buiten Europa en met name in Azië is het gebruikelijk vleeskuikens op kunststof roosters te houden. Onderzoek heeft uitgewezen dat de dieren in een dergelijk huisvestingssysteem gezonder zijn, sneller groeien, minder energie verspillen en minder antibiotica nodig hebben. Doel van dit onderzoek is een compleet beeld te krijgen van de meerwaarde van een innovatief houderijconcept, gebaseerd op dit alternatieve stalsysteem in combinatie met het drogen van de mest, op het gebied van diervriendelijkheid, milieu, gezondheid, voedselveiligheid en economie. De DEC classificeert het belang van dit onderzoek als substantieel.

4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De stalunit waarin dit project plaats vindt, wordt door een samenwerkingsverband van bedrijven en organisaties gerealiseerd. De partners in dit samenwerkingsverband hebben een zeer ruime ervaring elk op hun eigen expertisegebied en het betreft in alle gevallen innovatieve bedrijven.
5. Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. Voor dit experiment worden vleeskuikens (verschillende typen praktijkdieren) gebruikt zoals in de gebruikelijke dierhouderijsystemen. De dieren zijn telkens afkomstig van een broederij. De keuze hiervoor is voldoende wetenschappelijk onderbouwd. Het betreft de doeldiersoort voor dit type onderzoek.
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Alle experimenten hebben een zelfde design. Per ronde worden verschillende variabelen onderzocht (type vleeskuiken, soort voer en voerverstrekking, toepassingsvormen van de verstrekking van strooisel). Het verblijf in de testopstelling voegt geen of maximaal gering ongerief toe aan

het ongerief waarmee deze kuikens in de gangbare vleeskuikenhouderij zouden worden geconfronteerd. Het is de verwachting dat het ongerief lager zal zijn.

7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**. De dieren zijn de doeldiersoort voor dit type onderzoek.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat. Het aantal dieren per experimentele ronde is het minimale aantal dat nog representatief is voor de dierhouderij in de praktijk. Deze werkwijze betekent een aanzienlijke reductie van het aantal dieren ten opzicht van onderzoek onder reguliere bedrijfsomstandigheden.
9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. De dieren worden nauwkeurig geobserveerd. Gedragsobservaties en scores van de voetzolen maken deel uit van het onderzoek en daarmee wordt tevens het welzijn nauwkeurig in kaart gebracht. Indien bij individuele dieren sprake is van aantasting van welzijn of gezondheid worden deze dieren gedood (humaan eindpunt).
Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten. Het is uiteindelijk de bedoeling dat dit innovatieve houderijsysteem leidt tot minder negatieve gevolgen voor het leefklimaat, zowel binnen als buiten de stallen, iets dat mede wordt onderzocht.
10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

De doeleinden van het project rechtvaardigen het voorgestelde gebruik van dieren alsmede de toegevoegde schade in de vorm van lijden, pijn en angst bij de bij de experimenten betrokken dieren. Deze doeleinden zijn uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord en het is waarschijnlijk dat ze met de voorgestelde experimenten zullen worden gehaald. Op termijn kunnen de uitkomsten van het project voordelen opleveren voor mens, dier en milieu.

De DEC realiseert zich dat de gezondheids- en welzijnsproblemen waar deze

studie zich op richt, het gevolg zijn van de wijze waarop in de standaard intensieve dierhouderij de dieren worden gehouden. De DEC heeft in haar afweging dan ook betrokken dat deze studie gezien moet worden in de context van deze bestaande praktijksituatie (vastgelegd in wettelijke voorschriften). Tegelijkertijd betekent dit ook dat het verbeteren van de huisvestingscondities van vleeskuikens uiteindelijk voor zeer grote aantallen dieren een verbetering van de gezondheid en welzijn zou kunnen opleveren. Daarbij wordt aangetekend dat implementatie in de praktijk af zal hangen van wijziging van Europese regelgeving. Echter, om een verbeterd houderijsysteem daarin geaccepteerd te krijgen is onderzoek als dit noodzakelijk. De ambitie om op een systematische wetenschappelijk verantwoorde wijze een innovatief huisvestingsysteem voor vleeskuikens te evalueren dat er uiteindelijk op gericht is het welzijn en de gezondheid van zeer grote aantallen dieren te verbeteren heeft in ethisch opzicht gewicht en rechtvaardigt de uiterst beperkte (waarschijnlijk afwezige) welzijnsaantasting bij de dieren betrokken bij de experimenten in dit project.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

[REDACTED]

Van: [REDACTED]
Verzonden: vrijdag 17 juli 2015 15:23
Aan: info@zbo-ccd.nl
CC: [REDACTED]
Onderwerp: Vraag over AVD7710020155116

Categorieën: Dossierhouder: [REDACTED]

Van: Info-zbo [mailto:info@zbo-ccd.nl]
Verzonden: dinsdag 14 juli 2015 15:32
Aan: [REDACTED]
Onderwerp: Vraag over AVD7710020155116

Geachte DEC-Consult,

In uw advies voor aanvraag AVD7710020155116 met als titel "Onderzoek naar alternatief huisvestingssysteem voor vleeskuikens" geeft u aan dat dit project vergunningplichtig is. De Wet op de dierproeven laat ruimte over voor interpretatie wat betreft de definitie van een dierproef, met name als het gaat om het bepalen van het ongerief en Artikel 1b lid 7d van de Wet (praktijken ten behoeve van de reguliere dierhouderij). Graag ontvangen wij uw motivering op grond waarvan u tot de conclusie bent gekomen dat deze aanvraag vergunningplichtig is.

Omdat er in een breder verband over interpretatiekwesties wordt gesproken, kan uw argumentatie een bijdrage leveren in het ontwikkelen van een eenduidige visie.

Voor de continuïteit van de behandeling van deze aanvraag vraag ik u deze week antwoord te geven. Mocht dit niet lukken, dan hoor ik dat graag.

Alvast bedankt.

Met vriendelijke groeten,

[REDACTED]
Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag
.....

Antwoord DecConsult

Geachte mevrouw [REDACTED]

Over de vraag of de in dit project beschreven experimenten 'vergunning plichtig' zijn is voorafgaand aan het schrijven van de projectaanvraag uitgebreid overleg geweest met de indiener.

Het betreft onderzoek aan een huisvestingssysteem dat op dit moment niet toegelaten is voor gebruik in Nederland/Europa . In de onderzoeksopstelling van dit huisvestingssysteem (dat al wel op grote schaal toegepast wordt in Azië) worden naast de effecten/mogelijkheden van een aantal technische toevoegingen ook de effecten/mogelijkheden van diverse vormen en toepassingen van strooisel(douches) onderzocht.

In dit overleg is daarom geconcludeerd dat de voorgestelde experimenten vallen onder de doelstelling zoals beschreven in artikel 1c.b (*het welzijn van dieren en de verbetering van de productieomstandigheden voor dieren die met het oog op landbouwdoeleinden worden gefokt*) en dus juist niet in de categorie " *praktijken ten behoeve van de reguliere dierhouderij*;" (artikel 7d. Wod) . Het te onderzoeken huisvestingssysteem is (nog) geen 'reguliere dierhouderij' in Nederland/Europa. Dit onderzoek is juist een eerste stap gericht op wijziging van de Europese regelgeving om implementatie van dit houderijsysteem binnen Europa mogelijk te maken.

Bij de vraag of het ongerief voor de dieren 'bovendrempelig' is hebben de volgende overwegingen een rol gespeeld.

Het is onmiskenbaar zo dat vleeskuikens in de reguliere houderij geconfronteerd worden met een risico op ongerief. Daarboven op is er in een experimenteel houderijsysteem het risico dat door onverwachte omstandigheden (mede de reden waarom het wordt onderzocht) de dieren geconfronteerd zouden kunnen worden met additioneel ongerief. Zoals in de aanvraag aangegeven is wordt de kans hierop heel laag geschat, maar deze is niet nul. Het is zelfs de hoop dat het totale ongerief ten opzichte van de reguliere huisvesting zal afnemen.

Het ongerief referentiekader in de definitie van een dierproef is (artikel 1a) '*het veroorzaken bij het dier van evenveel of meer pijn, lijden, angst of blijvende schade dan het inbrengen van een naald volgens goed diergeneeskundig vakmanschap*'. Dit is geïnterpreteerd als zeer kortdurend ongerief.

De dieren zullen in de voorgestelde experimenten wat vaker gecontroleerd worden dan in de reguliere houderij. Bij de controles worden de dieren opgepakt en op het oog gecontroleerd op onder andere voetzollaesies en longproblemen. Het additionele ongerief door deze extra controles wordt niet als drempel overschrijdend ingeschat.

In de aanvraag is er vanuit gegaan dat er ook een (kleine) kans is dat de dieren door onverwachte tekortkomingen/fouten in het experimentele houderijsysteem maximaal 1 dag geconfronteerd zullen worden met additioneel gering ongerief. Door de intensieve monitoring van zowel de dieren als de installaties is het de verwachting dat dit in verreweg de meeste gevallen zelfs niet meer dan maximaal 0.5 dag zal zijn. Dit ongerief is naar onze interpretatie toch altijd nog meer dan het zeer kortdurende geringe ongerief van het krijgen van een prikje.

Nogmaals wij hebben het risico op ongerief waarmee vleeskuikens in de reguliere houderij geconfronteerd kunnen worden niet meegenomen in de afweging wel/geen dierproef. Hiervoor is alleen gekeken naar het risico op ongerief wat het experiment (=gehuisvest zijn in een experimenteel houderijsysteem en extra handelingen in het kader van de monitoring) toevoegt aan het ongerief waar deze kuikens in de reguliere houderij mee zouden worden geconfronteerd.

Wij zijn benieuwd of de CCD bovenstaande onderbouwing van de conclusie dat deze aanvraag vergunningplichtig is onderschrijft.

Met vriendelijke groet

Namens de DEC van DecConsult



PS

Dit antwoord is opgesteld in overleg met de indiener en de proefdierdeskundige/IvD van AERES



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Aeres Groep



Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.r
T 0900-28 000 28 (10 ct /min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD771002015116
Uw referentie

Bijlagen
1

Datum 14 augustus 2015
Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte heer/mevrouw,

Op 8 juli 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Onderzoek naar een alternatief huisvestingssysteem voor vleeskuikens" met aanvraagnummer AVD771002015116. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet).

U kunt met uw project "Onderzoek naar een alternatief huisvestingssysteem voor vleeskuikens" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 januari 2016 tot en met 1 januari 2019.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Consult gevoegd d.d. 9 juli 2015. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a lid 3 van de wet. Wij hebben de DEC om aanvullende informatie gevraagd. Op 17 juli 2015 heeft de DEC gereageerd op onze vragen.

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- en regelgeving liggen ten grondslag aan 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 gegevens in het colofon.

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.

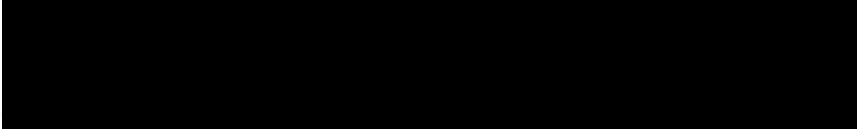
Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op <http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

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 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: - DEC-advies
- Weergave wet- en regelgeving



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Aeres Groep
Adres: Postbus 245
Postcode en woonplaats: 6717 XA Ede
Deelnemersnummer: 77100

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 januari 2016 tot en met 1 januari 2019, voor het project "Onderzoek naar een alternatief huisvestingssysteem voor vleeskuikens" met aanvraagnummer AVD771002015116, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Consult.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED] Voor de uitvoering van het project is [REDACTED] verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 8 juli 2015
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 9 juli 2015;
 - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 9 juli 2015;
 - c. Advies van Dierexperimentencommissie, ontvangen op 9 juli 2015

Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst
Onderzoek naar een flexibel kunststof vloersysteem en strooiseldouche voor vleeskuikens	Vleeskuikens	15000	Licht

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

Volgens artikel 10c van de Wet op de dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g. 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 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 blijvende schade

Datum
14 augustus 2015
Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD771002015116

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.

Inventaris Wob-verzoek W15-11									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTS 2015124								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Niet-technische samenvatting	x							
3	Projectvoorstel			x					
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1			x					
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2			x					
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3			x					
7	Bijlage beschrijving dierproeven 4			x					
8	DEC-advies				x		x	x	
9	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
10	Advies CCD		x						x
11	Beschikking				x		x	x	
12	Vergunning			x					
13	Mail CCD-nummer 1-6-2015				x		x	x	
14	Mail aanvullende info 24-7-2015				x		x	x	
15	Brief aanvullende info				x		x	x	
16	Antwoord op vraag CCD				x		x	x	
17	Mail aanpassen NTS 18-8-2015				x		x	x	
18	Aanpassing NTS				x		x	x	
19	Mail besluit 20-8-2015				x		x	x	
20	Mail terugkoppeling DEC 20-8-2015				x		x	x	



15 JUL 2015

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 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 90500 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen																								
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td style="width: 40%;">Naam instelling of organisatie</td><td colspan="2">BioXpert B.V.</td></tr> <tr><td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td><td colspan="2">[REDACTED]</td></tr> <tr><td>KvK-nummer</td><td>54838134</td><td></td></tr> <tr><td>Straat en huisnummer</td><td>Nistelrooise Baan</td><td>3</td></tr> <tr><td>Postbus</td><td colspan="2"></td></tr> <tr><td>Postcode en plaats</td><td>5374RE</td><td>Schaijk</td></tr> <tr><td>IBAN</td><td colspan="2">NL72RABO0183605888</td></tr> <tr><td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td><td colspan="2">BioXpert BV</td></tr> </table>	Naam instelling of organisatie	BioXpert B.V.		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]		KvK-nummer	54838134		Straat en huisnummer	Nistelrooise Baan	3	Postbus			Postcode en plaats	5374RE	Schaijk	IBAN	NL72RABO0183605888		Tenaamstelling van het rekeningnummer	BioXpert BV	
Naam instelling of organisatie	BioXpert B.V.																									
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]																									
KvK-nummer	54838134																									
Straat en huisnummer	Nistelrooise Baan	3																								
Postbus																										
Postcode en plaats	5374RE	Schaijk																								
IBAN	NL72RABO0183605888																									
Tenaamstelling van het rekeningnummer	BioXpert BV																									
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>																									
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td style="width: 40%;">(Titel) Naam en voorletters</td><td>[REDACTED]</td><td style="text-align: right;"><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td></tr> <tr><td>Functie</td><td colspan="2">[REDACTED]</td></tr> <tr><td>Afdeling</td><td colspan="2">[REDACTED]</td></tr> <tr><td>Telefoonnummer</td><td colspan="2">[REDACTED]</td></tr> <tr><td>E-mailadres</td><td colspan="2">[REDACTED]</td></tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie	[REDACTED]		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]										
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.																								
Functie	[REDACTED]																									
Afdeling	[REDACTED]																									
Telefoonnummer	[REDACTED]																									
E-mailadres	[REDACTED]																									
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td style="width: 40%;">(Titel) Naam en voorletters</td><td>[REDACTED]</td><td style="text-align: right;"><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td></tr> <tr><td>Functie</td><td colspan="2">[REDACTED]</td></tr> <tr><td>Afdeling</td><td colspan="2">[REDACTED]</td></tr> <tr><td>Telefoonnummer</td><td colspan="2">[REDACTED]</td></tr> <tr><td>E-mailadres</td><td colspan="2">[REDACTED]</td></tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie	[REDACTED]		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]										
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.																								
Functie	[REDACTED]																									
Afdeling	[REDACTED]																									
Telefoonnummer	[REDACTED]																									
E-mailadres	[REDACTED]																									

- 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 | [REDACTED] | <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
| Functie | [REDACTED] | |
| Afdeling | [REDACTED] | |
| Telefoonnummer | [REDACTED] | |
| E-mailadres | [REDACTED] | |
- 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 | 1 - 6 - 2015 |
| Einddatum | 31 - 5 - 2020 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Evaluation of Antiviral intervention strategies of Rabies in mice.
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Testen van anti-rabies behandelings strategieën in muizen.
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|-----------------------|
| Naam DEC | Stichting DEC-Consult |
| Postadres | [REDACTED] |
| E-mailadres | [REDACTED] |

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € Lege
 Wijziging € Lege
- 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.
 Via een eenmalige incasso
 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 Machtiging
-

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 1.7). 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	[REDACTED]
Plaats	Schaijk
Datum	1 - 7 - 2015
Handtekening	[REDACTED]



BioXpert B.V.

Nistelrooise Baan 3

5374 RE Schaijk

The Netherlands

T: +31 (0) 486-463303

F: +31 (0) 486-463498

info@bioxpert.nl

www.bioxpert.nl

Aan: Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Datum: 14 juli 2015

Betreft: Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD905002015124

Geachte heer / mevrouw,

Bijgaand de getekende aanvraag Projectvergunning Dierproeven AVD905002015124 met als titel:

Evaluation of Antiviral intervention strategies of Rabies in mice.

Deze aanvraag is vandaag met de beveiligde e-mailverbinding ingediend.

Met vriendelijke groet,

[Redacted signature]



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).
- 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

3 General description of the project

3.1 Background

Describe the project (motivation, background and context) with respect to the categories selected in 2.

- For legally required animal procedures, indicate which statutory or regulatory requirements apply (with respect to the intended use and market authorisation).
 - For routine production, describe what will be produced and for which uses.
 - For higher education or training, explain why this project is part of the educational program and describe the learning targets.
-

In the context of vaccine and antiviral compound (hereafter referred to as “antiviral intervention strategies”) development, Viroclinics Biosciences offers preclinical models in which these development strategies can be tested in relevant *in vivo* settings. For rabies virus infections, preclinical models are available in mice. These models can be used to assess the characteristics of a multitude of antiviral intervention strategies, such as (monoclonal) antibody preparations, antiviral pharmaceutical substances (compounds), vaccines, or a combination thereof.

Rabies is a fatal viral disease that can be transmitted to humans through bites by infected animals, in most cases domestic dogs. The development of human rabies after such transmission incidents can be prevented by prompt administration of post-exposure prophylaxis (PEP), which is a combination of an inactivated rabies vaccine and anti-rabies immunoglobulin preparation. PEP and mass vaccination of domestic dogs has resulted in control of the disease in industrialized countries. Both vaccine, which is also used prophylactically in target groups, and PEP, however, are costly instruments which impede their use in developing countries, areas that are the most affected (WHO, 2010). Therefore, the problem is not that prophylactic treatments are not available, the problem lies in the costs of global implementation. This is partly caused by the fact that the vaccine is poorly immunogenic and therefore requires at least three immunizations and yearly booster vaccinations in order to remain effective. PEP also includes multiple shots of antibody preparations for which inefficient production processes, potential safety issues and limited availability impede global implementation (WHO, 2010).

Newly developed vaccines are aimed at improved immunogenicity, dose sparing (e.g. through the use of adjuvants), new presentation or formulation methods and reduced production costs. Newly developed antibody preparations are aimed at improved efficacy, either through the development of new antibodies or new and more efficient ways to present and/or formulate existing antibodies with proven effectivity.

Apart from PEP, which is only efficacious when administered promptly after exposure, there is no therapeutic treatment against rabies disease available. If left untreated, once clinical symptoms arise the infection is 100% fatal. In the absence of any treatment against rabies, any molecule with the potential to improve the clinical course of disease and/or improve survival rates would be a significant improvement in the battle against rabies.

These new antiviral compounds, new or improved antibody or vaccine preparations, could help further decrease the global impact of rabies infection and disease and thereby potentially fulfill an unmet need.

This project proposal covers the use of the above mentioned models to test the pharmacokinetics, immunogenicity and/or efficacy of newly developed antiviral intervention strategies against rabies virus infections in mice. These newly developed products are provided to the applicant by developers of these

products (such as pharmaceutical companies) who want to test these new products in a preclinical model for rabies.

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 studies described in this project proposal allow testing of newly developed biological and/or pharmaceutical products with regards to their pharmacokinetics, immunogenicity and/or efficacy to protect against rabies virus infections or to improve clinical outcome of disease.

The specific needs to which preclinical testing of newly developed anti-rabies products respond to are the following:

Testing of vaccines that have improved immunogenicity and efficacy and/or lower production costs compared to the currently available vaccine preparations that are used for both pre- and post-exposure prophylaxis.

Testing of antibody preparations that have improved efficacy, lower production costs or less adverse effects compared to the currently available antibody preparations that are used for PEP and may have potential for use in pre-exposure settings.

Testing of antiviral compounds that improve PEP treatment

Testing of antiviral compounds that improve the outcome of clinical disease caused by rabies infections as currently no therapeutic product is available

3.3 Relevance

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

Rabies virus infection is one of the most ancient known and most devastating diseases to date. If left untreated, it is known to kill 100% of the affected persons. Transmission to humans mainly through bites by infected animals, mostly dogs (WHO, 2013). If pre- or post exposure prophylaxis is not given to exposed humans, the virus will migrate slowly to the central nervous system to cause an inevitable excruciating death. The disease is preventable through administration of post-exposure prophylaxis (PEP) to exposed subjects and additional control measures include mass vaccination of dogs. Still, it has a large impact on populations with limited access to health care. It has been reported that globally, canine rabies causes approximately 59,000 (95% Confidence Intervals: 25-159,000; mortality metric) human deaths, over 3.7 million (95% CIs: 1.6-10.4 million) disability-adjusted life years (DALYs; a combined mortality and morbidity metric) and 8.6 billion USD (95% CIs: 2.9-21.5 billion) economic losses annually (Hampson, PLoS Negl Trop Dis., 2015). Based on marketing information of suppliers of PEP, it is estimated that more than 15 million exposed subjects per year receive PEP. In another study it was estimated that without the availability of PEP, 327000 instead of 55000 people would succumb to rabies each year in Africa and Asia (Knobel, WHO, 2005). Although prophylactic products are available and PEP, if administered soon enough, can prevent development of rabies disease in exposed subjects, there is an unmet need for vaccines and antibody preparations with improved efficacy, reduced costs and higher global accessibility (WHO, 2010).

Another reason for this devastating statistics is that no specific or supporting treatment exists to overcome fatal outcome of infection.

Studies in this project proposal are aimed to aid development of both antiviral intervention strategies but also of strategies with the potential to improve the clinical outcome of disease by offering a relevant preclinical model to test the capacity of these newly developed products to act as prophylactic and/or therapeutic treatment against rabies virus infection and disease.

3.4 Research strategy

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

A typical antiviral intervention strategy development programme consists of different study phases. These phases are represented by the modular structure of this project proposal. These modules include (pilot) dose finding of challenge virus strains (Module 1), pharmacokinetics of antiviral compounds (Module 2), immunogenicity of candidate vaccines (Module 3), and efficacy of these vaccines and compounds (Module 4). Which modules are to be used to test a specific product is dependent on extent of information that is available for the product under study itself and the virus strain and infection route to be used.

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.

Module 1: Rabies virus dose-finding in mice

Stage 1. Pilot dose finding

This stage serves to establish the virus dose to be used in dose finding studies (stage 2).

The types of animal procedures are: intramuscular, intranasal or intracranial infection with rabies, daily weighing, and daily scoring of clinical signs.

Stage 2. Dose finding

This stage is used to determine the viral dose to be used in the efficacy module (4).

The types of animal procedures are: intramuscular, intranasal or intracranial infection with rabies, daily weighing, daily scoring of clinical signs.

Module 2: Determination of the pharmacokinetics of rabies virus specific antiviral products in mice

This module serves to establish the pharmacokinetics of antiviral compounds (e.g. pharmaceutical compounds, antibody preparations) that will determine dosing and frequency of these compounds in the efficacy module.

The types of animal procedures are: Sampling of blood, administration of antiviral compounds [i.c. (intra-cranial), i.v., i.m., i.n., i.p. or s.c., depending on the product to be tested].

Module 3: Determination of the immunogenicity of rabies virus specific antiviral products in mice

This module serves to establish the immunogenicity (vaccine dose, vaccination scheme) of anti-rabies vaccines that will be used in the efficacy module.

The types of animal procedures are: sampling of blood, administration of vaccines (i.c., i.v., i.m., i.n., i.p. or s.c., depending on the product to be tested).

Module 4: Determination of the prophylactic and/or therapeutic efficacy of rabies virus specific antiviral products in mice

This module serves to determine the prophylactic and/or therapeutic efficacy of antiviral compounds (e.g. pharmaceutical compounds, antibody preparations) or vaccines).

Animal procedures for testing the efficacy of a therapeutic agent: intramuscular, intranasal or intracranial infection with rabies, daily weighing, daily scoring of clinical signs, administration of vaccines (i.c., i.v., i.m., i.n., i.p. or s.c., depending on the product to be tested), blood sampling.

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.

Module 1: Rabies virus dose-finding in mice

The pilot dose finding stage (module 1, stage 1) serves in case of a new/unknown virus strain and/or infection route for that particular model of infection to determine the range of virus titres to be used in dose finding studies (module 1, stage 2). Stage 2 serves to determine the virus titre to be used in

efficacy studies (Module 4, see below) in case of new/ unknown virus strains under study.

Module 2: Determination of the pharmacokinetics of rabies virus specific antiviral products in mice

Pharmacokinetic studies serve to determine the compound dose and administration frequency to be used in efficacy studies (module 4).

Module 3: Determination of the immunogenicity of rabies virus specific antiviral products in mice

The immunogenicity of vaccines is determined in module 3 and serves to determine the vaccine dose administration frequency to be used in the efficacy study (module 4).

Module 4: Determination of the prophylactic and/or therapeutic efficacy of rabies virus specific antiviral products in mice

In the efficacy study (prophylactic and/or therapeutic), the prophylactic and/or therapeutic efficacy of antiviral compounds or vaccines are tested, using the results of modules 1, 2 and/or 3 when applicable.

Depending on what is known about the challenge viruses and/or infection route, the antiviral compounds or the vaccines to be tested in the studies within the project proposal, not all individual modules may be required to be included in the final study.

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	Module 1: Rabies virus dose-finding in mice
2	Module 2: Determination of the pharmacokinetics of rabies virus specific antiviral products in mice
3	Module 3: Determination of the immunogenicity of rabies virus specific antiviral products in mice
4	Module 4: Determination of the prophylactic and/or therapeutic efficacy of rabies virus specific antiviral products in mice
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website (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 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|---------------------------------------------|
| 1 | Module 1: Rabies virus dose-finding in mice |

Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

The animal procedures in this part of the project proposal are designed to determine the optimal rabies virus infectious dose for a particular route of challenge infection for which this dose has not been determined yet. This can be the case for new or untested rabies virus strains or when a virus is to be used via an inoculation route for which no optimal infectious dose has been determined yet.

Protection against rabies by vaccination or antiviral compounds can act through various mechanisms, which drives the choice of the challenge model (virus strain, route of challenge infection). Since it remains unclear how exactly the virus is transmitted from the site of infection to the central nervous system and how long this transport takes, demonstration of efficacy against replication in the central nervous system may require the use of intracranial (i.c.) challenge models. Also, in cases where virus strains are to be used for which no robust peripheral (i.m.) challenge dose is available that accommodates use of survival as a primary readout parameter, an i.c. challenge is required. Although primary i.c. infection in field situations has never been reported, the i.c. challenge is a valuable asset of the mouse/rabies model that allows efficacy assessment of anti-rabies intervention strategies. In cases where experiments are performed that will be used for registration purposes of newly developed vaccines, use of an i.c. challenge model may be required (FDA and Ph. Eur regulations).

The administration route of a virus for a particular study within the project also depends on the nature of the product(s) to be tested and the challenge model in which they are to be tested (in Module 4). In cases where the product exerts its antiviral function in the brain (either directly (e.g. an antiviral preparation that can cross the blood brain barrier) or indirectly (e.g. a vaccine preparation) via induced immune responses), the administration route of the virus preparation can be the intracranial (i.c.) or intranasal (i.n.) route. In cases where the product exerts its function outside of the brain, a peripheral, i.e. intramuscular (i.m.), challenge will be used. Additionally, kinetics of the antiviral product to be tested in the experiments of Module 2 may influence the choice of the infection route, e.g. in the case of a RNA or DNA based product from which the effector molecule(s) need(s) to be expressed before it can exert its function, the challenge route can be intracranially or intranasally if the bioavailability is quick or intramuscular if bioavailability requires prolonged incubation after administration. Furthermore, when a product to be tested is to be applied intracranially, this may also drive the choice of the infection route.

Rabies virus infection is lethal. Infected animals will develop rabies disease manifested with neurological symptoms of paralysis and die as result of encephalitis. Typically, after peripheral inoculation with a lethal dose of rabies virus, mice will develop ruffled hair approximately 5-7 days post infection and within 2-4 days will further develop hind-leg paralysis and die as a result of infection. The clinical signs are scored using Phases, the features of which are described below.

Phase 1: Only ruffled hair: early sign of encephalitis, typically lasting 2-4 days.

Phase 2: Ruffled hair AND hunched back. Progression to rabies encephalitis.

Phase 3: Ruffled hair AND hunched back AND hind leg paralysis.

The animals will be euthanized as soon as they reach Phase 3 (humane end point for euthanasia).

The primary outcome parameter in the described studies is survival.

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

The studies to be carried out within this part of the project consist of 2 stages, the animal procedures for each of these are listed below:

Stage 1. Pilot dose finding (to establish the virus dose to be used in dose finding stage)

Animal procedures:

Day 0: intramuscular, intranasal or intracranial infection with rabies; weighing

Day 0 – 21: daily weighing, daily scoring of clinical signs (Phase 1, 2 or 3 as described above). Scoring will be performed twice daily after the first signs of

disease (ruffled hair) appear. Animals will be euthanised as soon as they reach Phase 3 (humane end points for euthanasia). Surviving animals will be euthanised at the end of the study (not later than day 21).

Stage 2. Dose finding (based on results obtained in the Pilot dose finding stage; this module is used to establish the viral dose to be used in the Efficacy module)

Day 0: intramuscular, intranasal or intracranial infection with rabies; weighing

Day 0 – 21: daily weighing, daily scoring of clinical signs (Phase 1, 2 or 3 as described above). Scoring will be performed twice daily after the first signs of disease (ruffled hair) appear. Animals will be euthanised as soon as they reach Phase 3 (humane end points for euthanasia). Surviving animals will be euthanised at the end of the study (not later than day 21).

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

Calculation of number of animals per stage

Stage 1. Pilot dose finding stage (to establish the virus dose to be used in dose finding stage)

To determine the dose range to be tested in dose finding studies in stage 2, a limited number of mice (3 groups of 4 animals) will be infected with three different dosages (low, medium and high). Considering the pilot nature of the experiment, this can be performed with limited numbers of animals.

Stage 2. Dose finding stage (based on results obtained in the Pilot dose finding stage; this stage is used to establish the virus dose to be used in the Efficacy module)

From previously reported studies (Wunderli, *AJVR*, 2004) with different rabies strains a group size of 10 animals was found to result in statistically significant results to determine the challenge dose required to study efficacy of antivirals and vaccines (Module 4). For studies in this module, similar routes of inoculation and infection doses will be used for virus dose finding.

Based on the number of studies to be performed over a 5 year period, the maximum total number of animals to be used in this part of the project is 248. This maximum number of animals to be used is an estimate based on the expected number of studies to be performed, which is unclear, as the applicant performs these studies as a contract research organization for third parties. The actual number of studies that will be carried out depends on the number of contracts that are realized over the 5 year period for which the project proposal applies. The table below gives an expected breakdown of the number of animals required for this part of the 5 year project proposal.

Module	Stage	Group Size	Estimated Number of Groups/study	Estimated Number of Experiments in 5 years	Total Number of Animals/Module in 5 years
1	1	4	3	4	48
	2	10	5	4	200

Total: 248

B. The animals

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

Species: Mice

Justification: Mice are internationally recognized as a relevant (preclinical) animal model for rabies that not only allows research into disease mechanisms but also the testing of newly developed and/or improved prophylaxis or treatment regimens. Disease progression, transport in the brain and appropriate challenge virus doses have been the subject of thorough research in this model. Both outbred mice (e.g. CD-1, NMRI or Swiss) or inbred mice (e.g. BALB/c or C57BL/6) will be used. Because of group housing conditions, preferably female mice will be used.

Origin: Registered breeder/supplier in Europe

Estimated numbers: see Calculation of number of animals in section A.

Life stages: new-born to adult, depending on the virus strain (see section A, Experimental approach and primary outcome parameters), prophylactic or therapeutic regimen to be used for a particular study. Use of new-borns may be required in case a rabies virus strain is used that requires a more sensitive infection model than (young) adult mice, based on the fact that for diagnostic purposes the use of new-borns is described in the mouse inoculation test (OIE Terrestrial Manual, 2013).

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

Mice have been established in the literature as a good animal model to study (prevention of) rabies infection and disease. To study the efficacy of antiviral intervention strategies, be they chemical entities, monoclonal antibodies or vaccines, several protocols have been established based on different challenge virus strains and their routes of inoculation, that allows research into new potential anti-rabies products in a relevant preclinical model.

The effect of antiviral compounds or vaccines on improvement of the clinical course of rabies infection and/or increasing survival rates after rabies virus infection can only be studied in vivo as no in vitro alternatives currently exist. Mice have been established in the literature as a good animal model to study (prevention of) rabies infection and disease. To study the efficacy of antiviral intervention strategies, be they chemical entities, monoclonal antibodies or vaccines, several protocols have been established based on different challenge virus strains and their routes of inoculation that allows research into new potential anti-rabies products in a relevant preclinical model.

Reduction:

Statistical power analysis (see above) will be provided for each study to be performed under the project proposal to ensure statistically significant results using the minimum number of animals required. The provided power analysis is prospective. Based on the outcome of the first studies, the power analysis

may be refined in order to further minimize the number of animals to be used in subsequent studies in which optimal virus challenge doses are to be determined.

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

- 1) For infection and euthanasia procedures, the animals will be sedated using isoflurane anesthetic procedures. Also, the animals will be scored daily for the appearance of clinical signs based on the scoring system described above. Rabies virus infection is lethal when the virus reaches and starts to replicate in the brain. A clinical scoring system is deployed to prevent unnecessary discomfort to infected animals. When Phase 1 of the clinical scoring system is reached, the observation frequency will be increased to twice daily. As soon as animals enter Phase 3 (humane end point) of the clinical scoring system they will be killed.
- 2) All procedures involving rabies virus will be performed in DM-III equipment/facilities for which destruction procedures for handling of waste have been established.

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 required.

n.a.

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 I.

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

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

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

Animal handling for infection purposes will be performed under anesthesia in order to limit discomfort and distress.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Rabies virus targets the central nervous system upon infection, causing tremor, paralysis (of the hind legs) and ultimately results in death if untreated.

Explain why these effects may emerge.

Untreated ongoing infection with rabies will result in virus replication in the central nervous system.

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

Humane endpoints have been determined to minimise animal suffering that might occur during these studies. The animals will be checked on a daily basis, a frequency that can be increased should specific clinical signs arise (see section J for details on clinical signs and humane endpoint definition)

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.

The animals will be checked daily for signs of disease and twice daily (every 12 hours) after the first signs of disease appear (i.e. ruffled hair). The animals will be euthanized by cervical dislocation under isofluorane anesthesia when they reach humane end points for euthanasia. The humane end points include ruffled hair AND hunched back AND hind leg paralysis. In more detail, rabies encephalitis is expected to follow the course outlined below:

Phase 1: Only ruffled hair: early sign of encephalitis, lasting 2-4 days. From this point forward, animals will be checked every twelve hours for progression to rabies encephalitis.

Phase 2: Ruffled hair AND hunched back. Progression to rabies encephalitis.

Phase 3: Ruffled hair AND hunched back AND hind leg paralysis: animals will be euthanized as soon as they reach Phase 3 (humane end points for euthanasia). Animals in disease phases up to 2 still have the possibility to experience a prolonged survival dependent on the (efficacy of the) treatment under study.

Indicate the likely incidence.

Depending on the model used up to 100% of animals in the highest dosage groups. Rabies virus challenge dosages will be selected so that the range of results will include groups that have survival rates below 50% and groups that have survival rates above 50%. Therefore, the likely incidence for all animals

is estimated to be 50%.

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').

Infection procedures, brief: moderate (i.m., i.n.), severe (i.c.)

Rabies virus infection and development of disease: moderate based on the application of humane endpoints.

Overall maximum severity is considered moderate based on the brevity of severe procedures and the application of humane endpoints

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.

Animals will be euthanized to collect blood and organs. Up to 100% of animals in a group may be killed due to a humane endpoint, depending on the challenge dosage used.

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



Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website (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 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2 | Module 2: Determination of the pharmacokinetics of rabies virus specific antiviral products in mice |

Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

The animal procedures in this part of the project proposal are designed to determine the pharmacokinetics of antiviral compounds. The results of the studies in these modules may be used as input for design of the studies to be performed in Module 4 of the project, in which efficacy of treatment against rabies virus infection is assessed.

Primary outcome parameters depend on the product to be tested and can be virus specific antibody titers in serum in the case of antibody preparations or serum compound concentrations in the case of antiviral compounds. The results of the studies carried out in this part of the project will be used to determine the administration schedule of the tested products to be used for the efficacy studies that are described in Module 4 of the project proposal.

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

To establish the pharmacokinetics of antiviral compounds (e.g. pharmaceutical compounds, antibody preparations) that will determine dosing and frequency of these compounds in the Efficacy module described in Module 4), a typical study design would be the following:

Animal procedures:

14 days is considered to be the maximum testing period. For pharmaceutical compounds the period will most likely be shorter, for antibody preparations, at most, a 14 day period will be used.

Day 0: sampling of blood (reference sample, may also be taken before day 0), administration of antiviral compounds (i.c., i.v., i.m., i.n., i.p. or s.c., depending on the product to be tested).

Day 0 – 14: Sampling of blood, the frequency depends on the product to be tested. Depending on the nature of the product, additional administration times may be required (e.g. if there are indications that a compounds half-life will be below a certain time period so that frequent administration is needed to maintain a certain minimally required level in circulation).

Day 14: euthanasia.

Blood sampling will be done via the facial vein (submandibular), individual sampling volumes will not exceed 100µl. Total blood sampling volume will not surpass 8 ml/kg/28 days (~0.3 ml). Maximum blood sampling frequency will be once every two days over a week.

Administration route justification:

Protection against rabies by vaccination or antiviral compounds can act through various mechanisms, which drives the choice of the challenge model (virus strain, route of challenge infection) and the administration route of the product to be tested. The administration route depends on the nature of the product(s) to be tested and the challenge model in which they are to be tested (in Module 4). In cases where the product exerts its antiviral function in the brain (either directly (e.g. an antiviral preparation that can cross the blood brain barrier), the administration route of the product can be the i.v., i.m., i.p. or s.c. An i.c. administration route may be required when a product to be tested needs to exert its function directly on infected neurons of infected animals in the efficacy studies of Module 4.

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

Calculation of number of animals

Because most formulations to be tested in this module will be tested for the first time in newly developed administration schemes, no power calculation for the size of the treatment or the control groups is performed. Data obtained in these studies will be used for power calculations for future experiments. Also, since the resolution of the readout parameter(s) is likely to differ between studies (these can be serum protein levels, ELISA values, virus neutralization titers, immunoglobulin levels, etc., depending on the product), future power analysis calculations will differ between studies. These will be provided upon submission of the final working protocol to the IvD. The *maximum* group size for the studies in this module is estimated to be 8.

Using statistical Power analysis tools, the number of animals required for each study will be calculated specifically for each study and provided to the IvD. Based on the number of studies to be performed over a 5 year period, the maximum total number of animals to be used in this part of the project is 96. This maximum number of animals to be used is an estimate based on the expected number of studies to be performed, which is unclear, as the applicant performs these studies as a contract research organization for third parties. The actual number of studies that will be carried out depends on the number of

contracts that are realized over the 5 year period for which the project proposal applies. The table below gives an expected breakdown of the number of animals required for this part of the 5 year project proposal.

Module	Group Size	Estimated Number of Groups	Estimated Number of Experiments in 5 years	Total Number of Animals/Module in 5 years
2	8	4	3	96

B. The animals

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

Species: Mice

Justification: Mice are internationally recognized as a relevant (preclinical) animal model for rabies that not only allows research into disease mechanisms but also the testing of newly developed and/or improved prophylaxis or treatment regimens. Disease progression, transport in the brain and appropriate challenge virus doses have been the subject of thorough research in this model. Both outbred mice (e.g. CD-1, NMRI or Swiss) or inbred mice (e.g. BALB/c or C57BL/6) will be used. Because of group housing conditions, preferably female mice will be used.

Origin: Registered breeder/supplier in Europe

Estimated numbers: see Calculation of number of animals.

Life stages: new born to adult, depending on the virus strain, prophylactic or therapeutic regimen to be used for a particular study. Use of new borns may be required in case a rabies virus strain is to be used in Modules 1 and/or 4 that requires a more sensitive infection model than (young) adult mice, based on the fact that for diagnostic purposes the use of new borns is described in the mouse inoculation test (OIE Terrestrial Manual, 2013).

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

Mice have been established in the literature as a good animal model to study (prevention of) rabies infection and disease. To study the efficacy of antiviral intervention strategies, be they chemical entities, monoclonal antibodies or vaccines, several protocols have been established based on different challenge

virus strains and their routes of inoculation, that allows research into new potential anti-rabies products in a relevant preclinical model.

The effect of antiviral compounds or vaccines on improvement of the clinical course of rabies infection and/or increasing survival rates after rabies virus infection can only be studied in vivo as no in vitro alternatives currently exist. Mice have been established in the literature as a good animal model to study (prevention of) rabies infection and disease. To study the efficacy of antiviral intervention strategies, be they chemical entities, monoclonal antibodies or vaccines, several protocols have been established based on different challenge virus strains and their routes of inoculation that allows research into new potential anti-rabies products in a relevant preclinical model.

Reduction:

Statistical power analysis (see above) will be provided for each study to be performed under the project proposal to ensure statistically significant results using the minimum number of animals required. The provided power analysis is prospective. Based on the outcome of the first studies, the power analysis will be refined in order to further minimize the number of animals to be used in subsequent studies.

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

- 1) For administration, sampling and euthanasia procedures, the animals will be sedated using isoflurane anesthetic procedures.
- 2) All procedures will be performed using equipment and facilities for which destruction procedures for handling of waste have been established.

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 required.

n.a.

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 I.

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

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

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

Animal handling for administration and sampling purposes will be performed under anesthesia in order to limit discomfort and distress.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

N.a.

Explain why these effects may emerge.

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

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').

Administration procedures, brief: moderate (i.v., i.m., i.n., i.p. or s.c), severe (i.c.)

Sampling procedures, brief: moderate

Overall maximum severity is considered 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.

Animals will be euthanized to collect blood.

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



Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website (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 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 3 | Module 3: Determination of the immunogenicity of rabies virus specific antiviral products in mice |

Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

The animal procedures in this part of the project proposal are designed to determine the immunogenicity of rabies vaccine preparations. The results of the studies in these modules will be used as input for design of the studies to be performed in Module 4, in which efficacy of vaccine preparations against rabies virus infection is assessed.

Primary outcome parameters are antibody (e.g. virus neutralizing) titers in serum. The results of these studies will be used to determine the design (administration protocol, time of virus challenge) of the study in which the efficacy of the product under research will be assessed, in Module 4.

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

Animal procedures:

Day 0: sampling of blood (reference sample, may also be taken before day 0), administration of vaccines (i.c., i.v., i.m., i.n., i.p. or s.c., depending on the product to be tested).

In case of a multiple shot vaccination scheme, administration of vaccines will be repeated on additional time points. Intervals between vaccinations can range from days to weeks, depending on the vaccine preparation to be tested, ranging from days to weeks.

In order to assess induced immune responses, post vaccination blood samples will be drawn. The sampling frequency (weekly-monthly) depends on the vaccine preparation to be tested. An immunogenicity study can range from weeks to months.

At the end of the study, the animals will be euthanized.

Blood sampling will be done via the facial vein (submandibular), individual sampling volumes will not exceed 100µl. Total blood sampling volume will not surpass 8 ml/kg/28 days (~0.3 ml). Maximum blood sampling frequency will be once per week.

Administration route justification:

Protection against rabies by vaccination or antiviral compounds can act through various mechanisms, which drives the choice of the challenge model (virus strain, route of challenge infection) and the administration route of the product to be tested. The administration route depends on the nature of the product(s) to be tested and the challenge model in which they are to be tested (in Module 4). In cases where the product exerts its antiviral function in the brain (either directly (e.g. an antiviral preparation that can cross the blood brain barrier), the administration route of the product can be the i.v., i.m., i.p. or s.c. An i.c. administration route may be required when a product to be tested needs to exert its function directly on infected neurons of infected animals in the efficacy studies of Module 4.

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

Calculation of number of animals

Immunogenicity module (to establish the immunogenicity (vaccine dose, vaccination scheme) of anti-rabies vaccines that will be used in the Efficacy module) Because most vaccines formulations will be tested for immunogenicity for the first time in newly developed vaccination schemes, no power calculation for the size of the treatment or the control groups is performed. Data obtained in these studies will be used for power calculations for future experiments. Also, since the resolution of the readout parameter(s) is likely to differ between studies (these can be ELISA values, virus neutralization titers, immunoglobulin levels, etc.), future power analysis calculations will differ between studies. These will be provided upon submission of the final working protocol to the IvD. The *maximum* group size for the studies in these module will be 10.

Using statistical Power analysis tools, the number of animals required for each study will be calculated specifically for each study and provided to the IvD. As described above, a maximum of 10 animals per treatment group is considered adequate. Based on the number of studies to be performed over a 5 year period, the maximum total number of animals to be used in this part of the project is 1000.

This maximum number of animals to be used is an estimate based on the expected number of studies to be performed, which is unclear, as the applicant performs these studies as a contract research organization for third parties. The actual number of studies that will be carried out depends on the number of contracts that are realized over the 5 year period for which the project proposal applies. The table below gives an expected breakdown of the number of animals required for this part of the 5 year project proposal.

Module	Group Size	Estimated Number of Groups	Estimated Number of Experiments in 5 years	Total Number of Animals/Module in 5 years
3	10	10	10	1000

B. The animals

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

Species: Mice

Justification: Mice are internationally recognized as a relevant (preclinical) animal model for rabies that not only allows research into disease mechanisms but also the testing of newly developed and/or improved prophylaxis or treatment regimens. Disease progression, transport in the brain and appropriate challenge virus doses have been the subject of thorough research in this model. Both outbred mice (e.g. CD-1, NMRI or Swiss) or inbred mice (e.g. BALB/c or C57BL/6) will be used. Because of group housing conditions, preferably female mice will be used.

Origin: Registered breeder/supplier in Europe

Estimated numbers: see Calculation of number of animals.

Life stages: new born to adult, depending on the virus strain, prophylactic or therapeutic regimen to be used for a particular study. Use of new borns may be required in case a rabies virus strain is to be used in Modules 1 and/or 4 that requires a more sensitive infection model than (young) adult mice, based on the fact that for diagnostic purposes the use of new borns is described in the mouse inoculation test (OIE Terrestrial Manual, 2013).

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

Mice have been established in the literature as a good animal model to study (prevention of) rabies infection and disease. To study the efficacy of antiviral intervention strategies, be they chemical entities, monoclonal antibodies or vaccines, several protocols have been established based on different challenge virus strains and their routes of inoculation, that allows research into new potential anti-rabies products in a relevant preclinical model.

The effect of antiviral compounds or vaccines on improvement of the clinical course of rabies infection and/or increasing survival rates after rabies virus

infection can only be studied in vivo as no in vitro alternatives currently exist. Mice have been established in the literature as a good animal model to study (prevention of) rabies infection and disease. To study the efficacy of antiviral intervention strategies, be they chemical entities, monoclonal antibodies or vaccines, several protocols have been established based on different challenge virus strains and their routes of inoculation that allows research into new potential anti-rabies products in a relevant preclinical model.

Reduction:

Statistical power analysis (see above) will be provided for each study to be performed under the project proposal to ensure statistically significant results using the minimum number of animals required. The provided power analysis is prospective. Based on the outcome of the first studies, the power analysis will be refined in order to further minimize the number of animals to be used in subsequent studies.

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

- 1) For administration, sampling and euthanasia procedures, the animals will be sedated using isoflurane anesthetic procedures.
- 2) All procedures will be performed using equipment and facilities for which destruction procedures for handling of waste have been established.

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 required.

n.a.

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 I.

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

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

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

Animal handling for administration and sampling purposes will be performed under anesthesia in order to limit discomfort and distress.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

N.a.

Explain why these effects may emerge.

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

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').

Administration procedures, brief: moderate

Sampling procedures, brief: moderate

Overall maximum severity is considered 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.

Animals will be euthanized to collect blood and organs. Up to 100% of non-treatment groups may be killed due to a humane endpoint.

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



Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website (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 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 4 | Module 4: Determination of the prophylactic and/or therapeutic efficacy of rabies virus specific antiviral products in mice |
- Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

The animal procedures in this part of the project proposal are designed to determine the efficacy of antiviral compounds and/or the immunogenicity of rabies vaccine preparations against rabies virus infection is assessed.

The primary outcome parameters of this module are: prevention of clinical symptoms and survival.

Protection against rabies by vaccination or antiviral compounds can act through various mechanisms, which drives the choice of the challenge model (virus strain, route of challenge infection). Since it remains unclear how exactly the virus is transmitted from the site of infection to the central nervous system and how long this transport takes, demonstration of efficacy against replication in the central nervous system may require the use of intracranial (i.c.) challenge models. Also, in cases where virus strains are to be used for which no robust peripheral (i.m.) challenge dose is available that accommodates use of survival as a primary readout parameter, an i.c. challenge is required. Although primary i.c. infection in field situations has never been reported, the i.c. challenge is a valuable asset of the mouse/rabies model that allows efficacy assessment of anti-rabies intervention strategies. In cases where experiments are performed that will be used for registration purposes of newly developed vaccines, use of an i.c. challenge model may be required (FDA and Ph. Eur regulations).

The administration route of a virus for a particular study within this module depends on the nature of the product(s) to be tested and the challenge model in which they are to be tested. In cases where the product exerts its antiviral function in the brain (either directly (e.g. an antiviral preparation that can cross the blood brain barrier) or indirectly (e.g. a vaccine preparation) via induced immune responses), the administration route of the virus preparation can be the intracranial (i.c.) or intranasal (i.n.) route. In cases where the product exerts its function outside of the brain, a peripheral, i.e. intramuscular (i.m.), challenge will be used. Additionally, kinetics of the antiviral product to be tested may influence the choice of the infection route, e.g. in the case of a RNA or DNA based product from which the effector molecule(s) need(s) to be expressed before it can exert its function, the challenge route can be intracranially or intranasally if the bioavailability is quick or intramuscular if bioavailability requires prolonged incubation after administration. Furthermore, when a product to be tested is to be applied intracranially, this will also drive the choice of the infection route. In cases where virus strain, challenge dose and route are unknown, these will be determined in studies carried out in Module 1 of the project proposal (pilot dose and dose finding for new/unknown virus strains or inoculation routes). Which challenge model is to be used and if (pilot)dose finding studies will be required before studies in this module can be designed and performed will be clearly indicated when submitting the working protocols to the AWB.

Rabies virus infection is lethal. Infected animals will develop rabies disease manifested with neurological symptoms of paralysis and die as result of encephalitis. Typically, after peripheral inoculation with a lethal dose of rabies virus, mice will develop ruffled hair approximately 5-7 days post infection and within 2-4 days will further develop hind-leg paralysis and die as a result of infection. The clinical signs are scored using Phases, the features of which are described below.

Phase 1: Only ruffled hair: early sign of encephalitis, typically lasting 2-4 days.

Phase 2: Ruffled hair AND hunched back. Progression to rabies encephalitis.

Phase 3: Ruffled hair AND hunched back AND hind leg paralysis.

The animals that are challenged with rabies virus in module 3 will be euthanized as soon as they reach Phase 3 (humane end point for euthanasia).

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

Animal procedures for testing the efficacy of a therapeutic agent:

On the day of challenge infection the animals are weighed and a blood sample is taken for analysis purposes. The animals will then be challenged either intramuscularly, intranasally or intracranially (based on criteria described above) with rabies, followed by daily weighing and scoring of clinical signs

(Phases 1 to 3). Subsequently, depending on the product, one or multiple administrations may be used. Routes may be i.c., i.v., i.m., i.n., i.p. or s.c., depending on the product to be tested. In case of multiple administrations, the intervals can range from several days to weeks. The information on which these parameters (timing, frequency and route of administration) are chosen originates from either available information from the provider of the product, available results from previous experiments or results obtained in Module 1 (virus challenge parameters (dose and route)) and Module 2 of the current animal procedure (administration parameters of the product to be tested (pharmacokinetics)) in the context of the project. This background information and the final study design will be provided to the IvD when submitting the working protocols for each study to be performed within the context of this module.

Animals will be euthanised as soon as they reach Phase 3 (humane end points for euthanasia). The post challenge follow up period is 28 days. Surviving animals will be euthanised at the end of the study on day 28.

Animal procedures for testing the efficacy of a prophylactic agent/vaccine:

Depending on the product, one or multiple administrations may be used. Routes may be i.c, i.v., i.m., i.n., i.p. or s.c., depending on the product to be tested. In case of multiple administrations, the intervals can range from several days to weeks. The information on which these parameters (timing, frequency and route of administration) are chosen originates from either available information from the provider of the product, available results from previous experiments or results obtained in Module 1 (virus challenge parameters (dose and route)) and Modules 2 or 3 (administration parameters of the product to be tested (pharmacokinetics and/or immunogenicity)) in the context of the project. This background information and the final study design will be provided to the IvD when submitting the working protocols for each study to be performed within the context of this module. After completion of the administration schedule, the animals are weighed on the day of challenge infection and a blood sample is taken for analysis purposes. The animals will then be challenged either intramuscularly, intranasally or intracranially (based on criteria described above) with rabies, followed by daily weighing and scoring of clinical signs (Phases 1 to 3).

Animals will be euthanised as soon as they reach Phase 3 (humane end points for euthanasia). The post challenge follow up period is 28 days. Surviving animals will be euthanised at the end of the study on day 28.

Blood sampling will be done via the facial vein (submandularly), individual sampling volumes will not exceed 100µl. Total blood sampling volume will not surpass 8 ml/kg/28 days (~0.3 ml). Maximum blood sampling frequency will be once per week.

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

Calculation of number of animals

All animals will be enrolled at the experiment at the same time point and will be followed up for 28 days. Based on available data or data generated in the (pilot) dose finding modules, it is expected that the used challenge dose can result in 50% to 100% fatality.

For efficacy testing of antiviral compounds through determination of survival rates in case of a 100% lethal challenge dose infection after intracranial or intranasal infection, prior data indicate that the median survival time of non-treated mice is 8 days (Terry, *PLoS One*, 2014). If the true median survival times in the control (non-treated) and experimentally treated groups are 8 and 28 days, respectively, we will need to study 15 experimental subjects and 15 control subjects to be able to reject the null hypothesis that the experimental and control survival curves are equal with a probability (power) of 0.8. The Type I error probability associated with this test of this null hypothesis is 0.05.

For vaccine studies using a 50% lethal dose 16 experimental subjects vs. 16 animals control subjects are needed to reject the null hypothesis that the experimental and control survival rates are equal with a probability (power) of 0.8. The Type I error probability associated with this test of this null hypothesis is 0.05.

For vaccine studies using a 100% lethal dose 8 experimental subjects vs. 8 animals control subjects are needed to reject the null hypothesis that the experimental and control survival rates are equal with a probability (power) of 0.8. The Type I error probability associated with this test of this null

hypothesis is 0.05.

Using statistical Power analysis tools, the number of animals required for each study will be calculated specifically for each study, a maximum of 16 animals per treatment group is considered adequate. Based on the number of studies to be performed over a 5 year period, the maximum total number of animals to be used in this part of the project is 1200.

See analysis below for group size determination. The maximum number of animals to be used is an estimate based on the expected number of studies to be performed, which is unclear, as the applicant performs these studies as a contract research organization for third parties. The actual number of studies that will be carried out depends on the number of contracts that are realized over the 5 year period for which the project proposal applies. The table below gives an expected breakdown of the number of animals required for this part of the 5 year project proposal.

Module	Group Size	Estimated Number of Groups	Estimated Number of Experiments in 5 years	Total Number of Animals/Module in 5 years
4	16	5	15	1200

B. The animals

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

Species: Mice

Justification: Mice are internationally recognized as a relevant (preclinical) animal model for rabies that not only allows research into disease mechanisms but also the testing of newly developed and/or improved prophylaxis or treatment regimens. Disease progression, transport in the brain and appropriate challenge virus doses have been the subject of thorough research in this model. Both outbred mice (e.g. CD-1, NMRI or Swiss) or inbred mice (e.g. BALB/c or C57BL/6) will be used. Because of group housing conditions, preferably female mice will be used.

Origin: Registered breeder/supplier in Europe

Estimated numbers: see Calculation of number of animals in section A.

Life stages: newborn to adult, depending on the virus strain (see section A, Experimental approach and primary outcome parameters), prophylactic or therapeutic regimen to be used for a particular study. Use of new-borns may be required in case a rabies virus strain is used that requires a more sensitive infection model than (young) adult mice, based on the fact that for diagnostic purposes the use of new-borns is described in the mouse inoculation test (OIE Terrestrial Manual, 2013).

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

Mice have been established in the literature as a good animal model to study (prevention of) rabies infection and disease. To study the efficacy of antiviral intervention strategies, be they chemical entities, monoclonal antibodies or vaccines, several protocols have been established based on different challenge virus strains and their routes of inoculation, that allows research into new potential anti-rabies products in a relevant preclinical model.

The effect of antiviral compounds or vaccines on improvement of the clinical course of rabies infection and/or increasing survival rates after rabies virus infection can only be studied in vivo as no in vitro alternatives currently exist. Mice have been established in the literature as a good animal model to study (prevention of) rabies infection and disease. To study the efficacy of antiviral intervention strategies, be they chemical entities, monoclonal antibodies or vaccines, several protocols have been established based on different challenge virus strains and their routes of inoculation that allows research into new potential anti-rabies products in a relevant preclinical model.

Reduction:

Statistical power analysis (see above) will be provided for each study to be performed under the project proposal to ensure statistically significant results using the minimum number of animals required. The provided power analysis is prospective. Based on the outcome of the first studies, the power analysis will be refined in order to further minimize the number of animals to be used in subsequent studies.

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

- 1) For infection and euthanasia procedures, the animals will be sedated using isoflurane anesthetic procedures. Also, the animals will be scored daily for the appearance of clinical signs based on the scoring system described above. Rabies virus infection is lethal when the virus reaches and starts to replicate in the brain. A clinical scoring system is deployed to prevent unnecessary discomfort to infected animals. When Phase 1 of the clinical scoring system is reached, the observation frequency will be increased to twice daily. As soon as animals enter Phase 3 (humane end point) of the clinical scoring system they will be killed.

In order to reject the null hypothesis that survival curves are equal, a valid comparison between treated and non-treated (control) groups is needed and therefore animals are not taken out of experiment unless they reach phase 3 of disease. Animals in disease phases up to 2 still have the possibility to experience a prolonged survival dependent on (the efficacy of) the treatment under study.

- 2) All procedures involving rabies virus will be performed in DM-III equipment/facilities for which destruction procedures for handling of waste have been established.
-

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 required.

n.a.

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 I.

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

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

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

Animal handling for administration, infection and sampling purposes will be performed under anesthesia in order to limit discomfort and distress.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Rabies virus targets the central nervous system upon infection, causing tremor, paralysis (of the hind legs) and ultimately results in death if untreated.

Explain why these effects may emerge.

Untreated ongoing infection with rabies will result in virus replication in the central nervous system.

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

Humane endpoints have been determined to minimise animal suffering that might occur during these studies. The animals will be checked on a daily basis, a frequency that can be increased should specific clinical signs arise (see section J for details on clinical signs and humane endpoint definition)

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.

The animals will be checked daily for signs of disease and twice daily (every 12 hours) after the first signs of disease appear (i.e. ruffled hair). The animals will be euthanized by cervical dislocation under isofluorane anesthesia when they reach humane end points for euthanasia. The humane end points include ruffled hair AND hunched back AND hind leg paralysis. In more detail, rabies encephalitis is expected to follow the course outlined below:

Phase 1: Only ruffled hair: early sign of encephalitis, lasting 2-4 days. From this point forward, animals will be checked every twelve hours for progression to rabies encephalitis.

Phase 2: Ruffled hair AND hunched back. Progression to rabies encephalitis.

Phase 3: Ruffled hair AND hunched back AND hind leg paralysis: animals will be euthanized as soon as they reach Phase 3 (humane end points for euthanasia). Animals in disease phases up to 2 still have the possibility to experience a prolonged survival dependent on the (efficacy of the) treatment under study.

Indicate the likely incidence.

Depending on the rabies challenge model used the incidence will range from 50% to 100% of animals in non-treatment groups. The incidence in treatment groups will range from 0% to 100%, depending on the efficacy of the products to be tested and on the rabies challenge model.

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').

Administration procedures, brief: moderate (i.v., i.m., i.n., i.p. or s.c), severe (i.c.)

Sampling procedures, brief: moderate

Infection procedures, brief: moderate (i.m., i.n.), severe (i.c.)

Rabies virus infection and development of disease: moderate based on the application of humane endpoints.

Overall maximum severity is considered moderate based on the brevity of severe procedures and the application of humane endpoints

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.

Animals will be euthanized to collect blood and organs. Up to 100% of non-treatment groups may be killed due to a humane endpoint.

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

Format DEC-advies concept

Maak bij de toepassing van dit format gebruik van de bijbehorende toelichting, waarin elke stap in het beoordelingsproces wordt toegelicht

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer AVD905002015124
2. Titel van het project: Evaluation of Antiviral intervention strategies of Rabies in mice.
3. Titel van de NTS: Testen van anti-rabies behandelings strategieën in muizen.
4. Type aanvraag:

nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: DEC-Consult
 - telefoonnummer contactpersoon: ████████████████████████████████
 - mailadres contactpersoon: ████████████████████████████████████████████████████████████
6. Adviestraject (data):

ontvangen door DEC: 2 juni 2015

aanvraag compleet: 1 juli 2015

in vergadering besproken: 10 juni 2015, 8 juli 2015

anderszins behandeld: schriftelijk, via email 19 juni 2015

termijnonderbreking(en) van / tot: nvt

besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen : nvt

aanpassing (concept) aanvraag 19 juni 2015, 1 juli 2015

advies aan CCD
7. Eventueel horen van aanvrager nvt
8. Correspondentie met de aanvrager
 - **Datum 12 juni 2015 (completering aanvraag)**
 - **Projectgedeelte:**
 - De looptijd van het project nader onderbouwen.
 - Punt 3.1: De stand van wetenschap en praktijk m.b.t. vaccinatie tegen rabiës en behandeling van een rabiësinfectie beter weergeven.
 - Punt 3.2: verduidelijken op basis van welke ingangscriteria vaccins en therapeutica in proefdieren getest zullen worden.

- Punt 3.3: Nader toelichten wat het belang is. Er zijn al werkzame vaccins en *post exposure* profylaxe.
- Punt 3.4. meerdere typen dierproeven onderscheiden.
- **Appendix dierproeven:**
- nader toelichten van de primaire uitkomst parameters voor PK en PD
- Intracraniale injecties: waarom zijn die nodig in de context van dit project; inschatting van het ongerief van die injecties.
- Bij modules 3 en 4 moet zicht worden gegeven op de frequentie en methode van afname en de maximale volumina (per keer en over de tijd gezien). Geen gedetailleerde schema's maar wel begrenzing in het licht van dierenwelzijn.
- geen wettelijk voorgeschreven onderzoek. Vraag E is n.v.t.
- Pijn en ander ongerief dienen uit elkaar gehaald te worden.
- Ongerief inschattingen, toepassen humane eindpunten
- **NTS:**
- De NTS zal moeten worden aangepast aan het aangepaste projectvoorstel. Let op de lengte.
- **Reactie van de aanvrager (19 juni 2015):** De aanvrager heeft de aanvraag gecompliceerd en aangepast.
- **Vragen (26 juni 2015)**
- **Algemeen**
- De categorie "registratie doeleinden" wordt niet aangekruist. Dan kan het verwarrend zijn wanneer later in de projectbeschrijving en de dierproeven wel een eis van FDA en EMA wordt genoemd.
- Het is niet duidelijk waarom en wanneer er van welke virus stam gebruik gemaakt zal worden en waarom er in sommige gevallen *newborn* dieren nodig zijn.
- **M.b.t. formulieren dierproeven 1-4:**
- Verzoek om consequent dezelfde nummers en termen te gebruiken, teneinde verwarring te voorkomen. Enkele niet lopende zinnen verbeteren.
- Het ongerief van de i.c. toediening wordt geclassificeerd als ernstig. Dit dient nader toegelicht te worden.
- **M.b.t. NTS:**
- De ongerief inschatting (maximaal matig ongerief) komt niet overeen met de ongerief inschatting in de dierproeven (maximaal ernstig ongerief).
- **Antwoorden van de aanvrager (1 juli 2015):**
- Registratie doeleinden (Regulatory use or routine production) is aangekruist voor het geval zich proeven voor zullen doen waarin aan genoemde eisen voldaan dient te worden.
- De keuze van de virusstam en route van infectie zijn afhankelijk van een aantal factoren welke omschreven zijn in Sectie A van de modules waarin

infectieprocedures met rabiesvirus gebruikt worden. In de documenten is een verwijzing naar de desbetreffende sectie toegevoegd en de volgende onderbouwing voor het gebruik van pasgeborenen van de zgn. Life stages is verkort opgenomen in Sectie B. The Animals: Het gebruik van pasgeborenen kan nodig zijn indien voor het kunnen detecteren van een bepaald rabiesvirus een gevoeliger infectiemodel gewenst is dan jong volwassen muizen. In de rabiesdiagnostiek is het gebruik van pasgeborenen onderdeel van de zgn. mouse inoculation test (MIT) die wordt toegepast indien celkweekmethoden niet beschikbaar en/of toereikend zijn (WHO Laboratory Techniques in Rabies; OIE Terrestrial Manual 2013). Indien virusstammen gebruikt worden waarvoor geen geschikte infectiedosis vastgesteld kan worden in (jong) volwassen muizen, kan het nodig zijn om gebruik te maken van pasgeborenen.

- Dit is gecorrigeerd in de nieuwe versie van het document.
- In een rapport over verfijning van toedieningsprocedures (Morton et al., *Laboratory Animals*, 2001) wordt het ongerief van deze procedure (i.c. injectie) geclassificeerd als ernstig ten gevolge van de welfare impact (citaat: "Most impact: e.g. anaesthesia may be required (with attendant risks), death or serious injury could result from incorrect technique. Notes: The scoring system refers to the impact of the route, not the substance, and assumes that the technique is carried out by trained and competent staff with appropriate resources"). Vanzelfsprekend wordt bij ons de techniek uitgevoerd door getraind en competent personeel. Het ongerief van de procedure op zichzelf is dus als ernstig gekwalificeerd en is kort van duur.
- De NTS is gecorrigeerd in de nieuwe versie van het document.

9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC): nvt de DEC zelf beschikt over de relevante expertise

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag
3. De DEC is competent om hierover te adviseren
4. Geen van de aanwezige DEC-leden is betrokken bij het betreffende project.

C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:

X uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord

2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën zijn in overeenstemming met de hoofddoelstellingen
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Het betreft het testen

(farmacokinetiek, immunogeniteit en/of werkzaamheid) van nieuw ontwikkelde antivirale interventiestrategieën tegen Rabiës in de relevante preklinische muismodellen waarover de aanvrager beschikt. Hoewel reeds vaccins en *post exposure profylaxe* (PEP) beschikbaar zijn, is er behoefte aan betere vaccins en antilichaampreparaten, die effectiever en goedkoper zijn dan de huidige middelen. Daarnaast is er op dit moment geen goede behandeling beschikbaar voor het stadium van Rabiës waarin PEP niet meer werkt. Ook voor dat stadium zullen kandidaat middelen getest worden. De beschikbaarheid en toepasbaarheid van deze middelen in ontwikkelingslanden, waar het Rabiësprobleem het grootst is, kan nog verbeterd worden. Dit laatste heeft de DEC ook meegewogen bij haar inschatting van het belang van dit project. Tenslotte is het testen van de nieuw ontwikkelde middelen in een relevant preklinisch diermodel een onontkoombare stap op weg naar toepassing van die middelen in mensen. Het belang wordt daarom door de DEC ingeschat als substantieel.

4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstellingen van het project. De aanvrager heeft de kennis en de expertise om de voorgestelde experimenten uit te voeren.
5. Er is geen sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. De toegepaste methode van anesthesie en euthanasie zijn conform de richtlijn.
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. De aanvrager zelf benoemt dit op verschillende plaatsen in de aanvraag als licht tot ernstig en gemiddeld matig. De DEC is er in haar afweging uitgegaan dat 50 procent van de dieren in de virus dosefinding proeven in appendix 1 met kortdurend ernstig ongerief zullen worden geconfronteerd (= humaan eindpunt). Dit geldt eveneens voor de dieren in appendix 4 die onbeschermd worden gechallenged met het virus of waarbij het te testen antivirale middel mogelijk niet voldoende bescherming biedt. Het exacte percentage is op voorhand niet goed in te schatten. Het ernstige ongerief heeft dus betrekking op dieren die na een challenge met het Rabiësvirus terecht komen in wat door de aanvrager wordt aangeduid als fase 3 (gekenmerkt door een onverzorgde vacht, kromme rug/ineengedoken zitten en verlamming van de achterpoten). De aanvrager geeft nadrukkelijk aan hij er voor zal zorgen dat deze situatie met ernstige ongerief zo kort mogelijk zal duren door de dieren regelmatig te monitoren en op humane wijze te doden, zodra zij deze fase 3 bereiken. Alle overige dieren ondervinden kortdurend matig ongerief als gevolg van de toediening van antivirale middelen, bloedafnames en de toediening van het rabiësvirus (niet de gevolgen daarvan) via verschillende injectieroutes. De aanvrager classificeert het ongerief bij het uitvoeren van de intracraniale injecties als kortdurend ernstig ongerief.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**. De te onderzoeken middelen zijn voorafgaand aan de dierproef *in vitro* getest (op basis van *in vitro* onderzoek geselecteerd). Het uiteindelijk bepalen van de effectiviteit van een preventieve- of therapeutische antivirale behandeling dient op grond van klinische verschijnselen (voorkomen van ziekte en/of sterfte) te geschieden en is daarom niet mogelijk zonder het gebruik van proefdieren.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. Het maximaal aantal te gebruiken dieren per studie is realistisch ingeschat.

9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. De aanvrager heeft beargumenteerd dat het bij de challenge van de muizen met het Rabiësvirus noodzakelijk is om te wachten met het toepassen van een humaan eindpunten tot het moment dat de symptomen van fase 3 zich voordoen (zie punt 6 hierboven). Dieren in fase twee zouden namelijk nog kunnen herstellen als gevolg van de behandeling. Ik vind dit niet echt een logisch betoog. Het komt erop neer dat de indieners aangegeven hebben dat 'dood' de enige toepasbare meet parameter in deze studies is. Het toepassen van de humane eindpunten kan dientengevolge pas op het moment waarop het duidelijk is dat het dier uiteindelijk zal overlijden en zijn erop gericht deze laatste fase voor het dier te bekorten. Het is aangetoond dat het optreden van symptomen van fase 3 deze voorspellende waarde hebben. Daarom is ook gekozen voor het optreden van fase 3 symptomen als humaan eindpunt. Fase 2 symptomen zijn geen goede voorspeller voor het doodgaan van het dieren. Dieren kunnen hiervan nog herstellen.

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

D. Ethische afweging

Infectie met Rabiës is dodelijk, indien niet tijdig *post exposure* profylaxe (PEP) wordt toegediend. Er zijn op dit moment geen middelen die het klinische verloop van Rabiës gunstig kunnen beïnvloeden in een stadium waarin PEP niet meer werkt. De huidige vaccins en PEP zijn weliswaar werkzaam, maar er is ruimte voor verbetering, niet alleen wat betreft de werkzaamheid, maar ook voor wat betreft het beschikbaar maken van goede en goedkope middelen voor toepassing in ontwikkelingslanden, waar het Rabiësprobleem verreweg het grootst is. Dit laatste vindt de DEC een belangrijke overweging in de ethische afweging. Het testen van veelbelovende nieuwe middelen in een preklinisch diermodel is een onontkoombare stap op weg naar uiteindelijke toepassing van deze middelen in de mens. De DEC schat het belang van dit project daarom in als substantieel. Er is voldaan aan de vereisten van verfijning en vermindering. Het is niet mogelijk dit onderzoek bij mensen uit te voeren en voor het ultieme bewijs van bescherming bij of tegen infectie zijn geen *in vitro* of *ex vivo* alternatieven beschikbaar.

Tegenover dit reële belang staat dat een deel van de dieren gedurende korte tijd ernstig ongerief zullen ondervinden. De DEC acht het belang van het beschikbaar komen van betere en goedkopere middelen voor de behandeling van Rabiës, groot genoeg om de uitvoering van de voorgestelde dierproeven te rechtvaardigen, mits ernstig ongerief zoveel mogelijk voorkomen wordt en de duur ervan tot een minimum beperkt wordt door het strikt toepassen van de genoemde humane eindpunten.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

- De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarde

10 december 2014

- Op grond van de wettelijk vereiste (risico op (kortdurend) ernstig ongerief), dient de projectleider bij beëindiging van het project een rapportage in te sturen naar de CCD die is afgestemd met de IvD.
- 2.** Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

BioXpert BV

██████████
Nistelrooise Baan 3
5374 RE Schaijk

**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl
T 0900-28 000 28 (10 ct /min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD905002015124

Datum 14-07-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning dierproeven

Bijlagen

2

Geachte ██████████,

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 14 juli 2015.

Het aanvraagnummer dat wij hieraan hebben gegeven is AVD905002015124. Gebruik dit nummer als u contact met ons opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

Als wij nog informatie van u nodig hebben dan ontvangt u daarover bericht. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn ontvangen. U ontvangt binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. Als wij nog informatie nodig hebben, wordt deze termijn opgeschort. In geval van een complexe aanvraag kan deze termijn met maximaal vijftien werkdagen verlengd worden. U krijgt bericht als de beslisperiode van uw aanvraag vanwege complexiteit wordt verlengd. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Factuur

Bijgaand treft u de factuur aan voor de betaling van de leges. Wij verzoeken u de leges zo spoedig mogelijk te betalen, zodat we uw aanvraag in behandeling kunnen nemen. Is uw betaling niet binnen dertig dagen ontvangen, dan kan uw aanvraag buiten behandeling worden gesteld. Dit betekent dat uw aanvraag niet beoordeeld wordt en u uw project niet mag starten.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlage:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

BioXpert BV

██████████
Nistelrooise Baan 3
5374 RE Schaijk

**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl

T 0900 28 000 28 (10 ct /min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
905002015124

Factuurdatum	14 juli 2015
Vervaldatum	14 augustus 2015
Factuurnummer	201570124
Betreft	Factuur Aanvraag projectvergunning dierproeven

Omschrijving

Betaling leges projectvergunning dierproeven
Betreft aanvraag 201570124

Bedrag

€ 741,-

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL28RBOS 056.99.96.066 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

BioXpert B.V.

Nistelrooise Baan 3
5374RE Schaijk


Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD905002015124

Bijlagen
1

Datum 20 augustus 2015
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte 

Op 14 juli 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'Evaluation of Antiviral intervention strategies of Rabies in mice' met aanvraagnummer AVD905002015124. Op 28 juli 2015 heeft u uw aanvraag aangevuld na aanleiding van de door ons gestelde vragen. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag gedeeltelijk goed op grond van artikel 10a van de Wet op de dierproeven (hierna de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning. U kunt met uw project 'Evaluation of Antiviral intervention strategies of Rabies in mice' starten, maar alleen met de dierproeven 1 en 2. Hierna kunt u lezen op grond van welke overwegingen wij tot deze beslissing zijn gekomen. De vergunning wordt afgegeven van 20 augustus 2015 tot en met 31 mei 2020. De begindatum van de vergunning wijkt af van uw aanvraag omdat de startdatum op uw aanvraag in het verleden ligt.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de dierexperimentencommissie DEC-Consult gevoegd. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons om onderstaande redenen niet volledig vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Een deel van uw project is gericht op farmaca onderzoek (dierproeven 1 en 2) en een ander deel op het testen van vaccins (dierproeven 3 en 4). Wij zijn van mening dat er onvoldoende inhoudelijke samenhang is tussen deze twee afzonderlijke componenten. Wij vinden dat uw project twee verschillende doelstellingen heeft die in twee aparte aanvragen moeten worden behandeld. Om deze reden zien wij uw aanvraag niet als een toetsbare eenheid. Om deze reden kunt u de dierproeven 1 en 2 onder deze vergunning uitvoeren, maar voor de dierproeven 3 en 4 moet u een aparte aanvraag indienen.

Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

Datum
20 augustus 2015
Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD905002015124

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 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.

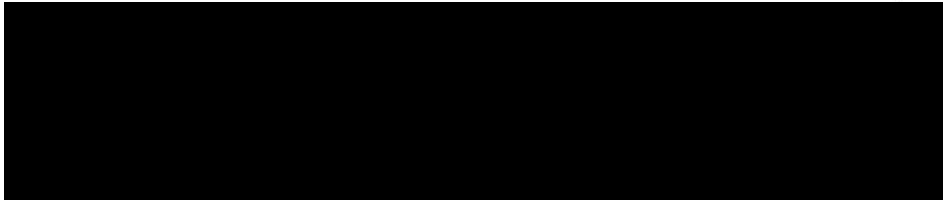
Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op <http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

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 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 deeluitmakend: - DEC-advies
 - Weergave wet en regelgeving



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: BioExpert B.V.
 Adres: Nistelrooise Baan 3
 Postcode en woonplaats: 5374RE Schaijk
 Deelnemersnummer: 90500

deze projectvergunning voor het tijdvak 20 augustus 2015 tot en met 31 mei 2020, voor het project 'Evaluation of Antiviral intervention strategies of Rabies in mice' met aanvraagnummer AVD905002015124, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-Consult.

De functie van de verantwoordelijke onderzoeker is manager preclinical services.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen bij digitale indiening op 14 juli 2015;
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 14 juli 2015;
 - b. Niet-Technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 14 juli 2015, en aangepast op ;
 - c. Advies van dierexperimentencommissie DEC-Consult ontvangen op 14 juli 2015;
 - d. De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 28 juli 2015.

Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren voor het vergunde tijdvak	Ernst
Module 1: Rabies virus dose-finding in mice	Muizen (<i>Mus musculus</i>)	248	Matig en ernstig
Module 2: Determination of the pharmacokinetics of rabies virus specific antiviral products in mice	Muizen (<i>Mus musculus</i>)	96	Matig en ernstig

Voorwaarde:

Op grond van artikel 10a1 lid 2 Wet zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen:

- 1) De aanvrager zal voor elke studie samen met de IvD het gebruik van dieren van beiden geslachten overwegen.
- 2) Indien later, in het kader van het project, proeven worden gedaan waarin aan de eisen van het wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie dient te worden voldaan, moet de aanvrager vooraf met de IvD afstemmen of er sprake van herhaling is.
- 3) In Artikel 10, eerste lid, onder a, Wet op de dierproeven, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te melden bij

Datum
20 augustus 2015

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD905002015124

de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

Beoordeling achteraf:

Aangezien er sprake is van ernstig ongerief, is een beoordeling achteraf vereist. Deze moet plaatst vinden binnen een jaar na afloop van het project, dus vóór 31 mei 2021.

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

Volgens artikel 10c van de Wet op de dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g. 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 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 onvermijdelijk 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

Datum
20 augustus 2015

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD905002015124

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.

Beoordeling achteraf

Volgens artikel 10a1, lid 1d en lid 3 van de wet worden projecten waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt, projecten die als ernstig ingedeelde dierproeven omvatten of een dierproef die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, achteraf beoordeeld worden. In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet en wordt daarom voorzien van een beoordeling achteraf.

Deze beoordeling zal binnen een jaar na afloop van de vergunning plaatsvinden. Er zal dan beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt. Daarnaast wordt bekeken of de schade die de dieren hebben ondervonden, het aantal en soorten proefdieren en de ernst van lijden van de proevendieren conform de vergunning waren.

[REDACTED]

Van: ZBO-CCD
Verzonden: maandag 1 juni 2015 17:02
Aan: [REDACTED]
Onderwerp: RE: Aanvraag CCD-dossiernummer

Beste [REDACTED]

Zoals gevraagd hierbij een AVD905002015124, voor het project Evaluation of Antiviral intervention strategies of Rabies in mice.

Wilt u bij verdere correspondentie altijd het dossiernummer vermelden.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven www.zbo-ccd.nl
Nationaal Comité advies proefdierbeleid

Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag

Van: [REDACTED]
Verzonden: maandag 1 juni 2015 16:41
Aan: ZBO-CCD
CC: [REDACTED]
Onderwerp: Aanvraag CCD-dossiernummer

Beste [REDACTED]

Namens de vergunninghouder van BioXpert wil ik bij deze een CCD-nummer aanvragen voor het volgende projectvoorstel:

Instelling: BioXpert B.V.

Instellingsnummer: 90500

Project: Evaluation of Antiviral intervention strategies of Rabies in mice.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

[REDACTED]

BioXpert B.V.
Nistelrooise Baan 3
5374 RE Schaijk

[REDACTED]
T: +31 (0) 486 463303

F: +31 (0) 486 463498

KvK: 54838134

Confidentiality Notice: This e-mail transmission may contain confidential or legally privileged information that is intended only for the individual or entity named in the e-mail address. If you are not the intended recipient, you are hereby notified that any disclosure, copying, distribution, or reliance upon the contents of this e-mail is strictly prohibited. If you have received this e-mail transmission in error, please reply to the sender, so that we can arrange for proper delivery, and then please delete the message from your inbox. Thank you.

[REDACTED]

Van: [REDACTED]
Verzonden: vrijdag 24 juli 2015 13:08
Aan: Info-zbo; [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: RE: Aanvullende informatie aanvraag AVD905002015124
Bijlagen: AVD905002015124 - Antwoord op vraag CCD 24Jul2015.docx

Categorieën: Dossierhouder: [REDACTED]

Geachte [REDACTED]

Hierbij ontvangt u het antwoord van de verantwoordelijk onderzoeker op uw vraag.
Met vriendelijke groeten,

[REDACTED]

[Register now for Laboratory Animal Science on October 15th!](#)



www.radboudumc.nl/las2-0

BioXpert B.V. | Nistelrooise Baan 3 | 5374RE Schaijk | +31 486463303 | www.bioxpert.nl |

KvK: 54838134, VAT NL.8514.59.687.B01 Our terms are deposited at the Chamber of Commerce in Eindhoven, the Netherlands.

Confidentiality Notice: This e-mail transmission may contain confidential or legally privileged information that is intended only for the individual or entity named in the e-mail address.

If you are not the intended recipient, you are hereby notified that any disclosure, copying, distribution, or reliance upon the contents of this e-mail is strictly prohibited.

If you have received this e-mail transmission in error, please reply to the sender, so that we can arrange for proper delivery, and then please delete the message from your inbox. Thank you.

From: Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]
Sent: donderdag 23 juli 2015 17:51
To: [REDACTED]
Cc: [REDACTED]
Subject: Aanvullende informatie aanvraag AVD905002015124

Geachte [REDACTED]

Op 14 juli 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'Evaluation of Antiviral intervention strategies of Rabies in mice' met aanvraagnummer AVD905002015124. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Om uw aanvraag in de eerstvolgende CCD vergadering te kunnen bespreken verzoeken we u vriendelijk om uiterlijk woensdag, 29 juli 2015, uw antwoord aan ons te sturen.

Met vriendelijke groet,

██████████

Uitvoeringsexpert

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag

.....
T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

BioXpert B.V.

Nistelrooise Baan 3

5374RE Schaijk



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl

T 0900-28 000 28 (10 ct /min)

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD905002015124

Datum 23 juli 2015

Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte [REDACTED],

Bijlagen

1

Op 14 juli 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'Evaluation of Antiviral intervention strategies of Rabies in mice' met aanvraagnummer AVD905002015124. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

Wij hebben de volgende informatie van u nodig om uw aanvraag verder te kunnen beoordelen:

Onduidelijkheden

U beschrijft in de bijlages beschrijving dierproeven het gebruik van vrouwelijke muizen. De CCD hecht er aan dat het aantal dieren in voorraad gedood terug te dringen. Kunt u toelichten of het mogelijk is dieren van beide geslachten te gebruiken en als dit niet mogelijk is kunt u dan beter onderbouwen waarom het belangrijk is alleen vrouwelijke dieren te gebruiken?

Wij vragen u deze informatie te verduidelijken.

Zonder deze aanvullende informatie kan de beslissing nadelig voor u uitvallen omdat de gegevens onvolledig of onduidelijk zijn.

Opsturen binnen veertien dagen

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via NetFTP. Stuurt u het per post op, gebruik dan het formulier dat u bij deze brief krijgt. Om uw aanvraag in de eerstvolgende CCD vergadering te kunnen bespreken verzoeken we u vriendelijk om uiterlijk woensdag, 29 juli 2015, uw antwoord aan ons te sturen.

Wanneer een beslissing

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Datum

23 juli 2015

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD905002015124

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlage:

- formulier Melding Bijlagen via de post



Melding

Bijlagen via de post

- U wilt één of meerdere bijlagen naar ons versturen? Voeg *altijd* deze Melding Bijlagen toe. Wij weten dan welke documenten van u zijn en hoeveel documenten u opstuurt.
- Meer informatie vindt u op www.centralecommissiedierproeven.nl
- Of bel met ons: 0900 28 000 28 (10 ct/min).

1 Uw gegevens

- 1.1 Vul de gegevens in.
- | | | |
|----------------|--|------------|
| Naam aanvrager | | |
| Postcode | | Huisnummer |
- 1.2 Bij welke aanvraag hoort de bijlage?
Het aanvraagnummer staat in de brief of de ontvangstbevestiging.
- | | |
|----------------|--|
| Aanvraagnummer | |
|----------------|--|

2 Bijlagen

- 2.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
Vul de naam of omschrijving van de bijlage in.
- | | |
|--------------------------|--|
| <input type="checkbox"/> | |
| <input type="checkbox"/> | |
| <input type="checkbox"/> | |

3 Ondertekening

- 3.1 Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:
- | | | |
|--------------|---|------|
| Naam | | |
| Datum | - | - 20 |
| Handtekening | | |
- Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Aan: IvD BioXpert, CCD

Betreft Aanvullende informatie onderzoeksplan getiteld: Evaluation of Antiviral intervention strategies of Rabies in mice. (CCD nr: AVD905002015124).

Datum: 24 juli 2015

Beste leden van de IvD / Geachte leden van de CCD,

Met referentie naar uw verzoek om aanvullende informatie ontvangen op 23 juli 2015 stuur ik u hierbij mijn antwoord op de vraag gesteld in uw schrijven.

Vraag:

U beschrijft in de bijlages beschrijving dierproeven het gebruik van vrouwelijke muizen. De CCD hecht er aan dat het aantal dieren in voorraad gedood terug te dringen. Kunt u toelichten of het mogelijk is dieren van beide geslachten te gebruiken en als dit niet mogelijk is kunt u dan beter onderbouwen waarom het belangrijk is alleen vrouwelijke dieren te gebruiken?

Antwoord:

In de beschrijving van de dierproeven is aangegeven dat er bij voorkeur gewerkt zal worden met vrouwelijke dieren i.v.m. de gewenste groepshuisvesting. Groepshuisvesting van vrouwelijke muizen is flexibeler dan die van mannelijke muizen aangezien vrouwelijke dieren uit verschillende nesten doorgaans probleemloos bij elkaar gezet kunnen worden. Bij mannelijke muizen ligt dit anders en om ongewenste stress als gevolg van agressie te vermijden is het wenselijk om mannen op het moment van spenen (ong. 3 weken oud) in groepshuisvesting te plaatsen. De voorkeur voor vrouwelijke muizen is mede gelegen in het feit dat de meeste studies in het kader van het projectvoorstel uitgevoerd zullen worden met dieren die ouder zijn dan de speenleeftijd, waardoor bij het samenstellen van de studiegroepen voor huisvesting de kans op stress ten gevolge van agressie geminimaliseerd wordt bij gebruik van vrouwelijke dieren.

Daarnaast is stress als gevolg van een veranderende groepsamenstelling bij mannelijke dieren een factor waarmee rekening is gehouden bij het besluit om bij voorkeur vrouwelijke dieren te gebruiken: aangezien door het verloop van de rabiesinfecties in de beschreven proeven muizen bij het bereiken van de humane eindpunten uit de proef worden genomen is er sprake van een veranderende groepsamenstelling. Bij groepen met enkel mannen zou dit dus kunnen leiden tot extra stress, hetgeen vermeden kan worden door het gebruik van vrouwelijke dieren.

Verder is het zo dat voor een aantal rabiesvirusstammen waarvoor de optimale infectiedosis en –route reeds bepaald is, deze zgn. (pilot)dose-finding studies (gelijk aan die beschreven in Module 1) in het verleden allemaal uitgevoerd zijn in vrouwelijke dieren. Om voor deze stammen bij toekomstige studies in het kader van het projectvoorstel gebruik te kunnen maken van dieren van beide geslachten zullen eerst nieuwe dose-finding studies uitgevoerd moeten worden in mannelijke muizen vóórdat de profylactische dan wel therapeutische studies van Module 4 uitgevoerd kunnen worden, hetgeen extra proefdiergebruik met zich meebrengt t.o.v. de situatie waarin gebruik gemaakt wordt van enkel vrouwelijke muizen.

Dat gezegd hebbende is voor studies waarbij gebruik gemaakt zal worden van dieren die bij aflevering jonger zijn dan 3 weken geen noodzaak om enkel vrouwelijke dieren te gebruiken – hiermee zal bij het indienen van de werkprotocollen bij de IvD rekening worden gehouden en bij het bestellen van de dieren zal in deze gevallen geen voorkeur voor vrouwelijke dieren gehanteerd worden. Tevens zal bij

gebruik van nieuwe rabiesvirusstammen waarvoor studies in Module 1 (dose-finding) uitgevoerd dienen te worden, rekening gehouden worden met de door de CCD aangehaalde wens om het aantal dieren in voorraad gedood terug te dringen en deze overweging mee te nemen in de keuze voor het muizenmodel. Ook zal hierbij gekeken worden naar de voorraad bij de leverancier van de muizen, omdat bekend is dat er op verschillende momenten sprake kan zijn van een overschot aan vrouwelijke dan wel mannelijke dieren.

Ik hoop u hiermede voldoende te hebben geïnformeerd om de beoordeling van dit projectvoorstel af te ronden.

Met vriendelijke groeten,

[Redacted]
Verantwoordelijk onderzoeker

Viroclinics Biosciences B.V.
Rotterdam Science Tower
Marconistraat 16
3028 AK Rotterdam

[Redacted]
[Redacted]

[REDACTED]

Van: Info-zbo
Verzonden: dinsdag 18 augustus 2015 11:24
Aan: [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: verzoek aangepaste NTS AVD905002015124

Geachte [REDACTED]

Op 14 juli 2015 hebben we van u een NTS getiteld 'Testen van anti-rabies behandelings strategieën in muizen' ontvangen waarin enkele fouten zitten:

- het gemiddelde ongerief wordt "berekend", en dat is niet de bedoeling. De hoogste categorie ongerief moet worden vermeld, of de categorieën die bij de dierproeven horen en niet het individuele of gemiddelde ongerief. In uw geval is dat matig en ernstig.

- 'wettelijk vereist onderzoek of routinematig productie' is niet aangekruist.

We verzoeken u om zsm een aangepaste versie van uw NTS naar ons te sturen. Het kan via de NetFTP verbinding, of via de email.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]
Uitvoeringsexpert

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag
.....

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl

Let op: vanaf nu heeft de CCD een nieuw e-mailadres info@zbo-ccd.nl. Heeft u ons oude e-mail adres in uw adressenboek, dan vragen we u om dat aan te passen.

Aan: IvD BioXpert, CCD

Betreft Wijziging NTS behorende bij het onderzoeksplan getiteld: Evaluation of Antiviral intervention strategies of Rabies in mice. (CCD nr: AVD905002015124).

Datum: 19 Augustus 2015

Beste leden van de IvD / Geachte leden van de CCD,

Met referentie naar uw verzoek voor wijziging van de NTS ontvangen op 17 augustus 2015 stuur ik u hierbij de aangepaste versie van de NTS. Hieronder ook een verduidelijking van de aangepaste punten

Aanpassing 1:

Het gemiddelde ongerief wordt "berekend", en dat is niet de bedoeling. De hoogste categorie ongerief moet worden vermeld, of de categorieën die bij de dierproeven horen en niet het individuele of gemiddelde ongerief. In uw geval is dat matig en ernstig.

Het gemiddelde ongerief is gewijzigd naar het daadwerkelijke ongerief. De tekst in de NTS is overeenkomstig aangepast naar: "Het ongerief van de dierproeven is ingeschaald op matig (op basis van het verloop van de infectie) en in sommige gevallen op ernstig (op basis van de toedieningswijze).".

Aanpassing 2:

'wettelijk vereist onderzoek of routinematig productie' is niet aangekruist

Per abuis is dit niet meegenomen van de project aanvraag naar de NTS. In de bijgevoegde NTS is deze optie wel aangekruist.

Ik hoop u hiermede voldoende te hebben geïnformeerd om de beoordeling van dit projectvoorstel af te ronden.

Met vriendelijke groeten,

[Redacted signature]

Plv. verantwoordelijk onderzoeker

Viroclinics Biosciences B.V.
Rotterdam Science Tower
Marconistraat 16
3028 AK Rotterdam

[Redacted contact information]

[REDACTED]

Van: Info-zbo
Verzonden: donderdag 20 augustus 2015 13:26
Aan: [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: Besluit aanvraag AVD905002015124
Bijlagen: Vergunning AVD905002015124.pdf; BXTAVD905002015124_2015_002dec_advies_.pdf; Beschikking aanvraag AVD905002015124 ondertekend.pdf

Geachte [REDACTED],

Op 14 juli 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'Evaluation of Antiviral intervention strategies of Rabies in mice' met aanvraagnummer AVD905002015124. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Zie bijgaande brief, de ondertekende beschikking is ook nog per post naar u toegezonden.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag
.....

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl

Let op: vanaf nu heeft de CCD een nieuw e-mailadres info@zbo-ccd.nl. Heeft u ons oude e-mail adres in uw adressenboek, dan vragen we u om dat aan te passen.

[REDACTED]

Van: Info-zbo
Verzonden: donderdag 20 augustus 2015 13:44
Aan: [REDACTED]
Onderwerp: terugkoppeling aanvraag AVD905002015124

Geachte heer/mevrouw,

De DEC Consult heeft advies uitgebracht aan de CCD betreffende het project 'Evaluation of Antiviral intervention strategies of Rabies in mice.' met aanvraagnummer AVD905002015124. Wij danken u voor uw advies, en koppelen graag het oordeel van de CCD over deze aanvraag aan u terug.

Wij hebben nog een vraag aan de aanvrager gesteld m.b.t. het gebruik van beide geslachten in zijn project, en ook gevraagd om de NTS aan te passen op twee punten: het gemiddelde ongerief was "berekend", en dat is niet de bedoeling. De hoogste categorie ongerief moet worden vermeld, of de categorieën die bij de dierproeven horen en niet het individuele of gemiddelde ongerief. In dit geval is dat matig en ernstig. En 'wettelijk vereist onderzoek of routinematig productie' was niet aangekruist.

De aanvrager heeft zijn antwoord gemotiveerd m.b.t. de geslachten van de te gebruiken dieren, en een nieuwe versie van de NTS gestuurd.

Wij kunnen ons om onderstaande redenen niet volledig vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Een deel van het project is gericht op farmaca onderzoek (dierproeven 1 en 2) en een ander deel op het testen van vaccins (dierproeven 3 en 4). Wij zijn van mening dat er onvoldoende inhoudelijke samenhang is tussen deze twee afzonderlijke componenten. Wij vinden dat het project twee verschillende doelstellingen heeft die in twee aparte aanvragen moeten worden behandeld. Om deze reden zien wij deze aanvraag niet als een toetsbare eenheid. Om deze reden kan de aanvrager de dierproeven 1 en 2 onder deze vergunning uitvoeren, maar voor de dierproeven 3 en 4 moet hij/zij een aparte aanvraag indienen.

De CCD heeft besloten de vergunning gedeeltelijk te verlenen onder de volgende voorwaarden:

- 1) De aanvrager zal voor elke studie samen met de IvD het gebruik van dieren van beiden geslachten overwegen.
- 2) Indien later, in het kader van het project, proeven worden gedaan waarin aan de eisen van het wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie dient te worden voldaan, moet de aanvrager vooraf met de IvD afstemmen of er sprake van herhaling is.
- 3) In Artikel 10, eerste lid, onder a, Wet op de dierproeven, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te melden bij.

Overeenkomstig met uw advies is er een beoordeling achteraf vereist. Deze moet plaatst vinden binnen een jaar na afloop van het project, dus vóór 31 mei 2021.

De aanvrager en verantwoordelijk onderzoeker zijn hierover ingelicht.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag

.....
T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl

Let op: vanaf nu heeft de CCD een nieuw e-mailadres info@zbo-ccd.nl. Heeft u ons oude e-mail adres in uw adressenboek, dan vragen we u om dat aan te passen.

Inventaris Wob-verzoek W15-11									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTS 2015125								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Niet-technische samenvatting	x							
3	Projectvoorstel				x			x	
4	Flow chart			x					
5	Bijlage beschrijving dierproeven 1			x					
6	Bijlage beschrijving dierproeven 2			x					
7	Bijlage beschrijving dierproeven 3			x					
8	Bijlage beschrijving dierproeven 4			x					
9	Bijlage beschrijving dierproeven 5			x					
10	Bijlage beschrijving dierproeven 6			x					
11	Bijlage beschrijving dierproeven 7			x					
12	Overzicht aantallen			x					
13	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
14	DEC-advies				x		x	x	
15	Mail aanvraag 22-6-2015				x		x	x	
16	Mail aanvullende informatie				x		x	x	
17	Aanvullende informatie				x		x	x	
18	Beschikking en vergunning				x		x	x	
19	Advies CCD		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 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 80102 (Hubrecht Instituut-KNAW) 80101 NIN <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen															
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">Naam instelling of organisatie</td> <td>KNAW</td> </tr> <tr> <td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td> <td>[REDACTED]</td> </tr> <tr> <td>KvK-nummer</td> <td>5 4 6 6 7 0 8 9</td> </tr> </table>	Naam instelling of organisatie	KNAW	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]	KvK-nummer	5 4 6 6 7 0 8 9									
Naam instelling of organisatie	KNAW																
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]																
KvK-nummer	5 4 6 6 7 0 8 9																
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>	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">Straat en huisnummer</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Postbus</td> <td>Postbus 19121</td> </tr> <tr> <td>Postcode en plaats</td> <td>1000GC Amsterdam</td> </tr> <tr> <td>IBAN</td> <td>NL94</td> </tr> <tr> <td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td> <td>Hubrecht Instituut / Nederlandshersen Instituut</td> </tr> </table>	Straat en huisnummer		Postbus	Postbus 19121	Postcode en plaats	1000GC Amsterdam	IBAN	NL94	Tenaamstelling van het rekeningnummer	Hubrecht Instituut / Nederlandshersen Instituut					
Straat en huisnummer																	
Postbus	Postbus 19121																
Postcode en plaats	1000GC Amsterdam																
IBAN	NL94																
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Hubrecht Instituut / Nederlandshersen Instituut																
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">(Titel) Naam en voorletters</td> <td>[REDACTED]</td> <td style="width: 50%;"><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td>Group Leader</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie	Group Leader		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]	
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.															
Functie	Group Leader																
Afdeling	[REDACTED]																
Telefoonnummer	[REDACTED]																
E-mailadres	[REDACTED]																
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">(Titel) Naam en voorletters</td> <td></td> <td style="width: 50%;"><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td></td> <td></td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters		<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie			Afdeling			Telefoonnummer			E-mailadres		
(Titel) Naam en voorletters		<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.															
Functie																	
Afdeling																	
Telefoonnummer																	
E-mailadres																	

- 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 6 _ 2 0 1 5 |
| Einddatum | 0 1 _ 0 6 _ 2 0 2 0 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- The molecular and cellular mechanisms of tumor initiation, growth, metastasis and thera
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Het begrijpen van het ontstaan en ontwikkeling van kanker, uitzaaiingen en resistentie t
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|-----------|
| Naam DEC | DEC-KNAW |
| Postadres | Amsterdam |
| E-mailadres | |

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 741,00 Lege
 Wijziging € Lege
- 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.
- Via een eenmalige incasso
 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
- flow chart
- table with experimental groups

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 Directeur Instituten KNAW

Plaats Amsterdam

Datum 01 - 06 - 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.centralecommissiedierproeven.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
- Research aimed at preserving the species subjected to procedures
- Higher education or training
- Forensic enquiries
- Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

3 General description of the project

3.1 Background

Describe the project (motivation, background and context) with respect to the categories selected in 2.

- For legally required animal procedures, indicate which statutory or regulatory requirements apply (with respect to the intended use and market authorisation).
- For routine production, describe what will be produced and for which uses.
- For higher education or training, explain why this project is part of the educational program and describe the learning targets.

Cancer is one of the most deadly diseases in the western-world. When diagnosed early, a primary tumor can be surgically removed, and most patients can be cured at this early stage. However when cancer is diagnosed at a later stage, there is the chance that cells from the primary tumor have detached, spread to other sites in the body, and have

formed new distant tumor sites. At this stage cancer is far more difficult to treat and most patients die as a consequence of complications resulting from metastasis.

Upon genetic mutations, tumor cells “high-jack” cellular processes, that under non-disease circumstances, only takes place in different cell types or in specific phases of development. Examples of cellular processes that cancer cells “high-jack” include cell division and cell growth, a change from an epithelial cell state to a mesenchymal cell state (known as epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)), and enhanced cell motility. The micro-environment (the environment that directly surround the mutated cell) and the macro environment (the whole tumor/animal) is an additional driver for picking the processes that are “high-jacked” by cancer cells. The acquisition of these molecular and cellular processes drives tumor initiation, growth, and metastasis.

There are many different cellular processes that can be “high-jacked” leading to cancer or leading to the progression of cancer. Different tumor types (e.g. breast vs colon) but even various variants of the same tumor type can have different genetic mutations and micro- and macro-environments, and therefore can adapt a different set of molecular and cellular processes that they up- or down-regulate. This also means that e.g. breast tumor cells behave differently than colorectal tumor cells, and that these tumor types need to be treated as two independent diseases that need to be investigated independently in their natural orthotropic environment in the context of a whole animal. This type of knowledge is key for the design of therapies that are tailor-made for every patient (personalized medicine) that aim to target the specific processes acquired by the tumor cells in that particular patient.

Tumors are extremely heterogeneous and consist of a variety of tumor cells that have “high-jacked” different processes due to a variation in mutations and environments that the cells experience. Sometimes, just a few individual cells high-jack cellular processes important for e.g. metastasis, while all the other cells have not acquired these traits. The behavior of these few dangerous cells cannot be studied with traditional techniques including histochemistry, (q)PCR and western blotting, since they provide a snapshot of a large population of cells and lack crucial information on the history of these few individual cells. The [REDACTED] lab has developed unique [REDACTED] to visualize and study the behavior of individual cells in living mice. Using these techniques, the [REDACTED] lab can identify and characterize the dynamic behavior of individual cells that are responsible many of the key processes of cancer. With these techniques, we provide unique insights in the molecular and cellular processes that play a role in tumor initiation, tumor progression, metastasis, and the development of therapy resistance. With this knowledge we have the ultimate aim to contribute to the improvement cancer diagnosis, cancer prevention, and cancer treatment in human patients.

Below it will be explained why it is important to study processes required for tissue homeostasis and development in the initiation of a tumor, how tumors develop and progress to a metastatic state and how the micro- and macro-environment is key in these processes.

1) Tumor initiation:

As already indicated above, for the initiation and progression of a cancer, multiple genetic modifications have to occur in the same single cell leading to “high-jacking” of processes specific for other cell types or developmental processes. It has been speculated that long-living cells are more likely to accumulate genetic lesions than short-living cells. In particular adult stem cells, that are located in a special microenvironment (stem cell niche) that provides cues to self-renew, are long-lived and are the source for all differentiated cells in the tissue. Therefore, it is hypothesized that accumulation of genetic oncogenic alterations in stem cells initiates neoplastic growth. Indeed, deletion of the tumor suppressor gene APC in intestinal stem cells leads to adenoma formation in the small intestine while deletion of this gene in differentiated cells does not. Recently, the idea that stem cells represent a static and long-living population of cells has been disputed. For example, we have developed a novel approach for continuous [REDACTED] stem cells in the gut ([REDACTED]), and showed that stem cells compete for the stem cell niche, so that the progeny of one stem cell may outcompete (all) other stem cells. Moreover, we showed that more differentiated cells can still revert back to a stem cell state when they enter the stem cell niche. Based on this it has been hypothesized that due to stem cell competition, stem cells with tumor-inducing mutations can be replaced by intact stem cells, thereby protecting tissues from initiating tumors when mutations are acquired. Therefore, the knowledge obtained from this type of experiments is important to fully understand how stem cells can accumulate mutations that are required for the initiation of cancer.

2) Cancer progression.

It is hypothesized that cell hierarchy (where just a few cells with stem cell properties drive growth) may also exist in tumors, referred to as the cancer stem cell hypothesis. However, both the actual existence of cancer stem cells as well as the similarities between cancer stem cells and (tissue) stem cells in other tissues are subject to scientific debate. Nevertheless, if correct, these cancer stem cells may also be long-lived (compared to their differentiated counterparts). Therefore these cells may also be susceptible for the accumulation of mutations that are required for a tumor to progress into a metastatic phenotype. These cancer stem cells may appear to be the driving forces of growth of the primary tumor and the metastases. Therefore, the cells that escape from the primary tumor and form distant metastasis should either be a cancer stem cell or cells that temporally “high-jack” these traits. To fully understand how tumors are growing and the state that cells should adapt to metastasize, it is of utmost importance to study how cancer stem cells behave during cancer progression.

3) The tumor microenvironment:

An expanding body of work shows that in addition to the intrinsic characteristics of tumor cells, the tumor microenvironment is a key determinant for angiogenesis (formation of blood vessels), growth, differentiation or

metastasis. The microenvironment of a tumor consists of at least four broad categories of factors including, 1) tumor cells, 2) non-tumor cells (e.g. myeloid, lymphocytes, fibroblasts), 3) secreted soluble factors, 4) non-cellular structural factors (e.g. extracellular matrix (ECM)). Tumor microenvironments are spatially and temporally diverse, and may direct different tumor behaviors. To fully comprehend tumor initiation and progression, it is key to study also the microenvironment that drives cellular behavior.

Research of our lab:

Over the years, we have significantly contributed to a better fundamental understanding of cancer initiation and progression. Our current research focused on the following questions: 1) how is cancer initiated, 2) how do tumors grow and progress, 3) how do tumors metastasize, 4) how become tumors resistant to therapy

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?

Over the years, we have developed state-of-the art intravital imaging techniques that enable us to study the dynamic behavior of individual tumor cells that have "high-jacked" different cellular processes than the tumor cells that surrounds them. The visualization of tissues with subcellular resolution in living mice gives us the ability to study individual cells and the ability to study the dynamic aspects of cancer that cannot be studied by any other means. Using our unique tools, it is our ultimate aim is to better understand how cancer is initiated, how cancer progresses and use this knowledge as a starting point on how cancer can be best treated in order to open avenues for the development of new and better cancer treatments.

Our intravital imaging studies focus on the following key questions:

- 1) What are the molecular and cellular processes important for tissue development and homeostasis, and what goes wrong when tumor growth is initiated?
- 2) What are the molecular and cellular mechanisms processes that play a role in tumor growth and progression?
- 3) What are the molecular and cellular mechanisms that play a role in the initiation and development of metastasis?
- 4) What goes wrong when current clinical strategies fail (therapy resistance, adverse effects of tumor injury), and how to improve this?

There are several reasons why we think that we can achieve our aims:

Our group is embedded in [REDACTED], which is a center-of-excellence on developmental biology, and stem cell and cancer research. [REDACTED] provides core facilities for various high-end techniques such as deep sequencing, histology, fluorescent imaging, mRNA expression array, flow cytometry. Moreover, the Hubrecht Institute has just renovated their animal facility, and now it can compete with the best animal facilities that can be found internationally. Dedicated staff provides the regular housing of the animals and support and counsels the scientist in their experiments. Within our group, we have one dedicated and very experienced scientist that overlooks all breeding of mouse lines, experiments and procedures, and trains new people when required. This guarantees that only trained and experienced people perform experiments.

Our research and experiments are constantly evaluated within our group, and by various other groups within our institute and campus. Moreover, our research is positively judged by national and international funding agencies including the [REDACTED]. Moreover, our group is member of [REDACTED], which is a consortium of prominent cancer research groups from seven research institutions in the Netherlands. Our ambition is to significantly improve life expectancy and quality of life for cancer patients and to provide multidisciplinary training for the next generation of cancer researchers and specialists. The scientists working in our group are selected based on their excellence and their commitment to the mission of the program.

Over the last few years, we have built up a repertoire on of state-of-the-art [REDACTED] techniques to study the molecular and cellular aspects of cancer initiation and cancer progression, and cancer treatment in a unique way. In addition a wide range of new reporter mice have been generated and used. This has led to many new discoveries and breakthroughs published in high ranked journals (e.g. Nature and Cell) and our research has been awarded with international prizes (e.g. stem cell young investigator award). Our research is funded by all major funding agencies, and received the most prestigious grants (e.g. ERC consolidator).

Our embedment in an excellent scientific environment, our unique techniques and approaches, and our previous achievement makes it very likely that with the experiments described in this project we will make large contributions to our main research questions.

3.3 Relevance

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

Tumors are extremely heterogeneous where the individual cells can “high-jack” molecular and cellular processes that the original healthy cell did not have yet. Our research, and especially our intravital imaging technique, has the unique potential to study these individual cells to reveal the molecular and cellular processes that are acquired and the effect it has on their behavior. Therefore, it is expected that this work will provide totally new insights how cancer is initiated, how cancer progresses, how tumors metastasize, and why current treatments are not sufficient/optimal. This fundamental knowledge is required for the development of novel and/or improved therapies against cancer. Moreover, in addition to the field of cancer, this fundamental knowledge is also important for other fields including fundamental cell biology.

3.4 Research strategy

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

For our overall design of the project, see the flow Chart in attachment 1.

Based on data from previous experiments and available literature, we generate a hypothesis or question about the molecular and/or cellular mechanism of initiation, progression or therapy resistance of cancer. The questions/hypothesis will first be carefully tested on patient material by e.g. immunohistochemistry. For example, we ask whether cells in the tumor can adapt a mesenchymal state in addition to the epithelial state (EMT). Although immunostaining can reveal the existence of cells with these types of states, it only draws a static picture of tumors and can, for example, not show whether epithelial cells adapt only temporarily a mesenchymal state. When we have these types of questions/hypotheses that cannot be answered in human material alone, experiments will be designed in cell lines and/or organoids (3D cultures of human or mouse primary cells). For example, we can test whether epithelial cells can temporarily adapt a mesenchymal state by exposing these cells to growth factors. As explained in the background, in vitro conditions lack the full complexity of the in vivo environment, and therefore do not tell the full story. For example these experiments do not show whether the temporal mesenchymal state is crucial for successful metastasis when cells need to adapt to a new microenvironment. To answer these kinds of questions mouse experiments will be considered. We will set up optimal breeding schemes to minimize the number of mice to get the correct complex genotype. Moreover, during the experiments mice will be monitored extensively to detect and avoid unnecessary discomfort. For experiments, existing mouse lines will be used, and if required, we will generate a new mouse line(s).

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.

See also the flow chart in attachment 1. In the red boxes the choice of animals (A to C), interventions (I to IV) and readout (1 to 3) is indicated and which is described below.

When we have decided to perform an animal experiment, the experiment is design is based on three choices:

- A) Choice of mouse model
- B) Choice of type of intervention
- C) Choice of readout and end-point of the experiment

The considerations of the choices will be explained in more detail below.

For research questions 1, we need to compare normal tissue homeostasis/development with tumor-initiating tissue homeostasis/development. For research question 2 to 4 (see 3.2 purpose), mice need to develop tumors. For 70% of these experiments, tumors are induced (overexpression of oncogenes, or depletion of tumor suppressor genes) and 30% by transplanting neoplastic tissues or cells. As experimental read out, we analyze tissues ex vivo or by intravital microscopy. At the end point of intravital microscopy, tissues will always be analyzed ex vivo to reduce the number of mice required for 3.4.4.1. These experiments are described in the appendices 3.4.4.1. 3.4.4.2, 3.4.4.3, 3.4.4.4, 3.4.4.5. and 3.4.4.6.

All experiments described in appendices 3.4.4.1 to 3.4.4.6 can provide knowledge on the key questions 1 to 4 (see 3.2.), and the decision route in the flow chart is determined by e.g. the studied tumor model. An example of a typical experiment is to study the migration behavior of cancer cells that have “high-jacked” stem cell properties. For breast tumors, we will choose a mouse model in which an oncogene is overexpressed (e.g. Choice B II for intervention to

overexpress PyMT, and choice C 2 for read-out). To answer the same question for colorectal tumors, a different decision route is required. In this case, the tumor suppressor gene APC depletion leads to tumor formation throughout the colon and subsequently to a non-functional intestine, and a human end point is reached before the tumor progresses to a stage where tumor cells have acquired stem cell properties. In this case, a small piece of colon from APC depleted mice will be transplanted into a recipient mouse (choice B III) so that only one tumor is formed leaving the intestine functional. Since the mouse does not reach the human end point at early stages of tumor progression, the tumor can progress to a stage where tumor cells can “high-jack” stem cell properties and the measurement can be done (choice C2). Thus for the same research questions, different decision routes need to be taken depending on the tumor model and required intervention.

Generation of GM mice (appendix 3.4.4.7):

We will generate new mouse line(s) via standard oocyte injection, blastocyst injection, or via the Crispr/Cas9 system. The Crispr/Cas9 system will especially be used as highly efficient tool for simultaneously multi-gene editing. This prevents the generation and breeding of multiple homozygotes from individually targeted ES cells (Reduction of the 3Rs).

Next, we will identify a possible hampered phenotype in novel (compound) mouse models according to the Consensus document on genetically altered animals. Therefore new transgenic lines and/or KO lines generated via classical methods and/or novel combinations and used for breeding of these aforementioned lines will be monitored for 2 generations to determine the absence or presence of constitutional discomfort.

For some transplantation experiments (e.g. when human organoids are transplanted), immune deficient acceptor mice are required. We breed our own immune deficient NOD-SCID mice. For this, we have 6-10 breeding pairs that will be replaced every 6 month that leads to offspring that will be used for experiments. According to the working document on genetically altered animals of the National Competent Authorities for the implementation of Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes (corrigendum of 24 Jan. 2013) breeding of immune deficient mice even when kept under proper barrier conditions is considered an experiment and the breeding of these animals is described in 3.4.4.7.

A. Mouse models:

There are several considerations in choosing an animal model:

- GMM that expressed a fluorescent marker in a specific cell type/lineage
- GMM that changes expression of a functional gene(transgene knockout)
- Spontaneous tumor model
- Immune-deficient/wt recipient mouse
- Wt

The choice will be on the following considerations:

- Type of tumor: Tumor cells can “high-jack” a wide variety of molecular and cellular processes, and not one tumor is alike. Therefore it is important to investigate different tumor types and various variants of the same tumor type to reveal whether the acquisition of a particular molecular and cellular process is a general or specific phenomenon (personalized medicine).
- Readout parameters

If the required GMM is not available, than we will obtain this model by generating, importing or by crossing existing models (3.4.4.7).

B. Interventions:

Apart of I) ‘no intervention’ we will use the following additional groups of interventions: II) upregulation or reduction cell types or expression of genes by genetic approaches, drugs or injury, III) transplantation of tissue or cells, and IV) a combination of intervention II and III in the same animal.

I) No experimental interventions (3.4.4.1 and 3.4.4.2):

To visualize for example how stem cells behave during tissue development, we analyze ex vivo (3.4.4.1) or intravital image (3.4.4.2) reporter mice in which e.g. stem cells are labelled with GFP.

II) Cell type specific gene (in)activation and (over)/(mis)expression (3.4.4.1 and 3.4.4.2):

To identify for example which molecular and cellular processes are important for development and/or tissue homeostasis, for misregulating these processes leading to tumor initiation, the growth and metastasis of tumors, and the development of therapy resistance, we will analyze GM mice in which the gene(s) will be

activated, inactivated, overexpressed and/or misexpressed.

In contrast to the conventional gene-targeting strategy, the use of e.g. the Cre/LoxP recombination system in conjunction with gene targeting has greatly expanded the versatility and avenues with which biologic questions can be addressed in the mouse. This system allows us, by strategically incorporating Cre recombinase recognition (LoxP) sites into the genome and the subsequent expression of the Cre recombinase, to study the consequence of specific ablation, activation and/or over/misexpression of a specific protein. In particular, when Cre is expressed in mice harboring a LoxP-containing target gene, the desired gene modification can be restricted to certain developmental stage, organ (e.g. intestine), cell type (e.g. stem cell), pathogenesis (e.g. cancer cells) of the mouse depending on the specificity and timing of recombinase expression. This system will be used to manipulate molecular and cellular events, but also to induce an early stage of tumor formation by depleting tumor suppressor genes (e.g. APC in the intestine).

Moreover, the introduction of novel gene(s) will help us in further characterizing the role of expressing cells. E.g. the introduction of fluorescent markers in (putative) different cancer cells pools (e.g. cancer stem cells vs more differentiated tumor cells) allows the isolation of these pools of cells by flow cytometry. Upon isolation, the different pools of cells can be characterized by e.g. gene expression profiling. Moreover, the (combined) introduction of e.g. an exogenous toxin receptor in the same cells allows us to specifically kill these cells upon the administration of the toxin to the mouse, allowing us to determine the consequence of this cell depletion during development and/or in tissue homeostasis. This is also true for over or mis- or overexpression of (mutated) genes, especially oncogenes to induce tumor formation (e.g. the PyMT oncogene in breast tissues).

Administering small molecule compounds/drugs/toxin/chemical or control substances (e.g. inhibitors or agonists of specific pathways), we might be able to rescue or mimic the phenotypes of the in vivo genetic deletions and/or activations and therefore further identify the function of these cells in vivo. If possible and/or relevant, we will always test these small molecule compounds/drugs/chemicals first on in vitro growing organoids and in case relevant effects are observed shift to in the in vivo models.

In a small number of animals (<3%), injuries will be used to manipulate for example the recruitment of cell types (e.g. immune cells) with subsequent effects on expression profile of different cells in the tissue. For instance in the past we studied how the retrieval of biopsies induces an injury that recruits immune cells that subsequently release chemokines that induce metastasis.

III) Transplantation tissues/cells/organoids (3.4.4.3 and 3.4.4.4):

To identify the role of various cell types on developmental and cancer processes, we need to transplant (genetically modified) human and murine tissues, cell or organoids in mice. For example, in the past we have transplanted colorectal organoids (3D cultures) in mice to induce colorectal tumor growth. Moreover, we have transplanted red-labelled erythrocytes to long-term label blood vessels in order prevent a more discomfort causing procedure of daily injections of fluorescent-dextran enabling only short-term labeling of blood vessels.

IV) In some cases the transplantation should be combined with the cell type specific gene (in)activation and (over)/(mis)expression) (3.4.4.5 and 3.4.4.6):

The cumulative level of discomfort is dependent on both the intervention (moderate) and the read-out.

Therefore for both the ex vivo (3.4.4.5) and intravital imaging (3.4.4.6), the cumulative discomfort is moderate.

Readouts/endpoint

We have three types of readouts:

- 1) Ex vivo analysis (appendices 3.4.4.1, 3.4.4.3 and 3.4.4.5),
- 2) Acute Intravital imaging (appendices 3.4.4.2, 3.4.4.4, and 3.4.4.6)
- 3) Chronic imaging (appendices 3.4.4.2, 3.4.4.4, and 3.4.4.6).

To study the molecular and/or cellular mechanisms of cancer processes, we need to analyze histologically and molecularly the tissues and cells from the mice ex vivo, and established cells lines and organoids (3D culture system) to perform in vitro studies. These cell lines and organoids will enable us to perform some of the studies in vitro. We might also use these cell lines and organoids to generate new tumors upon transplantations.

To study dynamic processes that are missed in static histological images, in vivo imaging will be performed. For the imaging experiments two different strategies will be used: (a) Imaging in an acute experiment under anaesthesia and (b) Implanting an imaging window (such as the breast, skin, abdomen and skull) and repeatedly image through that window. For long-term studies (>24hrs) the animal needs to be imaged by multiple imaging sessions, and therefore imaging windows are required. For some research questions, the tissue needs to be visualized frequently for a relative short-period of time (max 3 days). It is not an option to anesthetize the animal multiple times a day, so the animal will be constantly anesthetized. In this case, an imaging window is not required and an acute imaging experiment will be chosen. We have a lot of experience in the lab with these procedures, and only well trained researchers will perform these experiments.

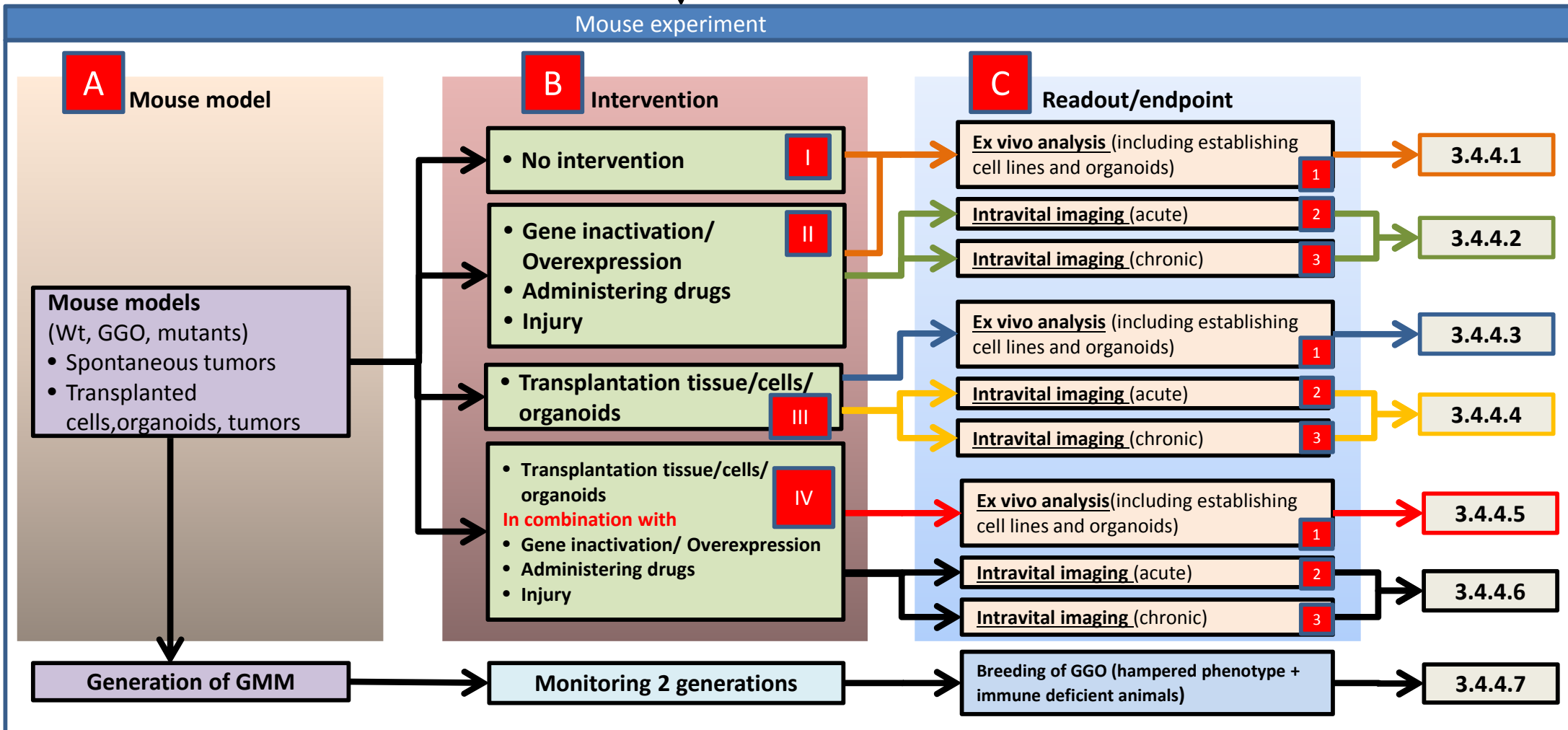
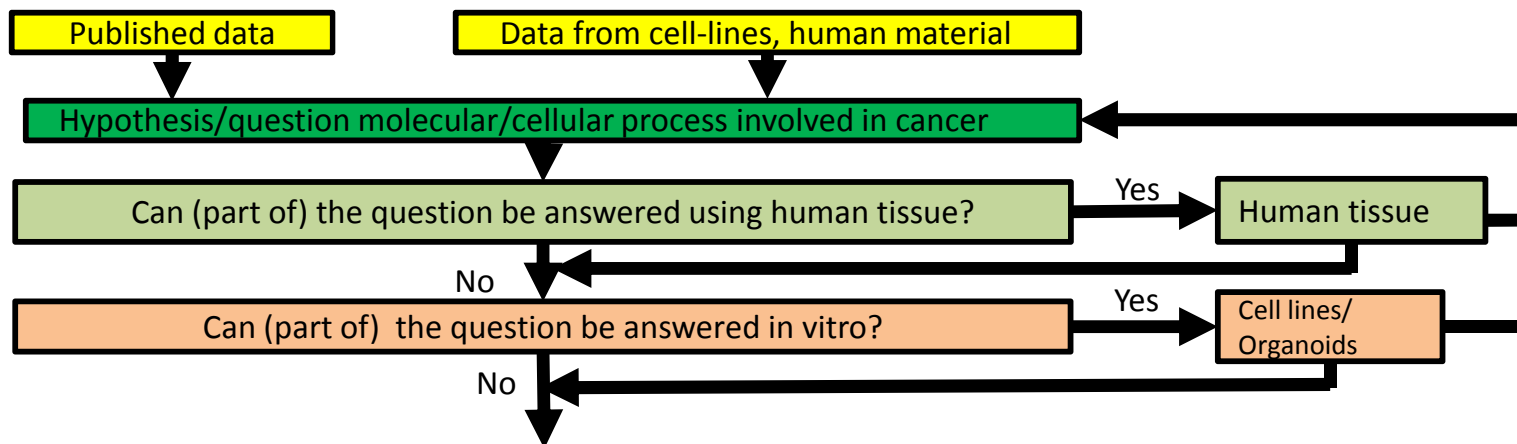
3.4.3 Describe the coherence between the different components and the different steps of the project. If applicable, describe the milestones and selection points.

Whenever possible, we will perform pilot studies with the minimum amount of animals possible. We will only use well-established reagents and protocols to induce expression or deletion of the candidate gene/s. For every experiment, we design the experiment with clear go-no-go decisions, to reduce the amount of cumulative discomfort and/or the number of animals. For every experiment, the best trade-off will be made. For example, for most experiments we first consider ex vivo experiments (mild discomfort), before we consider intravital imaging experiments (moderate discomfort). In some experiments we first consider intravital imaging, since either some questions can only be answered by imaging the same tissue over multiple imaging sessions, or it significantly reduces the number of required mice (can be up to a reduction of 20x); multiple time points can be measured in one individual, and there is no inter-mice variation. After completion of the intravital imaging experiments, cells, tissues and organs will be isolated and analyzed to reduce the number of mice required for 3.4.4.1, 3.4.4.3, and 3.4.4.5.

Where possible, mice with inducible alleles will be used, so mice will not display a phenotype before the induction of the alleles. Experiments will be done sequential. When mice show signs of discomfort (e.g. appearance of a tumor), the mouse will be sacrificed and not used for breeding anymore. If homozygous mice doesn't show any discomfort we will keep the mice on a homozygous background, thereby reducing the number of mice.

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	Gene (in) activation interventions (ex vivo analysis)
2	Gene (in) activation interventions (in vivo imaging)
3	Transplantation (ex vivo analysis)
4	Transplantation (in vivo imaging)
5	Transplantation, gene (in) activation interventions (ex vivo analysis)
6	Transplantation, gene (in) activation interventions (in vivo imaging)
7	Generation, welfare assessment and breeding GMM
8	
9	
10	



■ Indicates choice (A-B), type intervention (I to IV), and read-out (1 to 3) as described in the project proposal 3.4.2.



Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website (www.centralecommissiedierproeven.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'.	80102	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Koninklijke Nederlandse Academie van Wetenschappen (Hubrecht Institute)	
1.3 List the serial number and type of animal procedure. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number	Type of animal procedure
	3.4.4.1	Ex-vivo analysis in mouse models and after gene inactivation/overexpression, administering drugs and injury

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

The general design of the experiments in this appendix is shown in the attached flowchart. Our aim is to determine in ex vivo analysis the molecular/cellular mechanisms required for tissue homeostasis/development, tumor initiation, tumor progression, cancer diagnosis, cancer prevention, and cancer treatment via the analysis of (compound) mouse models.

The different components of the proposed experiments are (see also the flowchart in appendix 1):

A. Mouse models:

There are several considerations to choose for a specific animal model:

- Wt mice,
- Genetically modified mice that expressed a fluorescent marker in a specific cell type/lineage. In some cases transgene inducing or deleting agents (e.g tamoxifen) are administered to induce the expression of the fluorescent marker.
- Genetically modified mice that changes expression of a functional gene (transgene knockout). In some cases transgene inducing or deleting agents (e.g tamoxifen) are administered to change the expression of the functional gene

- Spontaneous tumor model

- Immune-deficient/wt recipient mouse

The choice will in all cases based on the combination of the following considerations:

- Aim/specific question (normal tissue development, tumor development, establishing cell

lines/organoids or a cell type specific expression of a fluorescent marker for an immunohistochemical /cell sorting/lineage study)

- Type of tumor

- Aim/readout parameters (e.g. static vs dynamic, long-term vs short-term dynamics)

To identify/validate for example which molecular and cellular processes are important for development and/or tissue homeostasis, for misregulating the processes leading to tumor initiation, the growth and metastasis of tumors, and the development of therapy resistance, we will analyze GM mice in which the gene(s) will be activated, inactivated, overexpressed and/or misexpressed. In some cases, mice get a special diet (but this does not lead to any discomfort).

We will use inducible systems including e.g. the well-known Cre-LoxP system in which a floxed gene can be deleted, overexpressed or misexpressed upon the induction of the Cre enzyme via the administration of tamoxifen. In this way the desired gene modification can be restricted to certain developmental stage, organ (e.g. intestine), cell type (e.g. stem cell). Successful deletion/activation via (e.g.) Cre enzyme induction might be monitored via expression of a reporter gene (e.g. LacZ or fluorescent protein(s)).

We will also use endogenous and exogenous promoters that are tissue or cell specific to drive expression of genes.

The presence of e.g. a fluorescent marker in a (putative) stem cell allows us to localize these cells by histology and to isolate the fluorescent expressing cells via FACS sorting, which allows us to analyse (gene expression profile) and culture these cells.

The introduction of e.g. a toxin receptor (e.g., Diphtheria toxin receptor) in the cells allows us to specifically kill these cells upon the administration of the toxin (e.g., Diphtheria toxin). This study allows us to determine the consequence of the loss of the toxin receptor expressing cells during development and for tissue homeostasis.

If the required genetically modified mouse is not available, we will obtain this model by generating, importing or by crossing existing models (3.4.4.7).

B. No Intervention:

I. No experimental interventions:

To visualize for example how stem cells behave during tissue development, we analyze in ex vivo experiments reporter mice in which e.g. stem cells are labelled with GFP.

Interventions:

II Experimental interventions II:

-To identify/validate which molecular and cellular processes are important for development and/or tissue homeostasis, for misregulating the processes leading to tumor initiation, the growth and metastasis of tumors, and the development of therapy resistance, we will analyze GM mice in which functional gene(s) will be activated, inactivated, overexpressed and/or misexpressed.

-The administration of small molecule compounds/drugs/chemicals/toxins, we might be able to rescue or mimic the phenotypes of the in vivo genetic deletion(s) and/or activation(s) and therefore further identify the function of these cells in vivo. The mice might be injected with DNA labelling agents shortly before euthanasia to measure the proliferation capacity of the stems and their derivatives.

-Injuries (such as the surgical removal of a tumor, taking biopsies (not for the analysis, but for the injury), making a wound) will be made to investigate for example the recruitment of cell types (e.g. immune cells) with subsequent effects on expression profile of different cells in the tissue and the tumor.

C. Readout parameter

1. Ex vivo analysis

In all experiments, animals will be killed and embryos, neonatal and/or adult organs will be isolated for detailed analysis of the consequences of the genetic alteration and/or treatment on the (developing) tissue(s). Analysis will include among others histological sections labelled with antibodies or antisense RNA probes, RNA expression analysis, DNA or protein extracts. Also, cells from organs might be isolated

by FACS and/or cultured in vitro (organoids).

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

1. Tissue sampling for genotyping and identification via ear and tail biopsy resp. under anaesthesia (4% isoflurane/oxygen).
2. Administration of transgene inducing or deleting agents or control substances alone or in combination, continuously or intermittently by one or more of the following routes:
 - a) in diet or drinking water (max. 1 time, < 2 wks)
 - b) subcutaneous (max. 3 time)
 - c) intraperitoneal(max. 7 times)
 - d) implantation of a slow release pump subcutaneously under adequate anaesthesia and analgesia
 - e) oral (max. 10 times)
3. Administration of small molecule compounds, drugs, toxin, chemicals or control substances alone or in combination, continuously or intermittently by one or more of the following routes:
 - a) in diet or drinking water (max. time, <2 wks)
 - b) subcutaneous (max. 10 time)
 - c) intraperitoneal (max. 10 times)
 - d) implantation of a slow release pellet subcutaneously under adequate anaesthesia and analgesia (1 time)
 - e) implantation of a slow release pump subcutaneously under adequate anaesthesia and analgesia (1 time)
 - f) oral (max. 10 times)
4. (Optional) Administration of a labelling agent (e.g. BrdU) via one of the following routes:
 - a) intraperitoneal (max 3 times)
 - b) implantation of a slow release pump subcutaneously under adequate anesthesia and analgesia (1 time)
 - c) intravenous (max 3 times)
5. (Optional) To mimic the injury resulting from e.g. surgical removal of a tumor or obtaining a biopsy, (tumor) tissues will be 'injured' under adequate anaesthesia and analgesia
6. All animals will be killed and organ(s)/tissue will be isolated for ex vivo analysis
 - a) Adult mice: via CO₂/O₂ method or perfusion fixation under lethal dose of Nembutal.
 - b) Embryo's and neonates (until P5): will be put on melting ice water for 10 min. (but not in contact with) after which they will be decapitated and the head immediately frozen (or the brains dissected and fixed).

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

Whenever possible we strive for a situation to express the outcome of our experiments in quantitative terms. To estimate the number of animals to be used in an experiment, we use the effect size (if known, e.g., from data in the literature, from our own historical data or if unknown from small scale pilots) to estimate the sample size needed to achieve a certain power (usually around 0.8) with appropriate statistical test like the t test with a $p < 0.05$.

Qualitative analysis (most of the animal procedures described in this appendix): the number of animals (group size) is based in literature and/or years of experience with similar type of experiments.

Moreover, these types of experiments will be performed sequentially via which we ensure that we will use the minimum number of mice per group that will be informative.

B. The animals

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

Mus musculus, (Wt, genetically modified, mutants)

Origin: Hubrecht institute/external licensed breeders.

Embryos(> E13): max. 200

Neonates(until weaning): max. 100

Adult: max. 4000

All animal studies in this project will exclusively involve mice. Up to today, there are no alternative methods to fully understand tissue development/homeostasis and cancer in the context of the whole organism. For the majority of the proposed studies, the mouse is the most appropriate animal model because: (1) like humans, mice are mammals; (2) physiology is more extensively characterized; (3) mice are amenable to transgenic modification; (4) a large number of relevant transgenic and knock out lines are already available.

For the type of experiments described in this procedure, it is difficult to calculate the exact number of animals, since for various experimental setups different amount of mice are required, and the variation and outcome of the experiments are unknown. The number of mice required depends on the mouse model (e.g tumor incidence, tumor heterogeneity), the type of intervention and the characteristics of the measuring parameters and can therefore only be described in global and strategic terms. For these reasons we have provided a total number of mice based on experience over the past 5 years with these types of experiments in our group. Before we will start an experiment we will write an application to the IVD. In this application we will exactly describe which considerations, facts and results have led to the proposition of the number of animals needed for these experiments.

We have estimated the number of animals based on experience over the past 5 years. To give an idea of typical experiments we have done in the past 5 years:

- 1) Animals (including embryos, neonates and adults) are sacrificed at various developmental stages without experimental intervention. To examine e.g. the histological morphology of a stage, typically 6 mice are required per time point, and typically 5 time-points are taken. For example such a typical experiment requires 30 mice. On average, we had typically 8 of this type of projects per year, so over a 5 year time span we expect to require approximately 40 of these typical experiments.
- 2) In the case of generating tumors in the intestine via the inactivation of a single gene (e.g. Apc) in the stem cells (via Lgr5-ires-creert) a maximum of 30 mice may be required (5 (number of mice per group) * 6 (different time points required to follow the development of intestinal tumors over time)). On average, we had typically 6 of this type of projects per year, so over a 5 year time span we expect to require approximately 30 of these typical experiments.
- 3) Influence of e.g. drugs on development of intestinal tumors as described above in 2: Two groups of mice as described above in 2 are typically treated with vehicle and the drug. So 60 in total (30 for vehicle, 30 for the drug). On average, we had typically 7 of this type of projects per year, so over a 5 year time span we expect to require approximately 35 of these typical experiments.

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.

Before we consider the import or generation and subsequently analysis of (compound) GGM to study cancer models, we first will extensively analyze cell lines, existing tissue patient material and/or organoids. However, animal studies are unavoidable if we seek for the fundamental insight into the

molecular and cellular mechanisms that drive tissue homeostasis/development, cancer initiation, growth and metastasis.

We make extensive use of human material and in vitro experiments using cell lines and organoid culture (3D cultures) where possible, which extensively reduces the animal numbers. The use human material and in vitro cultures allows this project to comply with the 3Rs (replacement, reduction and refinement) by keeping the mice numbers to be used to a minimum.

Whenever possible, we will perform pilot studies with the minimum number of animals possible. Where possible, mice with inducible alleles will be used, so mice should not display a phenotype before the induction of the alleles.

Experiments will be done sequential, where on basis of the results, decisions will be made on the next steps.

If homozygous mice doesn't show any discomfort we will keep the mice on a homozygous background, thereby reducing the number of mice need for breeding.

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

All possibilities to reduce pain, fear or suffering will be used. There are no negative environmental effects; all mice will be housed under strict D1 conditions.

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 required.

The experiments in this project are not carried out due to legal requirements.

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

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 I.

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

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

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

If required, isoflurane will be used general anaesthesia and Temgesic to relieve pain.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Other than in terminally anaesthetized animals dosing and sampling procedures will be undertaken using a combination of volumes, routes and frequencies that will result in no more than transient, light discomfort. In less than 3% of all experiments, pumps/pellets will be implanted which leads to a moderate discomfort.

Due to administration of inducing agents or other substances animals will be experiencing no follow up effects.

Animals bearing tumors will never reach end-stage clinical effects. The scientific endpoints of all studies are much earlier than the humane endpoints.

It is expected that no animals (0%) will be experiencing more than mild discomfort due to the genetic modification. However, it is impossible to predict the nature or severity of any potential genetic defect. So, in all cases, animals will be carefully monitored for possible side effects. Animals exhibiting any unexpected harmful phenotypes will be killed within a day.

Explain why these effects may emerge.

Tumor development and/or inflicted tissue damage due to genetic alterations and/or administration of small molecule compounds/drugs/chemicals/toxins.

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

Daily monitoring of the mice combined with an experimental design aiming at reducing the discomfort of the animals.

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.

Weight loss (>20% in comparison with control or 15% weight loss in two days), changes in behavior or body posture, signs of general sickness and/or discomfort.

In all cases the guidelines of the Code of Practice Animals in Cancer research will strictly be followed

Indicate the likely incidence.

Expected 0% within time frame of the experiments.

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').

Embryo's(>E13): mild 100%

Neonates: mild 100%

Adult: mild 96%, moderate 1% <1day, moderate <3% constantly due to implantation pellet/pump

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

All animals are killed to use their organs in ex vivo analyses.

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



Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website (www.centralecommissiedierproeven.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'.	80102	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Koninklijke Nederlandse Academie van Wetenschappen (Hubrecht Institute)	
1.3 List the serial number and type of animal procedure. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number	Type of animal procedure
	3.4.4.2	In vivo imaging in mouse models and after gene inactivation/overexpression, administering drugs and injury

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

The general design of the experiments in this appendix is shown in the attached flowchart. Our aim is to determine with in vivo imaging the molecular/cellular mechanisms required for tissue homeostasis/development, tumor initiation, tumor progression, cancer diagnosis, cancer prevention, and cancer treatment via the analysis of (compound) mouse models.

The different components of the proposed experiments are (see also the flowchart in appendix 1):

A. Mouse models:

There are several considerations to choose for a specific animal model:

- Wt mice,
- Genetically modified mice that expressed a fluorescent marker in a specific cell type/lineage. In some cases transgene inducing or deleting agents (e.g. tamoxifen) are administered to induce the expression of the fluorescent marker.
- Genetically modified mice that changes expression of a functional gene(transgene knockout). In some cases transgene inducing or deleting agents (e.g. tamoxifen) are administered to change the expression of the functional gene.
- Spontaneous tumor model
- Immune-deficient/wt recipient mouse

The choice will in all cases be based on the combination of the following considerations:

- Aim/ specific question (normal development, tumor development, establishing cell lines/organoids or a cell type specific expression of a fluorescent marker)
- Type of tumor
- Aim/readout parameters (e.g. static vs dynamic, long-term vs short-term dynamics)

To identify/validate for example which molecular and cellular processes are important for development and/or tissue homeostasis, for misregulating the processes leading to tumor initiation, the growth and metastasis of tumors, and the development of therapy resistance, we will analyze GM mice in which the gene(s) will be activated, inactivated, overexpressed and/or misexpressed. In some cases, mice get a special diet (but this does not lead to any discomfort).

We will use inducible systems including e.g. the well-known Cre-LoxP system in which a floxed gene can be deleted, overexpressed or misexpressed upon the induction of the Cre enzyme via the administration of tamoxifen. In this way the desired gene modification can be restricted to certain developmental stage, organ (e.g. intestine), cell type (e.g. stem cell). Successful deletion/activation via (e.g.) Cre enzyme induction might be monitored via expression of a reporter gene (e.g. LacZ or fluorescent protein(s)).

We will also use endogenous and exogenous promoters that are tissue or cell specific to drive expression of genes.

The presence of e.g. a fluorescent marker in a (putative) stem cell allows us to localize these cells by *in vivo* imaging and to isolate the fluorescent expressing cells after the experiment via FACS sorting, which allows us to analyze (gene expression profile) and culture these cells.

The introduction of e.g. a toxin receptor (e.g. Diphtheria toxin receptor) in the cells allows us to specifically kill these cells upon the administration of the toxin (e.g. Diphtheria toxin). This study allows us to determine the consequence of the loss of the toxin receptor expressing cells during development and for tissue homeostasis.

If the required genetically modified mouse is not available, we will obtain this model by generating, importing or by crossing existing models (3.4.4.7).

B. No Intervention:

I. No experimental interventions:

To visualize for example how stem cells behave during tissue development, we analyze *in vivo* experiments reporter mice in which e.g. stem cells are labelled with GFP.

Interventions:

II Experimental interventions II:

- To identify/validate which molecular and cellular processes are important for development and/or tissue homeostasis, for misregulating the processes leading to tumor initiation, the growth and metastasis of tumors, and the development of therapy resistance, we will analyze GM mice in which functional gene(s) will be activated, inactivated, overexpressed and/or misexpressed.
- The administration of small molecule compounds/drugs/chemicals/toxins, we might be able to rescue or mimic the phenotypes of the *in vivo* genetic deletion(s) and/or activation(s) and therefore further identify the function of these cells *in vivo*. The mice might be injected with DNA labelling agents shortly before euthanasia to measure the proliferation capacity of the stems and their derivatives.
- Injuries (such as the surgical removal of a tumor, taking biopsies (not for the analysis, but for the injury), making a wound) will be made to investigate for example the recruitment of cell types (e.g. immune cells) with subsequent effects on expression profile of different cells in the tissue and the tumor.

C. Readout parameters

To study dynamic processes that are missed in static histological images, *in vivo* imaging will be performed. For the imaging experiments two different strategies will be used:

1. Imaging in an acute experiment under anesthesia. This is the method of choice for the imaging of processes that need to be imaged frequently (time scale of hours) for a short period of time (max 72 hours). In this case it is not an option to anesthetize the animal

- multiple times a day.
2. Chronic imaging. To study processes at a timescale of days chronic imaging is the method of choice.

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

1. Tissue sampling for genotyping and identification via ear and tail biopsy resp. under anaesthesia (4% (isoflurane/oxygen).
2. Administration of transgene inducing or deleting agents or control substances alone or in combination, continuously or intermittently by one or more of the following routes:
 - a) in diet or drinking water (max. 1 time, < 2 wks)
 - b) subcutaneous (max. 1 time)
 - c) intraperitoneal(max. 5 times)
 - d) implantation of a slow release pump subcutaneously under adequate anaesthesia and analgesia
 - e) oral (max. 10 times)
3. Administration of small molecule compounds, drugs, toxin, chemicals or control substances alone or in combination, continuously or intermittently by one or more of the following routes:
 - a) in diet or drinking water (max. time, <2 wks)
 - b) subcutaneous (max. 10 time)
 - c) intraperitoneal (max. 10 times)
 - d) implantation of a slow release pellet subcutaneously under adequate anaesthesia and analgesia (1 time)
 - e) implantation of a slow release pump subcutaneously under adequate anaesthesia and analgesia (1 time)
 - f) oral (max. 10 times)
4. (Optional) Administration of a labelling agent (e.g. BrdU) via one of the following routes:
 - a) intraperitoneal (max 3 times)
 - b) implantation of a slow release pump subcutaneously under adequate anesthesia and analgesia (1 time)
 - c) intravenous (max 3 times)
5. (Optional) To mimic the injury resulting from e.g. surgical removal of a tumor or obtaining a biopsy, (tumor) tissues will be 'injured' under adequate anaesthesia and analgesia
6. Intravital imaging. For the imaging experiments one of the two different strategies will be used:
 - 1) Acute imaging: Surgical exposure of the imaging site under adequate anaesthesia and analgesia. Such an experiment will last up to 72 hours
 - 2) Chronic imaging: In these situation prior to the imaging period an imaging window is implanted (such as the breast, skin, abdomen and skull) (one window per animal) followed by the repeated imaging sessions under isoflurane anesthesia. From experience we know that for the implantation of windows in the skin does not lead to post-operative discomfort and post-operative analgesia is therefore extensive postoperative analgesia is not indicated. In a number of cases this is contra-indicated for the processes under study.
- 7) All animals will be killed while still under anesthesia for ex vivo analysis of the isolation of organs or tumors:
 - a) perfusion fixation under lethal dose of Nembutal.
 - b) via cervical dislocation under isoflurane anaesthesia

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

Whenever possible we strive for a situation to express the outcome of our experiments in quantitative terms. To estimate the number of animals to be used in an experiment, we use the effect size (if known, e.g., from data in the literature, from our own historical data or if unknown from small scale pilots) to estimate the sample size needed to achieve a certain power (usually around 0.8) with appropriate statistical test like the t test with a $p < 0.05$.

Qualitative analysis (most of the animal procedures described in this appendix): the number of animals (group size) is based in literature and/or years of experience with similar type of experiments.

Moreover, these types of experiments will be performed sequentially via which we ensure that we will use the minimum number of mice per group that will be informative.

B. The animals

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

Mus musculus, (Wt, genetically modified, mutants)

Origin: Hubrecht institute/external licensed breeders.

Adult: max. 5000

All animal studies in this project will exclusively involve mice. Up to today, there are no alternative methods to fully understand tissue development/homeostasis and cancer in the context of the whole organism. For the majority of the proposed studies, the mouse is the most appropriate animal model because: (1) like humans, mice are mammals; (2) physiology is more extensively characterized; (3) mice are amenable to transgenic modification; (4) a large number of relevant transgenic and knock out lines are already available.

For the type of experiments described in this procedure, it is difficult to calculate the exact number of animals, since for various experimental setups different amount of mice are required, and the variation and outcome of the experiments are unknown. The number of mice required depends on the mouse model (e.g tumor incidence, tumor heterogeneity), the type of intervention and the characteristics of the measuring parameters and can therefore only be described in global and strategic terms. For these reasons we have provided a total number of mice based on experience over the past 5 years with these types of experiments in our group. Before we will start an experiment we will write an application to the IVD. In this application we will exactly describe which considerations, facts and results have led to the proposition of the number of animals needed for these experiments.

We have estimated the number of animals based on experience over the past 5 years. To give an idea of typical experiments we have done in the past 5 years:

- 1) Acute imaging without experimental intervention. For example, we used this experiment to see how frequent Lgr5+ stem cells in the intestine divide at various locations within the stem cell niche. We know from experience that we need to image at least 12 mice to quantitatively say whether these cells have migratory potential or not. On average, we had typically 10 of this type of projects per year, so over a 5 year time span we expect to require approximately 50 of these typical experiments.
- 2) Acute imaging with experimental intervention. For example, we used this experiment to test the migration potential of tumor cells that have "high-jacked" stem cells properties in breast tumors, mice will be imaged acutely that overexpress PyMT oncogene in the mammary gland. We know from experience that we need to image at least 6 mice to quantitatively say whether these cells have migratory potential or not. On average, we had typically 20 of this type of projects per year, so over a 5 year time span we expect to require approximately 100 of these typical experiments.
- 3) Chronic imaging without experimental intervention. For example, we used this experiment to see how the progeny of Lgr5+ stem cell outcompetes the progeny of another Lgr5+ stem cell. To study this, we typically image the progeny over multiple days. We typically image at least 20 mice to quantitatively say something about competition. On average, we had typically 20 of this type of projects per year, so over a 5 year time span we expect to require approximately 100 of these typical experiments.
- 4) Chronic imaging with experimental intervention. For example, we used this experiment to see how the progeny of Lgr5+ stem cell in which e.g. the APC is depleted outcompetes the progeny of a wild-type Lgr5+ stem cell. To study this, we typically image the progeny over multiple days. We typically image at least 20 mice to quantitatively say something about competition. On average, we had typically 18 of this type of projects per year, so over a 5 year time span we expect to require approximately 90 of these typical experiments.

For the chronic in vivo imaging experiments in some cases the animals can no longer be used for the experiments (tumour at a location not suitable for imaging, problems with the window. This happens in <10% of the cases.

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.

Before we consider the import or generation and subsequently analysis of (compound) GGM to study cancer models, we first will extensively analyze cell lines, existing tissue patient material and/or organoids. However, animal studies are unavoidable if we seek for the fundamental insight into the molecular and cellular mechanisms that drive tissue homeostasis/development, cancer initiation, growth and metastasis.

We make extensive use of human material and in vitro experiments using cell lines and organoid culture (3D cultures) where possible, which extensively reduces the animal numbers. The use human material and in vitro cultures allows this project to comply with the 3Rs (replacement, reduction and refinement) by keeping the mice numbers to be used to a minimum.

Whenever possible, we will perform pilot studies with the minimum number of animals possible. Where possible, mice with inducible alleles will be used, so mice should not display a phenotype before the induction of the alleles.

Experiments will be done sequential, where on basis of the results, decisions will be made on the next steps.

If homozygous mice doesn't show any discomfort we will keep the mice on a homozygous background, thereby reducing the number of mice needed for breeding.

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

All possibilities to reduce pain, fear or suffering will be used. There are no negative environmental effects; all mice will be housed under strict D1 conditions.

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 required.

The experiments in this project are not carried out due to legal requirements.

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

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 I.

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

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

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

If required, isoflurane will be used general anaesthesia and Temgesic to relieve pain.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Other than in terminally anaesthetized animals dosing and sampling procedures will be undertaken using a combination of volumes, routes and frequencies that will result in no more than transient, light discomfort.

Due to administration of inducing agents or other substances animals will be experiencing no follow up effects.

Animals bearing tumors will never reach end-stage clinical effects. The scientific endpoints of all studies are much earlier than the humane endpoints.

It is expected that no animals (0%) will be experiencing more than mild discomfort due to the genetic modification. However, it is impossible to predict the nature or severity of any potential genetic defect. So, in all cases, animals will be carefully monitored for possible side effects. Animals exhibiting any unexpected harmful phenotypes will be killed within a day and analyzed when possible

Animals may lose their window (<5%). In the vast majority of these animals (>95%), we notice signs of detachment of the window far before it becomes loose, and the mice will be sacrificed. In the remaining animals, the window loss will be noticed within 24hrs. From prior experience we know that window loss is not a source for additional discomfort.

Explain why these effects may emerge.

Tumor development and/or inflicted tissue damage due to genetic alterations and/or administration of small molecule compounds/drugs/chemicals/toxins.

It is unclear why some animals may lose their windows.

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

Daily monitoring of the mice combined with an experimental design aiming at reducing the discomfort of the animals.

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.

Weight loss (>20% in comparison with control or 15% weight loss in two days), changes in behavior or body posture, signs of general sickness and/or discomfort.

Loss of window

Growth of tumor: In all cases the guidelines of the Code of Practice Animals in Cancer research will strictly be followed.

Indicate the likely incidence.

Expected <5%, moderate <1day.

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').

Mild discomfort : interventions resulting in mild discomfort in combination with acute imaging (15%)

Moderate discomfort: interventions resulting in moderate discomfort in combination with acute imaging (15%)

Moderate discomfort : Interventions in combination with chronic imaging (70%)

End of experiment**L. Method of killing**

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

All animals are killed while still under anesthesia for imaging to use their organs in ex vivo analyses.

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



Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website (www.centralecommissiedierproeven.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'.	80102	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Koninklijke Nederlandse Academie van Wetenschappen (Hubrecht Institute)	
1.3 List the serial number and type of animal procedure. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number	Type of animal procedure
	3.4.4.3	Ex-vivo analysis in mouse models and after transplantation tissues/cells/organoids

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

The general design of the experiments in this appendix is shown in the flowchart in appendix 1. Our aim is to determine in ex vivo analysis the molecular/cellular mechanisms required for tissue homeostasis/development, tumor initiation, tumor progression, cancer diagnosis, cancer prevention, and cancer treatment via the analysis of (compound) mouse models.

The different components of the proposed experiments are (see also the flowchart in appendix 1):

A. Mouse models:

There are several considerations to choose for a specific animal model:

- Wt mice,
- Genetically modified mice that expressed a fluorescent marker in a specific cell type/lineage. In some cases transgene inducing or deleting agents (e.g tamoxifen) are administered to induce the expression of the fluorescent marker.
- Genetically modified mice that changes expression of a functional gene(transgene knockout). In some cases transgene inducing or deleting agents (e.g tamoxifen) are administered to change the expression of the functional gene.
- Spontaneous tumor model
- Immune-deficient/wt recipient mouse

The choice will in all cases based on the combination of the following considerations:

- Aim/ specific question (normal development, tumor development, establishing cell lines/organoids or a cell type specific expression of a fluorescent marker for an

immunohistochemical study)

- Type of tumor
- Aim/readout parameters (e.g. static vs dynamic, long-term vs short-term dynamics)

B. Intervention III:

To identify/validate for example which molecular and cellular processes are important for development and/or tissue homeostasis, for misregulating the processes leading to tumor initiation, the growth and metastasis of tumors, and the development of therapy resistance, we will analyze mice in which tissues/cells/organoids are (mostly orthotopically) transplanted. The presence of e.g. a fluorescent marker in transplanted tissues/cells/organoids allows us to localize these cells by histology and to isolate the fluorescent expressing cells via FACS sorting, which allows us to analyze (gene expression profile) and culture these cells. In some cases, mice get a special diet (but this does not lead to any discomfort).

C. 1. Ex vivo analysis

In all experiments, animals will be killed adult organs will be isolated for detailed analysis of the consequences of transplantation of tissue/cells/organoids. Analysis will include among others histological sections labelled with antibodies or antisense RNA probes, RNA expression analysis, DNA or protein extracts. Also, cells from organs might be isolated by FACS and/or cultured in vitro (organoids).

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

1. Tissue sampling for genotyping and identification via ear and tail biopsy resp. under anaesthesia (4% isoflurane/oxygen).
2. Transplantation of tissues/cells/organoids under adequate anaesthesia and analgesia
3. Administration of transgene inducing or deleting agents or control substances alone or in combination, continuously or intermittently by one or more of the following routes:
 - a) in diet or drinking water (max. 1 time, < 2 wks)
 - b) subcutaneous (max. 1 time)
 - c) intraperitoneal(max. 5 times)
 - d) implantation of a slow release pellet subcutaneously under adequate anaesthesia and analgesia (1 time)
 - e) implantation of a slow release pump subcutaneously under adequate anaesthesia and analgesia (1 time)
 - f) oral (max. 10 times)
4. (Optional) Administration of a labelling agent (e.g. BrdU) via one of the following routes:
 - a) intraperitoneal (max 3 times)
 - b) implantation of a slow release pump subcutaneously under adequate anesthesia and analgesia (1 time)
 - c) intravenous (max 3 times)
5. All animals will be killed and organ(s)/tissue will be isolated for ex vivo analysis
Adult mice: via CO₂/O₂ method or perfusion fixation under lethal dose of Nembutal.

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

Whenever possible we strive for a situation to express the outcome of our experiments in quantitative terms. To estimate the number of animals to be used in an experiment, we use the effect size (if known, e.g., from data in the literature, from our own historical data or if unknown from small scale pilots) to estimate the sample size needed to achieve a certain power (usually around 0.8) with appropriate statistical test like the t test with a $p < 0.05$.

Qualitative analysis (most of the animal procedures described in this appendix): the number of animals (group size) is based in literature and/or years of experience with similar type of experiments. Moreover, these types of experiments will be performed sequentially via which we ensure that we will use the minimum number of mice per group that will be informative.

B. The animals

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

Mus musculus, (Wt, genetically modified, mutants)

Origin: Hubrecht institute/external licensed breeders.

Adult: max. 4500

All animal studies in this project will exclusively involve mice. Up to today, there are no alternative methods to fully understand tissue development/homeostasis and cancer in the context of the whole organism. For the majority of the proposed studies, the mouse is the most appropriate animal model because: (1) like humans, mice are mammals; (2) physiology is more extensively characterized; (3) mice are amenable to transgenic modification; (4) a large number of relevant transgenic and knock out lines are already available.

For the type of experiments described in this procedure, it is difficult to calculate the exact number of animals, since for various experimental setups different amount of mice are required, and the variation and outcome of the experiments are unknown. The number of mice required depends on the mouse model (e.g tumor incidence, tumor heterogeneity), the type of intervention and the characteristics of the measuring parameters and can therefore only be described in global and strategic terms. For these reasons we have provided a total number of mice based on experience over the past 5 years with these types of experiments in our group. Before we will start an experiment we will write an application to the IVD. In this application we will exactly describe which considerations, facts and results have led to the proposition of the number of animals needed for these experiments.

To give an idea of a typical experiment in this appendix: E.g. if we want to characterize tumor cells that have "high-jacked" stem cell properties in colorectal tumors, these cells need to be isolated by flow cytometry to subsequently analyze them by RNAseq. For example, for this experiment we want to isolate pieces of colon from mice in which the tumor suppressor gene APC is depleted in the stem cells (via Lgr5-GFP ires-creert). These mice develop tumors throughout the intestine, and reach human end point, due to dysfunctional intestine, before tumors progress to a stage in which cells acquire stem cell properties. Therefore, pieces of colon are transplanted in recipient mice to initiate the growth of a single tumor. Since just one tumor is formed upon transplantation, the intestine is functional and the tumor can progress to a stage where cells adapt stem cell properties and start to express GFP by the Lgr5 stem cell promotor. Based on the expression of GFP, these cells can then be isolated by flow cytometry. For such a typical experiment, a maximum of 30 mice may be required (15 donor mice and 15 recipient mice per group). For some experiments, multiple time points are required. On average, we had typically 30 of this type of experiments per year, so over a 5 year time span we expect to require approximately 150 of these typical experiments.

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.

Before we consider the import or generation and subsequently analysis of (compound) GGM to study cancer models, we first will extensively analyze cell lines, existing tissue patient material and/or organoids. However, animal studies are unavoidable if we seek for the fundamental insight into the molecular and cellular mechanisms that drive tissue homeostasis/development, cancer initiation, growth and metastasis.

We make extensive use of human material and in vitro experiments using cell lines and organoid culture (3D cultures) where possible, which extensively reduces the animal numbers. The use human material and in vitro cultures allows this project to comply with the 3Rs (replacement, reduction and refinement) by keeping the mice numbers to be used to a minimum.

Whenever possible, we will perform pilot studies with the minimum number of animals possible.

Experiments will be done sequential, where on basis of the results, decisions will be made on the next steps.

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

All possibilities to reduce pain, fear or suffering will be used. There are no negative environmental effects; all mice will be housed under strict D1 conditions.

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 required.

The experiments in this project are not carried out due to legal requirements.

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

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 I.

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

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

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

If required, isoflurane will be used general anaesthesia and Temgesic to relieve pain.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Other than in terminally anaesthetized animals dosing and sampling procedures will be undertaken using a combination of volumes, routes and frequencies that will result in no more than transient, light discomfort. In less than 3% of all experiments, pumps/pellets will be implanted which leads to a moderate discomfort.

Due to administration of gene-inducing agents animals will be experiencing no follow up effects. Animals bearing tumors will never reach end-stage clinical effects. The scientific endpoints of all studies are much earlier than the humane endpoints.

It is expected that no animals (0%) will be experiencing more than mild discomfort due to the genetic modification. However, it is impossible to predict the nature or severity of any potential genetic defect. So, in all cases, animals will be carefully monitored for possible side effects. Animals exhibiting any unexpected harmful phenotypes will be killed within a day.

Explain why these effects may emerge.

Tumor development and/or inflicted tissue damage due to genetic alterations

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

Daily monitoring of the mice combined with an experimental design aiming at reducing the discomfort of the animals.

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.

Weight loss (>20% in comparison with control or 15% weight loss in two days), changes in behavior or body posture, signs of general sickness and/or discomfort.

In all cases the guidelines of the Code of Practice Animals in Cancer research will strictly be followed

Indicate the likely incidence.

Expected 0% within time frame of the experiments.

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').

Adult: mild 96%, moderate 1% <1day, moderate <3% constantly due to implantation pellet/pump

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

All animals are killed to use their organs in ex vivo analyses.

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



Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website (www.centralecommissiedierproeven.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'. 80102
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. Koninklijke Nederlandse Academie van Wetenschappen (Hubrecht Institute)
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| 3.4.4.4 | In vivo imaging in mouse models and after transplanted tissues/cells/organoids |
- Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

The general design of the experiments in this appendix is shown in the attached flowchart.

Our aim is to determine with in vivo imaging the molecular/cellular mechanisms required for tissue homeostasis/development, tumor initiation, tumor progression, cancer diagnosis, cancer prevention, and cancer treatment via the analysis of (compound) mouse models.

The different components of the proposed experiments are (see also the flowchart in appendix 1):

A. Mouse models:

There are several considerations to choose for a specific animal model:

- Wt mice,
- Genetically modified mice that expressed a fluorescent marker in a specific cell type/lineage. In some cases transgene inducing or deleting agents (e.g tamoxifen) are administered to induce the expression of the fluorescent marker.
- Genetically modified mice that changes expression of a functional gene(transgene knockout). In some cases transgene inducing or deleting agents (e.g tamoxifen) are administered to change the expression of the functional gene.
- Spontaneous tumor model
- Immune-deficient/wt recipient mouse

The choice will in all cases based on the combination of the following considerations:

- Aim/ specific question (normal development, tumor development, establishing cell

- lines/organoids or a cell type specific expression of a fluorescent marker)
- Type of tumor
 - Aim/readout parameters (e.g. static vs dynamic, long-term vs short-term dynamics)

B. Intervention III:

To identify/validate for example which molecular and cellular processes are important for development and/or tissue homeostasis, for misregulating the processes leading to tumor initiation, the growth and metastasis of tumors, and the development of therapy resistance, we will analyze mice in which tissues/cells/organoids are (mostly orthotopically) transplanted. The presence of e.g. a fluorescent marker in transplanted tissues/cells/organoids allows us to visualize these cells by intravital imaging. In some cases, mice get a special diet (but this does not lead to any discomfort).

C. Readout parameters

To study dynamic processes that are missed in static histological images, in vivo imaging will be performed. For the imaging experiments two different strategies will be used:

2. Imaging in an acute experiment under anaesthesia. This is the method of choice for the imaging of processes that need to be imaged frequently (time scale of hours) for a short period of time (max 72 hours). In this case it is not an option to anesthetize the animal multiple times a day.

Chronic imaging. To study processes at a timescale of days chronic imaging is the method of choice.

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

1. Tissue sampling for genotyping and identification via ear and tail biopsy resp. under anaesthesia (4% isoflurane/oxygen).
2. Transplantation of tissues/cells/organoids under adequate anaesthesia and analgesia
3. Intravital imaging either:
 - Acute imaging: Surgical exposure of the imaging site under adequate anaesthesia and analgesia. Such an experiment will last up to 72 hours
 - Chronic imaging: In these situation prior to the imaging period an imaging window is implanted (such as the breast, skin, abdomen and skull) (one window per animal) followed by the repeated imaging sessions under isoflurane anesthesia. From experience we know that for the implantation of intracutaneous windows does not lead to post-operative discomfort and post-operative analgesia is therefore extensive postoperative analgesia is not indicated. In a number of cases this is contraindicated for the processes under study.
4. All animals will be killed while still under anesthesia for ex vivo analysis of the isolation of organs or tumors:
 - a) perfusion fixation under lethal dose of Nembutal.
 - b) via cervical dislocation under isoflurane anesthesia

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

Whenever possible we strive for a situation to express the outcome of our experiments in quantitative terms. To estimate the number of animals to be used in an experiment, we use the effect size (if known, e.g., from data in the literature, from our own historical data or if unknown from small scale pilots) to estimate the sample size needed to achieve a certain power (usually around 0.8) with appropriate statistical test like the t test with a $p < 0.05$.

Qualitative analysis (most of the animal procedures described in this appendix): the number of animals (group size) is based in literature and/or years of experience with similar type of experiments.

Moreover, these types of experiments will be performed sequentially via which we ensure that we will use the minimum number of mice per group that will be informative.

B. The animals

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

Mus musculus, (Wt, genetically modified, mutants)
Origin: Hubrecht institute/external licensed breeders.
Adult: max. 2000

All animal studies in this project will exclusively involve mice. Up to today, there are no alternative methods to fully understand tissue development/homeostasis and cancer in the context of the whole organism. For the majority of the proposed studies, the mouse is the most appropriate animal model because: (1) like humans, mice are mammals; (2) physiology is more extensively characterized; (3) mice are amenable to transgenic modification; (4) a large number of relevant transgenic and knock out lines are already available.

For the type of experiments described in this procedure, it is difficult to calculate the exact number of animals, since for various experimental setups different amount of mice are required, and the variation and outcome of the experiments are unknown. The number of mice required depends on the mouse model (e.g tumor incidence, tumor heterogeneity), the type of intervention and the characteristics of the measuring parameters and can therefore only be described in global and strategic terms. For these reasons we have provided a total number of mice based on experience over the past 5 years with these types of experiments in our group. Before we will start an experiment we will write an application to the IVD. In this application we will exactly describe which considerations, facts and results have led to the proposition of the number of animals needed for these experiments.

To give an idea of a typical experiment in this appendix: E.g. if we want to characterize whether the tumor cells that have "high-jacked" stem cell properties have also acquired migratory properties, the motility of these cells need to be visualized by intravital microscopy. For example, for this experiment we want to isolate pieces of colon from mice in which the tumor suppressor gene APC is depleted in the stem cells (via Lgr5-GFP ires-creert). These mice develop tumors throughout the intestine, and reach human end point, due to dysfunctional intestine, before tumors progress to a stage in which cells acquire stem cell properties. Therefore, pieces of colon are transplanted in recipient mice to initiate the growth of a single tumor. Since just one tumor is formed upon transplantation, the intestine is functional and the tumor can progress to a stage where cells adapt stem cell properties and start to express GFP by the Lgr5 stem cell promotor. These cells can then be visualized by acute intravital imaging to visualize e.g. cell migration and chronic intravital imaging to visualize e.g. the formation of progeny. For such a typical experiment, a maximum of 20 mice may be required (10 donor mice and 10 recipient mice per group).

- 1) Acute imaging: On average, we had typically 4 of this type of projects per year, so over a 5 year time span we expect to require approximately 20 of these typical experiments.
- 2) Chronic imaging: On average, we had typically 16 of this type of projects per year, so over a 5 year time span we expect to require approximately 80 of these typical experiments.

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.

Before we consider the import or generation and subsequently analysis of (compound) GGM to study cancer models, we first will extensively analyze cell lines, existing tissue patient material and/or organoids. However, animal studies are unavoidable if we seek for the fundamental insight into the molecular and cellular mechanisms that drive tissue homeostasis/development, cancer initiation, growth

and metastasis.

We make extensive use of human material and in vitro experiments using cell lines and organoid culture (3D cultures) where possible, which extensively reduces the animal numbers. The use human material and in vitro cultures allows this project to comply with the 3Rs (replacement, reduction and refinement) by keeping the mice numbers to be used to a minimum.

Whenever possible, we will perform pilot studies with the minimum number of animals possible.

Experiments will be done sequential, where on basis of the results, decisions will be made on the next steps.

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

All possibilities to reduce pain, fear or suffering will be used. There are no negative environmental effects; all mice will be housed under strict D1 conditions

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 required.

The experiments in this project are not carried out due to legal requirements.

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

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 I.

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

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

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken

to ensure that optimal procedures are used.

If required, isoflurane will be used general anaesthesia and Temgesic to relieve pain.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Other than in terminally anaesthetized animals dosing and sampling procedures will be undertaken using a combination of volumes, routes and frequencies that will result in no more than transient, light discomfort.

Due to administration of inducing agents or other substances animals will be experiencing no follow up effects.

Animals bearing tumors will never reach end-stage clinical effects. The scientific endpoints of all studies are much earlier than the humane endpoints.

It is expected that no animals (0%) will be experiencing more than mild discomfort due to the genetic modification. However, it is impossible to predict the nature or severity of any potential genetic defect. So, in all cases, animals will be carefully monitored for possible side effects. Animals exhibiting any unexpected harmful phenotypes will be killed within a day and analyzed when possible.

Animals may lose their window (<5%). In the vast majority of these animals (>95%), we notice signs of detachment of the window far before it becomes loose, and the mice will be sacrificed. In the remaining animals, the window loss will be noticed within 24hrs. From prior experience we know that window loss is not a source for additional discomfort.

Explain why these effects may emerge.

Tumor development and/or inflicted tissue damage due to transplantation of tissues/cells/organoids. It is unclear why some animals may lose their windows.

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

Daily monitoring of the mice combined with an experimental design aiming at reducing the discomfort of the animals.

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.

Weight loss (>20% in comparison with control or 15% weight loss in two days), changes in behavior or body posture, signs of general sickness and/or discomfort.

Loss of window

Growth of tumor: In all cases the guidelines of the Code of Practice Animals in Cancer research will strictly be followed.

Indicate the likely incidence.

Expected <5%, moderate <1day.

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').

Mild discomfort : mild discomfort due to intervention, acute imaging (12%)

Moderate discomfort: moderate discomfort due to intervention, acute imaging (8%)

Moderate discomfort : All chronic imaging experiments (80%)

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

All animals are killed while still under anesthesia for imaging to use their organs in ex vivo analyses.
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



Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website (www.centralecommissiedierproeven.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'.	80102	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Koninklijke Nederlandse Academie van Wetenschappen (Hubrecht Institute)	
1.3 List the serial number and type of animal procedure. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number	Type of animal procedure
	3.4.4.5	Ex-vivo analysis in mouse models and after transplanted tissues/cells/organoids, Gene inactivation/overexpression, administering drugs and injury

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

The general design of the experiments in this appendix is shown in the attached flowchart. Our aim is to determine in ex vivo analysis the molecular/cellular mechanisms required for tissue homeostasis/development, tumor initiation, tumor progression, cancer diagnosis, cancer prevention, and cancer treatment via the analysis of (compound) mouse models.

The different components of the proposed experiments are (see also the flowchart in appendix 1):

A. Mouse models:

There are several considerations to choose for a specific animal model:

- Wt mice,
- Genetically modified mice that expressed a fluorescent marker in a specific cell type/lineage. In some cases transgene inducing or deleting agents (e.g tamoxifen) are administered to induce the expression of the fluorescent marker.
- Genetically modified mice that changes expression of a functional gene(transgene knockout). In some cases transgene inducing or deleting agents (e.g tamoxifen) are administered to change the expression of the functional gene.
- Spontaneous tumor model
- Immune-deficient/wt recipient mouse

The choice will in all cases based on the combination of the following considerations:

- Aim/ specific question (normal development, tumor development, establishing cell lines/organoids or a cell type specific expression of a fluorescent marker for an immunohistochemical study)
- Type of tumor
- Aim/readout parameters (e.g. static vs dynamic, long-term vs short-term dynamics)

To identify/validate for example which molecular and cellular processes are important for development and/or tissue homeostasis, for misregulating the processes leading to tumor initiation, the growth and metastasis of tumors, and the development of therapy resistance, we will analyze (GM) mice in which cells/tissues/organoids are transplanted and the gene(s) will be activated, inactivated, overexpressed and/or misexpressed. In some cases, mice get a special diet (but this does not lead to any discomfort).

We will use inducible systems including e.g. the well-known Cre-LoxP system in which a floxed gene can be deleted, overexpressed or misexpressed upon the induction of the Cre enzyme via the administration of tamoxifen. In particular, when Cre is expressed in mice harboring a LoxP-containing target gene, the desired gene modification can be restricted to certain developmental stage, organ (e.g. intestine), cell type (e.g. stem cell) of the mouse depending on the specificity and timing of recombinase expression. In this way the desired gene modification can be restricted to certain developmental stage, organ (e.g. intestine), cell type (e.g. stem cell). Successful deletion/activation via (e.g.) Cre enzyme induction might be monitored via expression of a reporter gene (e.g. LacZ or fluorescent protein(s)).

We will also use endogenous and exogenous promoters that are tissue or cell specific to drive expression of genes.

The presence of e.g. a fluorescent marker in a (putative) stem cell allows us to localize these cells by histology and to isolate the fluorescent expressing cells via FACS sorting, which allows us to analyze (gene expression profile) and culture these cells.

The introduction of e.g. a toxin receptor (e.g., Diphtheria toxin receptor) in the cells allows us to specifically kill these cells upon the administration of the toxin (e.g., Diphtheria toxin). This study allows us to determine the consequence of the loss of the toxin receptor expressing cells during development and for tissue homeostasis.

If the required genetically modified mouse is not available, we will obtain this model by generating, importing or by crossing existing models (3.4.4.7).

B. Interventions IV:

- To identify/validate for example which molecular and cellular processes are important for development and/or tissue homeostasis, for misregulating the processes leading to tumor initiation, the growth and metastasis of tumors, and the development of therapy resistance, we will analyze mice in which tissues/cells/organoids are (mostly orthotopically) transplanted. The presence of e.g. a fluorescent marker in transplanted tissues/cells/organoids allows us to visualize these cells by intravital imaging. To identify/validate which molecular and cellular processes are important for development and/or tissue homeostasis, for misregulating the processes leading to tumor initiation, the growth and metastasis of tumors, and the development of therapy resistance, we will analyze GM mice in which functional gene(s) will be activated, inactivated, overexpressed and/or misexpressed.
- The administration of small molecule compounds/drugs/chemicals/toxins, we might be able to rescue or mimic the phenotypes of the in vivo genetic deletion(s) and/or activation(s) and therefore further identify the function of these cells in vivo. The mice might be injected with DNA labelling agents shortly before euthanasia to measure the proliferation capacity of the stems and their derivatives.
- Injuries (such as the surgical removal of a tumor, taking biopsies (not for the analysis, but for the injury), making a wound) will be made to investigate for example the recruitment of cell types (e.g. immune cells) with subsequent effects on expression profile of different cells in the tissue and the tumor.

C. Ex vivo analysis

In all experiments, animals will be killed and adult organs will be isolated for detailed analysis of the consequences of transplantation of tissue/cells/organoids. Analysis will include among others histological sections labelled with antibodies or antisense RNA probes, RNA expression analysis, DNA or protein extracts. Also, cells from organs might be isolated by FACS and/or cultured in vitro (organoids).

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

1. Tissue sampling for genotyping and identification via ear and tail biopsy resp. under anaesthesia (4% isoflurane/oxygen).
2. Transplantation of tissues/cells/organoids under adequate anaesthesia and analgesia
3. Administration of transgene inducing or deleting agents or control substances alone or in combination, continuously or intermittently by one or more of the following routes:
 - a) in diet or drinking water (max. 1 time, < 2 wks)
 - b) subcutaneous (max. 3 time)
 - c) intraperitoneal(max. 7 times)
 - d) implantation of a slow release pump subcutaneously under adequate anaesthesia and analgesia
 - e) oral (max. 10 times)
4. Administration of small molecule compounds, drugs, toxin, chemicals or control substances alone or in combination, continuously or intermittently by one or more of the following routes:
 - a) in diet or drinking water (max. time, <2 wks)
 - b) subcutaneous (max. 10 time)
 - c) intraperitoneal (max. 10 times)
 - d) implantation of a slow release pellet subcutaneously under adequate anaesthesia and analgesia (1 time)
 - e) implantation of a slow release pump subcutaneously under adequate anaesthesia and analgesia (1 time)
 - f) oral (max. 10 times)
5. (Optional) Administration of a labelling agent (e.g. BrdU) via one of the following routes:
 - a) intraperitoneal (max 3 times)
 - b) implantation of a slow release pump subcutaneously under adequate anaesthesia and analgesia (1 time)
 - c) intravenous (max 3 times)
6. (Optional) To mimic the injury resulting from e.g. surgical removal of a tumor or obtaining a biopsy, (tumor) tissues will be 'injured' under adequate anaesthesia and analgesia
7. All animals will be killed and organ(s)/tissue will be isolated for ex vivo analysis
 - a) Adult mice: via CO₂/O₂ method or perfusion fixation under lethal dose of Nembutal.
 - b) Embryo's and neonates: will be put on melting ice water for 10 min. (but not in contact with) after which they will be decapitated and the head immediately frozen (or the brains dissected and fixed).

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

Whenever possible we strive for a situation to express the outcome of our experiments in quantitative terms. To estimate the number of animals to be used in an experiment, we use the effect size (if known, e.g., from data in the literature, from our own historical data or if unknown from small scale pilots) to estimate the sample size needed to achieve a certain power (usually around 0.8) with appropriate statistical test like the t test with a $p < 0.05$.

Qualitative analysis (most of the animal procedures described in this appendix): the number of animals (group size) is based in literature and/or years of experience with similar type of experiments.

Moreover, these types of experiments will be performed sequentially via which we ensure that we will use the minimum number of mice per group that will be informative.

B. The animals

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

Mus musculus, (Wt, genetically modified, mutants)
Origin: Hubrecht institute/external licensed breeders.
Adult: max. 1650

All animal studies in this project will exclusively involve mice. Up to today, there are no alternative methods to fully understand tissue development/homeostasis and cancer in the context of the whole organism. For the majority of the proposed studies, the mouse is the most appropriate animal model because: (1) like humans, mice are mammals; (2) physiology is more extensively characterized; (3) mice are amenable to transgenic modification; (4) a large number of relevant transgenic and knock out lines are already available.

For the type of experiments described in this procedure, it is difficult to calculate the exact number of animals, since for various experimental setups different amount of mice are required, and the variation and outcome of the experiments are unknown. The number of mice required depends on the mouse model (e.g tumor incidence, tumor heterogeneity), the type of intervention and the characteristics of the measuring parameters and can therefore only be described in global and strategic terms. For these reasons we have provided a total number of mice based on experience over the past 5 years with these types of experiments in our group. Before we will start an experiment we will write an application to the IVD. In this application we will exactly describe which considerations, facts and results have led to the proposition of the number of animals needed for these experiments.

To give an idea of a typical experiment in this appendix: E.g. if we want to characterize how inactivation of a gene (e.g. Kras) affects tumor cells that have "high-jacked" stem cell properties in colorectal tumors, these cells need to be isolated by flow cytometry to subsequently analyze them by RNAseq. For example, for this experiment we want to isolate pieces of colon from mice in which the tumor suppressor gene APC and Kras are depleted in the stem cells (via Lgr5-GFP ires-CreERTt). These mice develop tumors throughout the intestine, and reach human end point, due to dysfunctional intestine, before tumors progress to a stage in which cells acquire stem cell properties. Therefore, pieces of colon are transplanted in recipient mice to initiate the growth of a single tumor. Since just one tumor is formed upon transplantation, the intestine is functional and the tumor can progress to a stage where cells adapt stem cell properties and start to express GFP by the Lgr5 stem cell promotor. Based on the expression of GFP, these cells can then be isolated by flow cytometry. For such a typical experiment, a maximum of 60 mice may be required (15 donor mice and 15 recipient mice per group. We need two groups: one control group in which Kras is not depleted and one group in which Kras is depleted). On average, we had typically 5 to 6 of this type of projects per year, so over a 5 year time span we expect to require approximately 27,5 of these typical experiments.

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.

Before we consider the import or generation and subsequently analysis of (compound) GGM to study cancer models, we first will extensively analyze cell lines, existing tissue patient material and/or organoids. However, animal studies are unavoidable if we seek for the fundamental insight into the molecular and cellular mechanisms that drive tissue homeostasis/development, cancer initiation, growth and metastasis.

We make extensive use of human material and in vitro experiments using cell lines and organoid culture (3D cultures) where possible, which extensively reduces the animal numbers. The use human material and in vitro cultures allows this project to comply with the 3Rs (replacement, reduction and refinement) by keeping the mice numbers to be used to a minimum.

Whenever possible, we will perform pilot studies with the minimum number of animals possible. Where possible, mice with inducible alleles will be used, so mice should not display a phenotype before the induction of the alleles.

Experiments will be done sequential, where on basis of the results, decisions will be made on the next steps.

If homozygous mice doesn't show any discomfort we will keep the mice on a homozygous background, thereby reducing the number of mice.

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

All possibilities to reduce pain, fear or suffering will be used. There are no negative environmental effects; all mice will be housed under strict D1 conditions.

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 required.

The experiments in this project are not carried out due to legal requirements.

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

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 I.

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

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

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

If required, isoflurane will be used as dormicum and Temgesic to releave pain.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Other than in terminally anaesthetized animals dosing and sampling procedures will be undertaken using a combination of volumes, routes and frequencies that will result in no more than transient, light discomfort. In less than 3% of all experiments, pumps/pellets will be implanted which leads to a moderate discomfort.

Due to administration of inducing agents or other substances animals will be experiencing no follow up effects.

Animals bearing tumors will never reach end-stage clinical effects. The scientific endpoints of all studies are much earlier then the humane endpoints.

It is expected that no animals (0%) will be experiencing more then mild discomfort due to the genetic modification. However, it is impossible to predict the nature or severity of any potential genetic defect. So, in all cases, animals will be careful monitored for possible side effects. Animals exhibiting any unexpected harmful phenotypes will be killed within a day and analyzed when possible.

Explain why these effects may emerge.

Tumor development and/or inflicted tissue damage due to genetic alterations and/or administration of small molecule compounds/drugs/chemicals/toxins.

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

Daily monitoring of the mice combined with an experimental design aiming at reducing the discomfort of the animals.

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.

Weight loss (>20% in comparison with control or 15% weight loss in two days), changes in behavior or body posture, signs of general sickness and/or discomfort.

In all cases the guidelines of the Code of Practice Animals in Cancer research will strictly be followed

Indicate the likely incidence.

Expected 0% within time frame of the experiments.

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').

Adult: mild 96%, moderate 1% <1day, moderate <3% constantly due to implantation pellet/pump

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

All animals are killed to use their organs in ex vivo analyses.

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



Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website (www.centralecommissiedierproeven.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'.	80102	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Koninklijke Nederlandse Academie van Wetenschappen (Hubrecht Institute)	
1.3 List the serial number and type of animal procedure. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number	Type of animal procedure
	3.4.4.6	In vivo imaging in mouse models and after transplantation tissues/cells/organoids, Gene inactivation/overexpression, administering drugs and injury

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

The general design of the experiments in this appendix is shown in the attached flowchart. Our aim is to determine in ex vivo analysis the molecular/cellular mechanisms required for tissue homeostasis/development, tumor initiation, tumor progression, cancer diagnosis, cancer prevention, and cancer treatment via the analysis of (compound) mouse models.

The different components of the proposed experiments are (see also the flowchart in appendix 1):

A. Mouse models:

There are several considerations to choose for a specific animal model:

- Wt mice,
- Genetically modified mice that expressed a fluorescent marker in a specific cell type/lineage. In some cases transgene inducing or deleting agents (e.g tamoxifen) are administered to induce the expression of the fluorescent marker.
- Genetically modified mice that changes expression of a functional gene(transgene knockout). In some cases transgene inducing or deleting agents (e.g tamoxifen) are administered to change the expression of the functional gene.
- Spontaneous tumor model
- Immune-deficient/wt recipient mouse

The choice will in all cases based on the combination of the following considerations:

- Aim/ specific question (normal development, tumor development, establishing cell lines/organoids or a cell type specific expression of a fluorescent marker for an immunohistochemical study)
- Type of tumor
- Aim/readout parameters (e.g. static vs dynamic, long-term vs short-term dynamics)

To identify/validate for example which molecular and cellular processes are important for development and/or tissue homeostasis, for misregulating the processes leading to tumor initiation, the growth and metastasis of tumors, and the development of therapy resistance, we will analyze (GM) mice in which cells/tissues/organoids are transplanted and the gene(s) will be activated, inactivated, overexpressed and/or misexpressed. In some cases, mice get a special diet (but this does not lead to any discomfort).

We will use inducible systems including e.g. the well-known Cre-LoxP system in which a floxed gene can be deleted, overexpressed or misexpressed upon the induction of the Cre enzyme via the administration of tamoxifen. In particular, when Cre is expressed in mice harboring a LoxP-containing target gene, the desired gene modification can be restricted to certain developmental stage, organ (e.g. intestine), cell type (e.g. stem cell) of the mouse depending on the specificity and timing of recombinase expression. In this way the desired gene modification can be restricted to certain developmental stage, organ (e.g. intestine), cell type (e.g. stem cell). Successful deletion/activation via (e.g.) Cre enzyme induction might be monitored via expression of a reporter gene (e.g. LacZ or fluorescent protein(s)).

We will also use endogenous and exogenous promoters that are tissue or cell specific to drive expression of genes.

The presence of e.g. a fluorescent marker in a (putative) stem cell allows us to localize these cells by in vivo imaging.

The introduction of e.g. a toxin receptor (e.g., Diphtheria toxin receptor) in the cells allows us to specifically kill these cells upon the administration of the toxin (e.g., Diphtheria toxin). This study allows us to determine the consequence of the loss of the toxin receptor expressing cells during development and for tissue homeostasis.

If the required genetically modified mouse is not available, we will obtain this model by generating, importing or by crossing existing models (3.4.4.7).

B. Interventions IV:

- To identify/validate for example which molecular and cellular processes are important for development and/or tissue homeostasis, for misregulating the processes leading to tumor initiation, the growth and metastasis of tumors, and the development of therapy resistance, we will analyze mice in which tissues/cells/organoids are (mostly orthotopically) transplanted. The presence of e.g. a fluorescent marker in transplanted tissues/cells/organoids allows us to visualize these cells by intravital imaging. To identify/validate which molecular and cellular processes are important for development and/or tissue homeostasis, for misregulating the processes leading to tumor initiation, the growth and metastasis of tumors, and the development of therapy resistance, we will analyze GM mice in which functional gene(s) will be activated, inactivated, overexpressed and/or misexpressed.
- The administration of small molecule compounds/drugs/chemicals/toxins, we might be able to rescue or mimic the phenotypes of the in vivo genetic deletion(s) and/or activation(s) and therefore further identify the function of these cells in vivo. The mice might be injected with DNA labelling agents shortly before euthanasia to measure the proliferation capacity of the stems and their derivatives.
- Injuries (such as the surgical removal of a tumor, taking biopsies (not for the analysis, but for the injury), making a wound) will be made to investigate for example the recruitment of cell types (e.g. immune cells) with subsequent effects on expression profile of different cells in the tissue and the tumor.

C. Readout parameters

To study dynamic processes that are missed in static histological images, in vivo imaging will be performed. For the imaging experiments one of the two different strategies will be used:

1. Imaging in an acute experiment under anesthesia. This is the method of choice for the imaging of processes that need to be imaged frequently (time scale of hours) for a short period of time (max 72 hours). In this case it is not an option to anesthetize the animal multiple times a day.
2. Chronic imaging. To study processes at a timescale of days chronic imaging is the method of choice.

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

1. Tissue sampling for genotyping and identification via ear and tail biopsy resp. under anaesthesia (4% isoflurane/oxygen).
2. Transplantation of tissues/cells/organoids under adequate anaesthesia and analgesia
3. Administration of transgene inducing or deleting agents or control substances alone or in combination, continuously or intermittently by one or more of the following routes:
 - a) in diet or drinking water (max. 1 time, < 2 wks)
 - b) subcutaneous (max. 3 time)
 - c) intraperitoneal(max. 7 times)
 - d) implantation of a slow release pellet subcutaneously under adequate anesthesia and analgesia (1 time)
 - e) implantation of a slow release pump subcutaneously under adequate anesthesia and analgesia (1 time)
 - f) oral (max. 10 times)
4. Administration of small molecule compounds, drugs, toxin, chemicals or control substances alone or in combination, continuously or intermittently by one or more of the following routes:
 - a) in diet or drinking water (max. time, <2 wks)
 - b) subcutaneous (max. 10 time)
 - c) intraperitoneal (max. 10 times)
 - d) implantation of a slow release pellet subcutaneously under adequate anaesthesia and analgesia (1 time)
 - e) implantation of a slow release pump subcutaneously under adequate anesthesia and analgesia (1 time)
 - f) oral (max. 10 times)
5. (Optional) Administration of a labelling agent (e.g. BrdU) via one of the following routes:
 - a) intraperitoneal (1 time)
 - b) implantation of a slow release pump subcutaneously under adequate anaesthesia and analgesia (1 time)
 - c) intravenous (1 time)
6. (Optional) To mimic the injury resulting from e.g. surgical removal of a tumor or obtaining a biopsy, (tumor) tissues will be 'injured' under adequate anaesthesia and analgesia
7. Intravital imaging either
 - Acute imaging: Surgical exposure of the imaging site under adequate anaesthesia and analgesia. Such an experiment will last up to 72 hours
 - Chronic imaging: In these situation prior to the imaging period an imaging window is implanted (such as the breast, skin, abdomen and skull) (one window per animal) followed by the repeated imaging sessions under isoflurane anesthesia. From experience we know that for the implantation of intracutaneous windows does not lead to post-operative discomfort and post-operative analgesia is therefore extensive postoperative analgesia is not indicated. In a number of cases this is contraindicated for the processes under study.
8. All animals will be killed and organ(s)/tissue will be isolated for ex vivo analysis
 - a) Adult mice: via CO2/O2 method or perfusion fixation under lethal dose of Nembutal.
 - b) Embryo's and neonates: will be put on melting ice water for 10 min. (but not in contact with) after which they will be decapitated and the head immediately frozen (or the brains dissected and fixed).

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

Whenever possible we strive for a situation to express the outcome of our experiments in quantitative terms. To estimate the number of animals to be used in an experiment, we use the effect size (if known, e.g., from data in the literature, from our own historical data or if unknown from small scale pilots) to estimate the sample size needed to achieve a certain power (usually around 0.8) with appropriate statistical test like the t test with a $p < 0.05$.

Qualitative analysis (most of the animal procedures described in this appendix): the number of animals (group size) is based in literature and/or years of experience with similar type of experiments.

Moreover, these types of experiments will be performed sequentially via which we ensure that we will use the minimum number of mice per group that will be informative.

B. The animals

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

Mus musculus, (Wt, genetically modified, mutants)

Origin: Hubrecht institute/external licensed breeders.

Adult: max. 2800

All animal studies in this project will exclusively involve mice. Up to today, there are no alternative methods to fully understand tissue development/homeostasis and cancer in the context of the whole organism. For the majority of the proposed studies, the mouse is the most appropriate animal model because: (1) like humans, mice are mammals; (2) physiology is more extensively characterized; (3) mice are amenable to transgenic modification; (4) a large number of relevant transgenic and knock out lines are already available.

For the type of experiments described in this procedure, it is difficult to calculate the exact number of animals, since for various experimental setups different amount of mice are required, and the variation and outcome of the experiments are unknown. The number of mice required depends on the mouse model (e.g tumor incidence, tumor heterogeneity), the type of intervention and the characteristics of the measuring parameters and can therefore only be described in global and strategic terms. For these reasons we have provided a total number of mice based on experience over the past 5 years with these types of experiments in our group. Before we will start an experiment we will write an application to the IVD. In this application we will exactly describe which considerations, facts and results have led to the proposition of the number of animals needed for these experiments.

To give an idea of a typical experiment in this appendix: E.g. if we want to characterize how inactivation of a gene (e.g. Kras) affects the migration properties of tumor cells that have "high-jacked" stem cell properties, the motility of these cells need to be visualized by intravital microscopy. For example, for this experiment we want to isolate pieces of colon from mice in which the tumor suppressor gene APC and Kras are depleted in the stem cells (via Lgr5-GFP ires-creert). These mice develop tumors throughout the intestine, and reach human end point, due to dysfunctional intestine, before tumors progress to a stage in which cells acquire stem cell properties. Therefore, pieces of colon are transplanted in recipient mice to initiate the growth of a single tumor. Since just one tumor is formed upon transplantation, the intestine is functional and the tumor can progress to a stage where cells adapt stem cell properties and start to express GFP by the Lgr5 stem cell promotor. Based on the expression of GFP, stem cells can be visualized by acute intravital imaging to visualize e.g. cell migration and chronic intravital imaging to visualize e.g. the formation of progeny. For such a typical experiment, a maximum of 40 mice may be required (10 donor mice and 10 recipient mice per group. We need two groups: one control group in which Kras is not depleted and one group in which Kras is depleted).

- 1) Acute imaging: On average, we had typically 9 of this type of projects per year, so over a 5 year time span we expect to require approximately 45 of these typical experiments.
- 2) Chronic imaging: On average, we had typically 5 of this type of projects per year, so over a 5 year time span we expect to require approximately 25 of these typical experiments.

For the chronic in vivo imaging experiments in some cases the animals can no longer be used for the experiments (tumour at a location not suitable for imaging, problems with the window. This happens in 10% of the cases.

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.

Before we consider the import or generation and subsequently analysis of (compound) GGM to study cancer models, we first will extensively analyze cell lines, existing tissue patient material and/or organoids. However, animal studies are unavoidable if we seek for the fundamental insight into the molecular and cellular mechanisms that drive tissue homeostasis/development, cancer initiation, growth and metastasis.

We make extensive use of human material and in vitro experiments using cell lines and organoid culture (3D cultures) where possible, which extensively reduces the animal numbers. The use human material and in vitro cultures allows this project to comply with the 3Rs (replacement, reduction and refinement) by keeping the mice numbers to be used to a minimum.

Whenever possible, we will perform pilot studies with the minimum number of animals possible. Where possible, mice with inducible alleles will be used, so mice should not display a phenotype before the induction of the alleles.

Experiments will be done sequential, where on basis of the results, decisions will be made on the next steps..

If homozygous mice doesn't show any discomfort we will keep the mice on a homozygous background, thereby reducing the number of mice.

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

All possibilities to reduce pain, fear or suffering will be used. There are no negative environmental effects; all mice will be housed under strict D1 conditions.

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 required.

The experiments in this project are not carried out due to legal requirements.

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

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 I.

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

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

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

If required, isoflurane will be used general anaesthesia and Temgesic to relieve pain.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Other than in terminally anaesthetized animals dosing and sampling procedures will be undertaken using a combination of volumes, routes and frequencies that will result in no more than transient, light discomfort. In less than 3% of all experiments, pumps/pellets will be implanted which leads to a moderate discomfort.

Due to administration of inducing agents or other substances animals will be experiencing no follow up effects.

Animals bearing tumors will never reach end-stage clinical effects. The scientific endpoints of all studies are much earlier than the humane endpoints.

It is expected that no animals (0%) will be experiencing more than mild discomfort due to the genetic modification. However, it is impossible to predict the nature or severity of any potential genetic defect. So, in all cases, animals will be carefully monitored for possible side effects. Animals exhibiting any unexpected harmful phenotypes will be killed within a day and analyzed when possible.

Animals may lose their window (<5%). In the vast majority of these animals (>95%), we notice signs of detachment of the window far before it becomes loose, and the mice will be sacrificed. In the remaining animals, the window loss will be noticed within 24hrs. From prior experience we know that window loss is not a source for additional discomfort.

Explain why these effects may emerge.

Tumor development and/or inflicted tissue damage due to genetic alterations and/or administration of small molecule compounds/drugs/chemicals/toxins.

It is unclear why some animals may lose their windows.

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

Daily monitoring of the mice combined with an experimental design aiming at reducing the discomfort of the animals.

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.

Weight loss (>20% in comparison with control or 15% weight loss in two days), changes in behavior or body posture, signs of general sickness and/or discomfort.

Loss of window

Growth of tumor: In all cases the guidelines of the Code of Practice Animals in Cancer research will strictly be followed.

Indicate the likely incidence.

Expected <5%, moderate <1day.

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').

Moderate discomfort: 100%

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

All animals are killed to use their organs in ex vivo analyses.

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

Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website (www.centralecommissiedierproeven.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'. | 80102 | |
| 1.2 Provide the name of the licenced establishment. | Koninklijke Nederlandse Academie van Wetenschappen (Hubrecht Institute) | |
| 1.3 List the serial number and type of animal procedure.

<i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i> | Serial number | Type of animal procedure |
| | 3.4.4.7 | Generation, welfare assessment and breeding of GMM/mutants with hampered phenotype |

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

Creation of genetically mice via DNA/RNA injection into oocyte, injection of genetically modified ES cells into blastocysts and/or via the CRISPR/Cas9 system.

Welfare assessment according to the Consensus document on genetically altered animals . Newcompound mouse models and new created transgenic lines and/or KO lines generated via classical methods and/or novel combinations of these aforementioned lines will be monitored for 2 generations to determine the absence or presence a phenotype with constitutional discomfort.

For some transplantation experiments (e.g. when human organoids are transplanted), immune deficient acceptor mice are required. We breed our own immune deficient NOD-SCID mice. For this, we have 6-10 breeding pairs that will be replaced every 6 month that leads to offspring that will be used for experiments. Since these mice are housed under proper barrier conditions, they do not have a hampered phenotype. According to the Consensus document on genetically altered animals, breeding with these animals is considered an animal experiment and should therefore be part of the license.

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

Generation of new lines:

1) Superovulation.

- a) Administration of gonadotropin's (2 times) by subcutaneous or intraperitoneal injections followed by mating.
- b) Animals will be killed for the isolation of early embryos.

2) Embryo recipients.

- a) Recipients for embryo transfer will be rendered pseudo-pregnant by mating with a sterile (vasectomized) male.
- b) Genetically modified embryos will be implanted surgically or non-surgically into the reproductive tract.
- c) Embryo recipients, not as part of an experiment, will be killed after weaning of the pups at three weeks of age.

3) Weaned pups at 3 weeks of age: Tissue sampling for genotyping and/or identification via tail and ear_cut, respectively, under anesthesia (isoflurane).

Animals are killed by O2/CO2 method.

Breeding immune deficient acceptor mice.

Welfare assessment:

We daily check the mice on several parameters (overall appearance, size, confirmation and growth, coat condition, behavior, clinical signs, relative size and numbers) as has been described in the Directive 2010/63/EU: corrigendum of 24 Jan. 2013.

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

Statistical analysis doesn't play a role for these types of experiments. We will use state of the art techniques. All techniques are proven to be effective in generating GM mice with a minimum number of mice possible.

B. The animals

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

Mus musculus: genetically modified and wild type adult mice. All vasectomized males which will be obtained from a registered commercial company, all other mice are obtained from our own Institute, an establishment licensed breeder by the NVWA, or from a registered commercial company.

Generation of GG mice: we expect to generate max. 10 new lines over the next 5 years. For the creation of a new GM mouse line we will use on average max. 150 mice (according to the besluit biotechnologie). Therefore in total max. 1.500 mice.

Welfare assessment: we expect to generate over the next 5 years 10 new (compound) GM lines for which we have to perform the welfare assessment. For 2 generations, 7 males and 7 females control and GM mice. We therefore need in total: $10 \text{ (new (compound) lines)} * 2 \text{ (generation)} * 28 \text{ ((7 male + 7 female = 14 GM mice) + (7 male + 7 female = 14 control mice))} = 560 \text{ mice.}$

Therefore in total max. 1.500 (generation of GGM) + 560 (welfare assessment) = 2060 mice
Of note

The majority of the newly generated GG mice will be floxed mice which are not part of the welfare assessment protocol.

We will not breed mice showing a hampered phenotype and but instead will sacrifice them.

For some transplantation experiments (e.g. when human organoids are transplanted), immune

deficient acceptor mice are required. We breed our own immune deficient mice. For this, we have 6-10 breeding pairs that will be replaced every 6 month that leads to offspring that will be used for experiments. So the max number of animals will be: 10 (pairs) x 2 (male and female) x 2 (twice a year) x 5 (for 5 years) = 200 animals for breeding.

These 10 breeding pairs generate on average 28 pups per week that will be used in appendix 3.4.4.3, 3.4.4.4, 3.4.4.5 and 3.4.4.6. These animals are described and counted in these appendixes.

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.

Before we consider the generation of a new (compound) GM Mice we first will extensively analyze cell lines, existing tissue patient material and/or organoids. Only the in vitro experiments do not provide sufficient information or does not address completely the research question/hypothesis, we will consider the generation of a novel GM mice.

Animal studies are unavoidable if we seek comprehensive knowledge and understanding of molecular and cellular mechanisms of tissue homeostasis and cancer.

The CRISPR/Cas9 system allows us, if required, to genetically modify up to 5 different genes at the same time. This strongly reduce the number of mice used for the generation and/or breeding of these compound mice.

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

All possibilities to reduce pain, fear or suffering will be used. There are no negative environmental effects; all mice will be housed under strict D1 conditions

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 required.

The experiments in this project are not carried out due to legal requirements.

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

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 I.

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

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

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

If required, isoflurane will be used general anaesthesia and Temgesic to relieve pain.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

We don't expect to find other adverse effect. This is the direct result of how we create our constructs for the generation of GM mice

Explain why these effects may emerge.

We don't expect to find other adverse effect

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

Daily monitoring of the mice combined with an experimental design aiming at reducing the discomfort of the animals.

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.

Expected <5%, moderate <1day.

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').

Donors: moderate 100%

Fosters: moderate 100%

GM mice: no 99%

GM mice: mild 1%

Immune deficient mice: no 100%

Monitoring mice: no 100%

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

All animals are killed to use their organs in ex vivo analyses.

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

AVD-801002015125 Overzicht aantal muizen, groepen en ongerief

Totaal aantallen: embryo's 200, pasgeboren 100 en volwassen 22.210

Muizen: 52% mild ongerief en 48% matig ongerief

	Procedure	Group	Animals	mild	moderate	Total group
3.4.4.1	Gene (in) activation interventions (ex vivo analysis)	Group 1a	Mice embryo's (>E13)	200		
		Group 1b	Mice neonates (until weaning)	100		
		Group 1c	Mice adults 99%	3840		
		Group 1d	Mice adults 4%		160	4300
3.4.4.2	Gene (in) activation interventions (in vivo imaging)	Group 2a	Mice adults 15%	750		
		Group 2b	Mice adults 85%		4250	5000
3.4.4.3	Transplantation (ex vivo analysis)	Group 3a	Mice adults 96%	4320		
		Group 3b	Mice adults 4%		180	4500
3.4.4.4	Transplantation (in vivo imaging)	Group 4a	Mice adults 12%	240		
		Group 4b	Mice adults 88%		1760	2000
3.4.4.5	Transplantation Gene (in) activation interventions (ex vivo analysis)	Group 5a	Mice adults 96%	1584		
		Group 5b	Mice adults 4%		66	1650
3.4.4.6	Transplantation Gene (in) activation interventions (in vivo imaging)	Group 6	Mice adults 20%		2800	2800
3.4.4.7	Generation Welfare assessment and Breeding of GMM	Group 7a	Mice adults 100% (generation GMM)		1500	
		Group 7b	Mice adults (welfare assessment)	554		
		Group 7c	Mice adults (welfare assessment)		6	
		Group 7d	Immune deficient mice adults (breeding)	200		2260



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Kon. Ned. Academie van Wetenschappen

██████████

Postbus 19121

1000 GC AMSTERDAM



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

www.zbo-ccd.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD801002015125

Bijlagen

2

Datum 23-06-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw ██████████

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 22 juni 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD801002015125. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

Als wij nog informatie van u nodig hebben dan ontvangt u daarover bericht. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn bijgeschreven op de rekening van de CCD. Zodra uw aanvraag compleet is, ontvangt u binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. In geval van een complexe aanvraag kan deze termijn met maximaal vijftien werkdagen verlengd worden. U krijgt bericht als de beslisperiode van uw aanvraag vanwege complexiteit wordt verlengd. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Factuur

Bijgaand treft u de factuur aan voor de betaling van de leges. Wij verzoeken u de leges zo spoedig mogelijk te voldoen, zodat we uw aanvraag in behandeling kunnen nemen. Is uw betaling niet binnen dertig dagen ontvangen, dan wordt uw aanvraag buiten behandeling gesteld. Dit betekent dat uw aanvraag niet beoordeeld wordt en u uw project niet mag starten.

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 80100

Naam instelling of organisatie: Kon. Ned. Academie van Wetenschappen

Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde:

KvK-nummer: 54667089

Postbus: 19121

Postcode en plaats: 1000 GC AMSTERDAM

Tenaamstelling van het
rekeningnummer: Hubrecht Instituut/Nederlands Hersen Instituut

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam:

Functie: Group Leader

Afdeling:

Telefoonnummer:

E-mailadres:

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u? Nieuwe aanvraag
 Wijziging op een (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
 Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

Over uw project

Geplande startdatum: 1 juni 2015
Geplande einddatum: 1 juni 2020
Titel project: The molecular and cellular mechanisms of tumor initiation, growth, metastasis and thera
Titel niet-technische samenvatting: Het begrijpen van het ontstaan en ontwikkeling van kanker, uitzaiingen en resistentie
Naam DEC: DEC-KNAW
Postadres DEC: ██████████ Amsterdam
E-mailadres DEC: ██████████

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 741,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen: Projectvoorstel
 Beschrijving Dierproeven
 Niet-technische samenvatting
Overige bijlagen: DEC-advies

Ondertekening

Naam: ██████████
Functie: Directeur Instituten KNAW
Plaats: Amsterdam
Datum: 1 juni 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Kon. Ned. Academie van Wetenschappen

Postbus 19121
1000 GC AMSTERDAM



**Centrale Commissie
Dierproeven**
Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.zbo-ccd.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD801002015125

Bijlagen
2

Datum 23-06-2015
Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 23 juni 2015
Vervaldatum: 23 juli 2015
Factuurnummer: 201570125

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvegrunning dierproeven Betreft aanvraag AVD801002015125	€ 741,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL28RBOS 056.99.96.066 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.

Format DEC-advies

Maak bij de toepassing van dit format gebruik van de bijbehorende toelichting, waarin elke stap in het beoordelingsproces wordt toegelicht

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: AVD/801002015125
2. Titel van het project: The molecular and cellular mechanisms of tumor initiation, growth, metastasis and therapy resistance.
3. Titel van de NTS: Het begrijpen van het ontstaan en ontwikkeling van kanker, uitzaaiingen en resistentie tegen therapie.
4. Type aanvraag:
 - ✓ nieuwe aanvraag projectvergunning
 - wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: KNAW
 - telefoonnummer contactpersoon: ██████████
 - mailadres contactpersoon: ██████████
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ✓ ontvangen door DEC: 13-05-2015
 - ✓ aanvraag compleet: 15-06-2015
 - ✓ in vergadering besproken: 21-05-2015
 - ✓ anderszins behandeld: n.v.t.
 - ✓ termijnonderbreking(en): n.v.t.
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen:
aanpassing aanvraag:
 - ✓ advies aan CCD: 22-06-2015
7. Eventueel horen van aanvrager
 - Datum: n.v.t.
 - Plaats:
 - Aantal aanwezige DEC-leden:
 - Aanwezige (namens) aanvrager:
8. Correspondentie met de aanvrager:
 - Datum 27-05-2015
 - Strekking: completering van de aanvraag
 - Datum antwoord: 15-06-2015
 - Strekking van de antwoorden: de aanvraag is gecompliceerd
9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC): geen

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig. Het omvat dierproeven in de zin der wet.

2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag. Er is enige overlap met een aantal al van een positief advies voorziene DEC-protocollen.
3. De DEC is competent om over deze projectvergunningsaanvraag te adviseren. De benodigde expertise op dit wetenschappelijk terrein is aanwezig binnen de DEC. Geen van de DEC-leden is betrokken bij het betreffende project.
4. Vanwege betrokkenheid bij het betreffende project is een aantal DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken bij de advisering: n.v.t.

C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is wetenschappelijk verantwoord.
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.
3. De doelstelling, in relatie tot de uitvoering, is helder omschreven; te weten het verkrijgen van fundamenteel wetenschappelijke inzichten in 1) de biologische mechanismen van processen die belangrijk zijn voor het ontstaan, groei, uitzaaiing en therapieresistentie van tumoren, en 2) het ontwikkelen/verbeteren van kankertherapieën. Op termijn kunnen de resultaten leiden tot nieuwe behandelingsmethoden voor patiënten met kanker.

Het project richt zich op tumorvorming, het ontstaan van uitzaaiingen en therapieresistentie. Binnen dit project zijn de belangrijkste doelen het begrijpen wat de rol is van stamcellen en kankerstemcellen en wat de betrokkenheid is van de micro- en macro-omgeving waarin deze cellen zich bevinden. Het fundamenteel wetenschappelijke belang acht de DEC substantieel.

Het verkrijgen van deze fundamenteel wetenschappelijke kennis is essentieel voor het ontwikkelen van nieuwe en/of verbeterde therapeutische strategieën voor de behandeling van kanker en dit is naar de mening van de DEC een substantieel belang. Het project dient hiermee een belangrijk maatschappelijk belang, gezien de grote groep patiënten met tumoren.

4. De gekozen strategie en experimentele aanpak in combinatie met de infrastructuur op het Hubrecht Instituut en de expertise van de betrokken onderzoeksgroep bieden een realistisch uitzicht op het behalen van de beoogde doelstellingen binnen gevraagde looptijd van het project. Het project bouwt voort op een langlopende lijn van onderzoek van een grote groep onderzoekers. Over de afgelopen jaren zijn met een vergelijkbare strategie en aanpak belangrijke wetenschappelijk resultaten behaald, resulterend in vele publicaties in vooraanstaande tijdschriften. Het onderzoek wordt financieel gesteund door verschillende onafhankelijke subsidiegevers. Er zijn internationale samenwerkingsverbanden met andere laboratoria actief in dit onderzoeksveld.

Verder zijn er nauwe banden met de kliniek waardoor er een sterke wisselwerking ontstaat tussen klinisch relevante vragen en het beschreven fundamentele onderzoek waar de dierproeven een deel van uit maken.

5. Alle dieren worden gefokt voor het gebruik in dierproeven, er is geen sprake van afwijkende huisvesting en/of hergebruik. Er is geen sprake van bedreigde diersoorten, niet-menselijke primaten, zwerfdieren en/of dieren in/uit het wild. De toegepaste methoden voor anesthesie/euthanasie zijn conform de Richtlijn.
6. Het cumulatieve ongerief gepaard gaand met de dierproeven, zoals beschreven in de zeven verschillende type dierproeven, is naar inschatting van de DEC licht (Type dierproef 1, 3, en 5) of matig (Type dierproef 2, 4, 6 en 7). Er is een beperkt risico op onbedoelde bijwerkingen. Deze inschatting van de DEC is in overeenstemming met het niveau van cumulatief ongerief zoals dat is geclassificeerd door de onderzoekers. Dit is gebaseerd op hun ruime ervaring met de gebruikte modellen in vergelijkbare dierproeven.
7. Binnen het project wordt maximaal gebruik gemaakt van methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk **vervangen**. Een belangrijk onderdeel van de experimentele strategie is de gefaseerde opzet. In de eerste fase, voorafgaand aan de dierproeven, vindt een uitgebreid onderzoek plaats met weefsel afkomstig van patiënten en cellijnen. Na deze fase zijn er go/no-go-beslissingsmomenten, voordat tot het uitvoeren van dierproeven wordt besloten. Nieuwe inzichten in de processen die de initiatie, groei en metastase van tumorcellen reguleren kunnen op dit moment alleen maar verkregen worden in een intact organisme. Deze processen, waarbij verschillende typen cellen betrokken zijn binnen een gecompliceerde anatomische context, zijn zeer complex en kunnen niet met cellijnen worden bestudeerd. Naar het oordeel van de DEC zijn er geen alternatieven beschikbaar voor het voorgestelde gebruik van intacte dieren om te doelstelling van dit project te realiseren.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereisten van **vermindering** van dierproeven. De onderzoeksgroep heeft een jarenlange ervaring opgebouwd met dit soort experimenten en door een veelal gefaseerde opzet wordt per experiment niet meer dan het minimaal benodigde aantal dieren ingezet. Voorafgaand aan de kwantitatieve experimenten wordt op basis van literatuurgegevens, eigen historische data of een specifiek hiertoe uitgevoerd pilot experiment de groepsgrootte bepaald. Technieken en procedures worden zorgvuldig toegepast. Het aantal te gebruiken dieren is realistisch geschat.
9. De uitvoering van het project is in overeenstemming met de vereisten van **verfijning** van dierproeven en is zo opgezet dat de dierproeven met zo min mogelijk ongerief worden uitgevoerd. Bij de opzet wordt rekening gehouden met dierenwelzijn en wel op de volgende manieren: 1) het gebruik van adequate anesthesie en analgesie waar nodig, 2)

een intensieve monitoring van de proefdieren na de inductie van tumoren, 3) het gebruik van weefsel-specifiek genetisch-gemodificeerde muizen, 4) een monitoring op het optreden van onverwacht constitutioneel ongerief van nieuwe gecreëerde genotypes.

Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.

- 10.** De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en is geformuleerd in begrijpelijke taal. De NTS voldoet daarmee aan de eisen zoals gesteld in artikel 10.a.1.7 van de Wod.

D. Ethische afweging

De centrale vraag voor de ethische afweging is of het belang van het doel van dit project opweegt tegen het ongerief dat de dieren ondergaan (geclassificeerd als licht of matig). Het doel van het project is het verkrijgen van fundamenteel wetenschappelijke inzichten in: 1) de biologische mechanismen van processen die belangrijk zijn voor het ontstaan, groei, uitzaaiing en therapieresistentie van tumoren, en 2) het ontwikkelen/verbeteren van kankertherapieën.

Het onderzoek is primair fundamenteel wetenschappelijk van karakter. De verwachting is dat de resultaten op den duur kunnen bijdragen aan nieuwe of verbeterde therapieën voor kankerpatiënten wat voor een grote groep patiënten van groot belang is om te overleven.

Het fundamenteel wetenschappelijke onderzoek in dit project is van aangetoonde en excellente kwaliteit. De onderzoeksgroep beschikt over ruime ervaring met de gekozen onderzoeksstrategie en met de zeven beschreven type dierproeven.

De classificatie van het ongerief van de dieren in de verschillende typen dierproeven is licht of matig. Bij de uitvoeren van de dierproeven wordt een adequate invulling gegeven aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en verfijning van de dierproeven. De DEC onderschrijft dat de doelstellingen niet zonder het gebruik van proefdieren kunnen worden behaald.

De DEC is van mening dat de resultaten van dierproeven zullen bijdragen aan het behalen van het geformuleerde doel en schat de kans op het realiseren van de fundamenteel wetenschappelijke doelstellingen in als hoog. Het project is uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord. De verkregen fundamenteel wetenschappelijke kennis is essentieel om te kunnen komen tot nieuwe therapeutische benaderingen of van een verbetering van bestaande therapieën in patiënten met tumoren. Het gaat om een grote groep patiënten met uiteenlopende, op dit moment nog slecht behandelbare, aandoeningen. Het maatschappelijk belang is daarom groot.

De DEC komt tot de conclusie dat de doeleinden van het project het voorgestelde gebruik van de proefdieren en het daarmee samenhangende ongerief van de proefdieren rechtvaardigt.

E. Advies

1. Advies aan de CCD
 - ✓ **De DEC adviseert de vergunning te verlenen**
2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.
3. Er zijn geen knelpunten of dilemma's gesignaleerd tijdens het beoordelen van de aanvraag of het formuleren van het advies.

[REDACTED]

Van: secretariaat DEC [REDACTED]
Verzonden: maandag 22 juni 2015 10:08
Aan: ZBO-CCD
Onderwerp: AVD-801002015125 ingediend

Categorieën: [REDACTED]

Geachte CCD,

Als secretaris van de DEC-KNAW heb ik zojuist alle documenten behorende bij AVD-801002015125 naar u gestuurd via de webftp. Het getekende aanvraagformulier is afgelopen vrijdag per post naar u gestuurd. Mochten er nog vragen zijn dan hoor ik dat graag.

Groet [REDACTED]
DEC-KNAW

[REDACTED]

Van: Info-zbo
Verzonden: woensdag 22 juli 2015 17:47
Aan: [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: AVD801002015125: Aanvullende informatie

Geachte [REDACTED],

Op 22 juni 2015 heeft de CCD uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "The molecular and cellular mechanisms of tumor initiation, growth, metasis and therapy resistance". De CCD heeft nog aanvullende informatie van u nodig om uw aanvraag verder te kunnen beoordelen.

-De DEC heeft in haar advies aangegeven dat er enige overlap is tussen de huidige vergunningaanvraag en eerder van een positief advies voorziene DEC protocollen. Om een beeld te krijgen van de mate van overlap en het aantal proefdieren dat daarmee gemoeid is, is het wenselijk antwoord te krijgen op de volgende vragen: In hoeverre is het noodzakelijk dat, daar waar er overlap is, de al eerder van een positief advies voorziene dierproeven en het huidige bij de CCD aangevraagde project naast elkaar uitgevoerd kunnen worden. Indien noodzakelijk, om welke in deze aanvraag beschreven dierproeven gaat het en hoeveel dieren zullen nog gebruikt worden op de DEC protocollen?

-De CCD hecht er aan dat het aantal dieren in voorraad gedood terug te dringen. In uw aanvraag beschrijft u niet of beide geslachten gebruikt kunnen worden. Indien u van plan bent alleen/voornamelijk muizen van 1 geslacht gaat gebruiken, kunt u onderbouwen waarom het belangrijk is dieren van 1 geslacht te gebruiken?

Opsturen informatie

U heeft 14 dagen de tijd om de ontbrekende informatie op te sturen. De CCD zou uw aanvraag echter graag tijdens haar eerstvolgende vergadering behandelen. De CCD zou de gevraagde informatie daarom uiterlijk maandag 27 juli 2015 van u ontvangen. U kunt deze informatie aanleveren via NetFTP of per e-mail.

Wanneer een beslissing

De beslistermijn op uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat bovengenoemde informatie is ontvangen. Na ontvangst van uw reactie nemen wij uw aanvraag verder in behandeling. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Meer informatie

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

Bij voorbaat hartelijk dank,

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag
.....

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl (Let op: nieuw e-mail adres)



Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500EK Den Haag

Datum: Utrecht, 24 juli 2015.

Uw referentie: AVD80100-2015-125

Geachte Leden van de CCD,

Deze brief schrijven wij u n.a.v. uw brief/email d.d. 22 juli 2015. In deze brief verzocht u ons om aanvullende informatie nodig om projectvergunning dierproeven (AVD80100-2015-125) verder te kunnen beoordelen. Hierbij voldoen wij aan dit verzoek.

- De DEC heeft in haar advies aangegeven dat er enige overlap is tussen de huidige vergunningaanvraag en eerder van een positief advies voorziene DEC protocollen. Om een beeld te krijgen van de mate van overlap en het aantal proefdieren dat daarmee gemoeid is, is het wenselijk antwoord te krijgen op de volgende vragen: In hoeverre is het noodzakelijk dat, daar waar er overlap is, de al eerder van een positief advies voorziene dierproeven en het huidige bij de CCD aangevraagde project naast elkaar uitgevoerd kunnen worden. Indien noodzakelijk, om welke in deze aanvraag beschreven dierproeven gaat het en hoeveel dieren zullen nog gebruikt worden op de DEC protocollen?

Antwoord vraag 1:

Om de continuïteit van ons onderzoek te garanderen en omdat een aantal op dit moment lopende goedgekeurde DEC protocollen allemaal in een verschillend stadium van uitvoering zijn is het onvermijdelijk dat er een overlap is tussen deze projectaanvraag en de lopende DEC protocollen. Na het verlenen van de projectvergunning door de CCD zullen al onze proefdieren en dierexperimenten formeel gaan vallen onder deze vergunning en zullen de dieren en de experimenten 'afgeschreven' worden van de beschrijvingen en aantallen in projectbeschrijving.

-De CCD hecht er aan dat het aantal dieren in voorraad gedood terug te dringen. In uw aanvraag beschrijft u niet of beide geslachten gebruikt kunnen worden. Indien u van plan bent alleen/voornamelijk muizen van 1 geslacht gaat gebruiken, kunt u onderbouwen waarom het belangrijk is dieren van 1 geslacht te gebruiken?

Antwoord vraag 2:

In onze beschreven experimenten maken we, waar mogelijk, geen onderscheid tussen beide geslachten en zullen zowel mannetjes als vrouwtjes gebruikt worden. Dit zal resulteren in een vermindering van het



Hubrecht
Institute

Developmental Biology
and Stem Cell Research

aantal in voorraad gedode dieren. Uitzondering hierop zijn studies van tumoren die geslachtsafhankelijk zijn zoals borstkanker.

Wij hopen U hiermee voldoende geïnformeerd te hebben en zien uw reactie met belangstelling tegemoet.

Hoogachtend,



- KNAW



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

KNAW

Postbus 19121
1000GC Amsterdam

Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl
T 0900-28 000 28 (10 ct /min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD801002015125

Uw referentie

Datum 10-08-2015
Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Bijlagen
1

Geachte [REDACTED]

Op 22 juni 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "The molecular and cellular mechanisms of tumor initiation, growth, metasis and therapy resistance" met aanvraagnummer AVD801002015125. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 24 juli 2015 heeft u uw aanvraag aangevuld na vragen van het secretariaat.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de dierproeven (hierna de wet), voor de periode van 12 augustus 2015 tot 01 juni 2020. Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning. De looptijd van de vergunning wijkt af van de aangevraagde periode omdat de aangevraagde startdatum van het project in het verleden ligt. U kunt met uw project "The molecular and cellular mechanisms of tumor initiation, growth, metasis and therapy resistance" starten.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC KNAW gevoegd d.d. 22 juni 2015. 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. Naar aanleiding van de door de DEC gesignaleerde overlap tussen de huidige vergunningsaanvraag en eerder van een positief advies voorziene DEC protocollen, is de voorwaarde toegevoegd dat daar waar er sprake is van overlap tussen de in deze vergunning vergunde dierproeven en eerder goedgekeurde DEC protocollen de dieren en experimenten na het verlenen van de vergunning formeel onder deze vergunning gaan vallen, zoals u in uw brief van 24 juli 2015 heeft aangegeven. Hierdoor is er geen sprake meer van overlap.

Het DEC advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving liggen ten grondslag aan 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 gegevens in het colofon.

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.

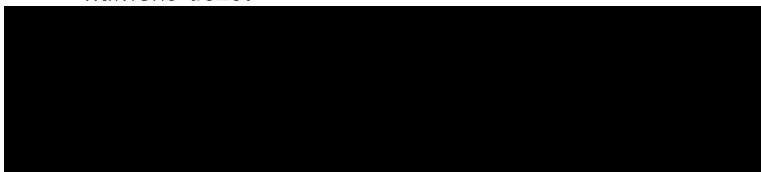
Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op <http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

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 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:
- DEC-advies
 - Weergave wet- en regelgeving



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan
Naam: KNAW
Adres: Postbus 19121
Postcode en woonplaats: 1000GC Amsterdam
Deelnemersnummer: 80100

deze projectvergunning voor het tijdvak 12 augustus 2015 tot 01 juni 2020, voor het project "The molecular and cellular mechanisms of tumor initiation, growth, metasis and therapy resistance" met aanvraagnummer AVD801002015125, gebaseerd op het advies van Dierexperimentencommissie DEC KNAW.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Group Leader.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 22 juni 2015
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 22 juni 2015 en brief ontvangen op 24 juli 2015;
 - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 22 juni 2015;
 - c. Advies van Dierexperimentencommissie d.d. 22 juni 2015, ontvangen op 22 juni 2015;
 - d. Aanvullende informatie ontvangen op 24 juli 2015.

Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst
Gene (in) activation interventions (ex vivo analysis)	Muis (WT, GGM en mutanten) Embryo's Neonaten Volwassenen	200 100 4000	Licht Licht Licht: 96% Matig <1 dag: 1% Matig continu: <3%
Gene (in) activation interventions (in vivo imaging)	Muis (WT, GGM en mutanten) Volwassenen	5000	Licht: 15% Matig: 85%
Transplantation (ex vivo analysis)	Muis (WT, GGM en mutanten) Volwassenen	4500	Licht: 96% Matig <1 dag: 1% Matig continu: <3%
Transplantation (in vivo imaging)	Muis (WT, GGM en mutanten) Volwassenen	2000	Licht: 12% Matig: 88%
Transplantation Gene (in) activation interventions (ex vivo analysis)	Muis (WT, GGM en mutanten) Volwassenen	1650	Licht: 96% Matig <1 dag: 1% Matig continu: <3%
Transplantation Gene (in) activation interventions (in vivo imaging)	Muis (WT, GGM en mutanten)		

Datum

10-08-2015

Onze referentie

AVD801002015125

	Volwassenen	2800	Matig
Generation Welfare assessment and Breeding of GMM	Muis (WT en GGM) Volwassenen: Donoren Foster dieren GGO dieren Immuun deficiënte dieren Verklikkerdieren	2260	Matig Matig Geen: 99% Licht: 1% Geen Geen

Voorwaarden

Op grond van artikel 10a1 lid 2 Wet zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen

De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat daar waar er sprake is van overlap tussen de in deze vergunning vergunde dierproeven en eerder goedgekeurde DEC protocollen zullen de dieren en experimenten na het verlenen van de vergunning formeel onder deze vergunning gaan vallen, zoals de aanvrager in zijn brief van 24 juli 2015 ook heeft aangegeven. Hierdoor is er geen sprake meer van overlap.

In artikel 10, lid 1a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

Volgens artikel 10c van de Wet op de dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g. 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 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 onvermijdelijk 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.

Datum

10-08-2015

Onze referentie

AVD801002015125

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.