

Inventaris Wob-verzoek W17-07										
		wordt verstrekt				weigeringsgronden				
nr.	document NTS 2016788	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1	
1	Aanvraagformulier				x		x			
2	NTS initieel			x						
3	NTS aangepast	x								
4	Projectvoorstel			x						
5	bijlage dierproeven origineel			x						
6	bijlage dierproeven aangepast			x						
7	DEC advies				x		x			
8	Ontvangstbevestiging				x		x			
9	Mailwisseling aanvulling				x		x			
10	Advies CCD		x							x
11	Beschikking en vergunning				x		x			



21 DEC. 2016

Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

- U bent van plan om één of meerdere dierproeven uit te voeren.
- Met dit formulier vraagt u een vergunning aan voor het project dat u wilt uitvoeren. Of u geeft aan wat u in het vergunde project wilt wijzigen.
- Meer informatie over de voorwaarden vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl of in de toelichting op de website.
- Of 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 90700 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen																
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table border="0"> <tr> <td style="border-right: 1px dashed black; padding-right: 5px;">Naam instelling of organisatie</td> <td>InnoSer Laboratories BV</td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px dashed black; padding-right: 5px;">Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td> <td>[REDACTED]</td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px dashed black; padding-right: 5px;">KvK-nummer</td> <td>61886890</td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px dashed black; padding-right: 5px;">Straat en huisnummer</td> <td>Zernikedreef 9</td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px dashed black; padding-right: 5px;">Postbus</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px dashed black; padding-right: 5px;">Postcode en plaats</td> <td>2333CK Leiden</td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px dashed black; padding-right: 5px;">IBAN</td> <td>NL22ABNA0581547756</td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px dashed black; padding-right: 5px;">Tenaamstelling van het rekeningnummer</td> <td>InnoSer Laboratories</td> </tr> </table>	Naam instelling of organisatie	InnoSer Laboratories BV	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]	KvK-nummer	61886890	Straat en huisnummer	Zernikedreef 9	Postbus		Postcode en plaats	2333CK Leiden	IBAN	NL22ABNA0581547756	Tenaamstelling van het rekeningnummer	InnoSer Laboratories
Naam instelling of organisatie	InnoSer Laboratories BV																	
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]																	
KvK-nummer	61886890																	
Straat en huisnummer	Zernikedreef 9																	
Postbus																		
Postcode en plaats	2333CK Leiden																	
IBAN	NL22ABNA0581547756																	
Tenaamstelling van het rekeningnummer	InnoSer Laboratories																	
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="0"> <tr> <td style="border-right: 1px dashed black; padding-right: 5px;">(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 style="border-right: 1px dashed black; padding-right: 5px;">Functie</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px dashed black; padding-right: 5px;">Afdeling</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px dashed black; padding-right: 5px;">Telefoonnummer</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px dashed black; padding-right: 5px;">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	[REDACTED]		Afdeling			Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]		
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.																
Functie	[REDACTED]																	
Afdeling																		
Telefoonnummer	[REDACTED]																	
E-mailadres	[REDACTED]																	
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="0"> <tr> <td style="border-right: 1px dashed black; padding-right: 5px;">(Titel) Naam en voorletters</td> <td></td> <td style="text-align: right;"><input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px dashed black; padding-right: 5px;">Functie</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px dashed black; padding-right: 5px;">Afdeling</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px dashed black; padding-right: 5px;">Telefoonnummer</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px dashed black; padding-right: 5px;">E-mailadres</td> <td></td> <td></td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters		<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie			Afdeling			Telefoonnummer			E-mailadres			
(Titel) Naam en voorletters		<input 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 [REDACTED] Dhr. 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 - 2 - 2017
- Einddatum 31 - 1 - 2022
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Onderzoek naar de biodistributie van nieuwe, op oligonucleotiden gebaseerde, teststoffen voor de behandeling van zeer ernstige en zeldzame monogene aandoeningen.
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Onderzoek naar de biodistributie van nieuwe, op oligonucleotiden gebaseerde, teststoffen voor de behandeling van zeer ernstige en zeldzame monogene aandoeningen.
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC DEC RUG
- Postadres A. Deusinglaan 1, [REDACTED]
9713 AV GRONINGEN
- E-mailadres secrdec.umcg@umcg.nl

4 Betaalgegevens


- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 935 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 

Functie 

Plaats Leiden

Datum 16 - 12 - 2016

Handtekening 



Format

Niet-technische samenvatting

- Dit format gebruikt u om uw niet-technische samenvatting te schrijven
- Meer informatie over de niet-technische samenvatting vindt u op de website www.zbo-ccd.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

- 1.1 Titel van het project | Onderzoek naar de biodistributie van nieuwe, op oligonucleotiden gebaseerde, teststoffen voor de behandeling van zeer ernstige en zeldzame genetische aandoeningen.
- 1.2 Looptijd van het project | 5 jaar
- 1.3 Trefwoorden (maximaal 5) | Biodistributie, kinetiek, centraal zenuwstelsel, oogziekten, huidaandoeningen

2 Categorie van het project

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

3 Projectbeschrijving

3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)

Het doel van het huidige project is om antwoord te geven op de vraag waar onze oligonucleotiden terecht komen (en welke lokale concentratie) na enkele of herhaalde toediening en of we effecten zien op orgaan/cel-niveau, mogelijke afweer (immunogeniciteit) of giftigheid (toxiciteit) en of we daarin verschillen zien in het gebruik van verschillende formuleringen en/of toedieningswijzen bij de muis. Dit omdat de distributie en opname door doelwit organen en celtypen een uitdaging blijft en daarmee de translatie van in vitro en in silico (proof-of-concept) experimenten naar preklinische en klinische studies, het uiteindelijke doel is het ontwikkelen van nieuwe medicijnen.

3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?

We verwachten dat dit project bijdraagt aan (ofwel essentieel is voor) de ontwikkeling van nieuwe medicijnen naar verschillende centraal zenuwstelsel-, oog- en huidaandoeningen zoals: vorm van Alzheimer, ziekte van Huntington, Ataxie van Friedreich, Leber congenital amaurosis (LCA), Usher, Fuchs en Epidermolysis bullosa - allen zeer ernstige en zeldzame genetische aandoeningen. Ook proberen we antwoord te krijgen op de vraag waar de nieuwe therapeutische stoffen terechtkomen in het lichaam. Komen de oligonucleotiden in de hersenen, wat is de biobeschikbaarheid (plasmaconcentraties) bij die dosering en kunnen we dat verhogen door een andere manier van toediening te kiezen? Naar aanleiding van de uitkomsten van de experimenten kunnen we de medicijnen verder het ontwikkelingstraject in helpen en daarmee hopen we een bijdrage in de ontwikkeling van nieuwe medicijnen tegen deze ernstige ziekten te kunnen leveren.

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

1600 muizen, geslacht is ons geval niet van belang. Om te bepalen of de teststof op de juiste plek (orgaan niveau, celtype en intracellulaire lokalisatie) terecht komt na toediening, maar ook in welke lokale concentratie zijn diverse proefopzetten nodig.

Over het algemeen is een studie opgebouwd uit een aantal experimenten:

- 1: een enkele middel-hoge dosis (op basis van literatuur), gevolgd door lokalisatie, concentratie en halfwaarde bepaling van een aantal tijdstippen (bijv. 0u, 24u, 48u, 7d, 14d) in diverse (doel) weefsels. Ook zullen diverse bepalingen voor immunogeniciteit en toxiciteit worden gedaan;
- 2: Vervolgens wordt het experiment uitgevoerd door verschillende concentraties (laag, midden, hoog) teststof op het optimale tijdstip bepaald in (1) te doseren en als laatste wordt;
- 3: Het effect van herhaaldelijk doseren getest op basis van de uitkomsten van 1 en 2.

Voor concentratie/halfwaarde bepalingen en microscopische analyse is een minimale groepsgrootte van 3 muizen per tijdstip/dosering nodig (op basis van eerdere experimenten) en zijn controlegroepen essentieel (onbehandeld / placebo). Gemiddeld zal een experiment uit 30-40 muizen bestaan en zal met het huidige aantal ziektebeelden en capaciteit 4 studies per jaar uitgevoerd kunnen worden (160 muizen/jaar) – over een periode van 5 jaar zijn dit 800 muizen. Het exacte aantal muizen en de statistische onderbouwing (indien mogelijk) zal per experiment verschillen dan zal met de IvD afgestemd worden.

3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?

Het welzijn van de dieren wordt aangetast door het feit dat de dieren stoffen krijgen toegediend via verschillende toedieningstechnieken, evenals bloedafnames. Waar noodzakelijk wordt ongerief zoveel mogelijk beperkt door anesthesie toe te passen.

3.5 Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?

Matig

3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?

Dood in de proef

4 Drie V's

4.1 **Vervanging**

Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdier vrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.

Proefdier vrije alternatieven kunnen helaas niet worden gebruikt omdat we de biodistributie gegevens nodig hebben om verder het ontwikkeltraject te komen. Het gehele en intacte dier is noodzakelijk om de effecten van absorptie, distributie, metabolisme en excretie in kaart te brengen.

Voordat een teststof in dieren getest zal worden zijn er diverse zogenaamde "lead selection" studies uitgevoerd welke grofweg bestaan uit: (1) in silico en literatuur analyse voor effectiviteit, toxiciteit en immunogeniciteit van de teststof. (2) in vitro studies met humane (patiënten) primaire en cellijnen naar effectiviteit (vaststellen van een dose-response), toxiciteit en immunogeniciteit.

4.2 **Vermindering**

Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.

Er wordt altijd het minimale aantal dieren gebruikt dat nodig is om een uitspraak te kunnen doen over de biodistributie van de betreffende stof. We geven maximaal 40 per experiment op, maar zullen waarschijnlijk per stof met veel minder dieren toe kunnen. Deze aantallen zijn echter nodig om meerdere formuleringen en technieken toe te kunnen passen. Iedere wijziging zal daarnaast worden afgestemd met de IVD alvorens de proef verder uit te breiden.

4.3 **Verfijning**

Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen

De muis is bij uitstek geschikt, de muis is klein en eenvoudig te huisvesten en te hanteren. Daarnaast is er jarenlange ervaring met de muis, en zijn er bovendien voor een later stadium ook genetisch gemodificeerde modellen

[

diermodel(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.

beschikbaar welke een goed model zouden kunnen zijn voor een of meerdere ziektes waarin we geïnteresseerd zijn.

Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.

In het algemeen wordt het welzijn van de dieren zorgvuldig gemonitord, de dieren krijgen voldoende water, voer, beddingmateriaal en kooiverrijking. Bovendien worden de dieren gehanteerd door ervaren personen en indien noodzakelijk wordt anesthesie toegepast. We hopen hiermee de negatieve gevolgen voor de muis zoveel mogelijk te beperken en toch goede resultaten te verkrijgen.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf



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.zbo-ccd.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 gezondheid of het welzijn van mens of dier

Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort

Hoger onderwijs of opleiding

Forensisch onderzoek

Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

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

De aanleiding voor dit project is de vraag naar gegevens met betrekking tot de biodistributie van nieuwe therapeutische stoffen (oligonucleotiden) in verschillende formuleringen. Voorafgaand aan al het experimentele werk is de meeste recente literatuur en zijn de patentdatabases bestudeerd om vast te stellen dat de teststof daadwerkelijk 'nieuw' is en toepasbaar is als therapie. De aanvraag is opgezet om als een routinematige proef door een CRO uit te laten voeren, derhalve zien wij de aanvraag als een uit de categorie toegepast onderzoek.

In de ontwikkeling van nieuwe op oligonucleotiden gebaseerde medicijnen is het van belang dat we te weten komen waar de nieuwe therapeutische stoffen terecht komen op macroscopisch niveau (welke orgaan, gedeelte van orgaan), microscopisch (in welke cellen) en sub-cellulair (celkern of cytoplasma) – en wat zijn de (relatieve) lokale concentraties. Daarnaast is het van belang om de bio beschikbaarheid te bepalen (plasmaconcentraties) bij een bepaalde dosering en kunnen we dat verhogen door een andere manier van toediening of door een andere formulering?

Het geheel richt zich op meerdere zeldzame en zeer ernstige monogene aandoeningen van onder andere: centraal zenuwstelsel-, oog- en huid waar op dit moment nog geen goede therapie beschikbaar voor is. Het gaat hier om ziektes waarbij enkele of meerdere mutaties in een enkel gen de oorzaak zijn van de aandoening en daardoor dus in aanmerking komen voor een op oligonucleotiden gebaseerde platform technologie als therapie. Voor het centraal zenuwstelsel richten wij ons op een vorm van Alzheimer, ziekte van Huntington en Ataxie van Friedreich; voor oog richten wij ons op Leber congenital amaurosis (LCA), Usher en Fuchs; voor huid richten wij ons op Epidermolysis bullosa.

De nieuwe therapeutische stoffen zijn gebaseerd op oligonucleotiden platform technologie welke mechanismes als RNA modulatie of DNA editing

gebruikt met als doel een normaal functionerend eiwit tot expressie te laten brengen.

Antisense oligonucleotides (AONs) zijn een veelbelovende vorm van therapie. Echter, de distributie en opname door doelwit organen en celtypen blijft een uitdaging en daarmee de translatie van in vitro en in silico (proof-of-concept) experimenten naar preklinische en klinische studies. Bij in vitro studies gebruikmakende van primaire - patiënten en - muis cel lijnen wordt gebruik gemaakt van transfectie reagentia om de AONs in de cellen te krijgen en is een waardevolle en relatieve simpele methode om de beste kandidaten te selecteren. Deze reagentia zijn niet toepasbaar in vivo door de toxische effecten en daarom zijn er in vivo studies nodig om ook distributie en opname van de desbetreffende kandidaat te bepalen. Een recente en zeer uitgebreide review door Dr. Juliano geeft een goed overzicht over de verschillende chemische modificaties van oligonucleotides, het effect op de bio distributie en deze uitdagingen (1). Er zijn een diverse barrières met betrekking tot de opname van AONs door het doelwitweefsel: uitscheiding door de nieren, de bloed-retina / bloed-hersen barrière en het endotheel als barriere (na systemische toediening). Om deze hindernissen te overwinnen zijn er recentelijk diverse (klinische) successen geboekt voor neurologische en oog aandoeningen door gebruik te maken van (1) directe toediening in het brein d.m.v. intrathecale en intra-ventriculaire injecties (2–6) – en directe injectie in het corpus vitreum d.m.v. intravitreale injectie (7,8). (2) Uitscheiding door nieren is te verminderen door de binding van de AONs aan serum eiwitten (zoals BSA) te verhogen door gebruik te maken van chemische modificaties zoals de phosphorothioaat i.p.v. fosfaat ketens. Om AONs door de endotheel barrière te laten gaan kan gebruik gemaakt worden van zogenaamde lipide-particles en nanocarriers (9,10). Daarnaast kan zogenaamde 'target delivery' van doelwitweefsel/celtypen worden bereikt door gebruik te maken van de koppeling van specifieke receptor liganten aan de AONs.

De exacte beschrijving van het werkingsmechanisme wordt niet gegeven omdat dit een nieuwe en unieke uitvinding is welke momenteel (deels) valt onder internationaal patentrecht.

Referenties:

1. Juliano RL. *The delivery of therapeutic oligonucleotides. Nucleic Acids Res.* 2016;347(6228):gkw236.
2. Lagier-Tourenne C, Baughn M, Rigo F, Sun S, Liu P, Li H-R, et al. *Targeted degradation of sense and antisense C9orf72 RNA foci as therapy for ALS and frontotemporal degeneration. Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(47):E4530-9.
3. Ostergaard ME, Southwell AL, Kordasiewicz H, Watt AT, Skotte NH, Doty CN, et al. *Rational design of antisense oligonucleotides targeting single nucleotide polymorphisms for potent and allele selective suppression of mutant Huntingtin in the CNS. Nucleic Acids Res.* 2013;41(21):9634–50.
4. Kordasiewicz HB, Stanek LM, Wancewicz E V., Mazur C, McAlonis MM, Pytel KA, et al. *Sustained Therapeutic Reversal of Huntington's Disease by Transient Repression of Huntingtin Synthesis. Neuron.* 2012;74(6):1031–44.
5. Rigo F, Chun SJ, Norris D a, Hung G, Lee S, Matson J, et al. *Pharmacology of a central nervous system delivered 2'-O-methoxyethyl-modified survival of motor neuron splicing oligonucleotide in mice and nonhuman primates. J Pharmacol Exp Ther.* 2014;350(1):46–55.
6. Chiriboga CA, Swoboda KJ, Darras BT, Iannaccone ST, Montes J, De Vivo DC, et al. *Results from a phase 1 study of nusinersen (ISIS-SMNRx) in children with spinal muscular atrophy. Neurology.* 2016;86(10):890–7.
7. Hutcherson SL, Lanz R. *A randomized controlled clinical trial of intravitreal fomivirsen for treatment of newly diagnosed peripheral*

cytomegalovirus retinitis in patients with aids. Am J Ophthalmol. 2002;133(4):467–74.

8. *Gérard X, Perrault I, Munnich A, Kaplan J, Rozet J-M. Intravitreal Injection of Splice-switching Oligonucleotides to Manipulate Splicing in Retinal Cells. Mol Ther Acids. 2015;4(9):e250.*

9. *Zhao J, Feng S-S. Nanocarriers for delivery of siRNA and co-delivery of siRNA and other therapeutic agents. Nanomedicine (Lond). 2015;10(14):2199–228.*

10. *Lorenzer C, Dirin M, Winkler AM, Baumann V, Winkler J. Going beyond the liver: Progress and challenges of targeted delivery of siRNA therapeutics. J Control Release. 2015;203:1–15.*

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 doel van het huidige project is om antwoord te geven op de vraag waar onze teststof terecht komt (en welke lokale concentratie) na enkele of herhaalde toediening en of we effecten zien op orgaan/cel-niveau, mogelijke immunogeniciteit/toxiciteit en of we daarin verschillen zien in het gebruik van verschillende formuleringen en toedieningswijzen bij de muis.

3.3 Belang

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

Maatschappelijk bestaat er vraag naar de ontwikkeling van nieuwe medicijnen voor de ziektes onder 3.1. genoemd. Een onderdeel van de ontwikkeling bestaat uit het bekijken van de biodistributie van de potentieel nieuwe medicijnen in muizen. Dit is essentieel voordat er verder gegaan kan worden in het ontwikkelingstraject.

De huidige studie richt zich op de ontwikkeling van nieuwe medicijnen voor meerdere centrale zenuwstelsel-, oog/ en huidaandoeningen.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

Het project bestaat uit meerdere 'dezelfde' studies die dezelfde soort nieuwe oligonucleotiden op verschillende wijze in verschillende formuleringen testen. Effectiviteit en immunogeniciteit/toxiciteit van de oligonucleotiden wordt altijd eerst in vitro getest voordat er naar bio distributie gekeken wordt.

De opzet is algemeen gekozen omdat het therapeutische effect lokaal (CNS, oog, huid) verwacht wordt: voor centraal zenuwstelsel aandoeningen is het belangrijk dat de stof in de hersenen terecht komt en in de juiste cellen (bijv. neuronen). Dit zal een eerste opzet zijn, vervolgens (in hetzelfde experiment) zullen we willen testen welke lokale concentraties in het brein worden bereikt, of is er bijvoorbeeld een andere formulering

en/of, dosering regime en/of toediening rechtstreeks in de hersenen noodzakelijk?

Een soortgelijk opzet geldt ook voor onderzoek naar teststoffen voor oog en huid aandoeningen.

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

Het project bestaat uit een enkele studies die beoogt meerdere toedieningswijzen in verschillende formulering te testen om de biodistributie/kinetiek en immunogeniciteit van de nieuwe oligonucleotide stoffen in kaart te brengen.

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.

Er wordt onderzoek gedaan naar de biodistributie van dezelfde nieuwe oligonucleotide teststoffen voor meerdere aandoeningen. In principe zal de samenhang grotendeels als volgt zijn:

Eerst wordt er in diverse in vitro studies gekeken naar de effectiviteit van de teststoffen in cellijnen van patiënten en indien mogelijk ook van muismodellen. Vervolgens zal ook gekeken worden naar toxiciteit en immunogeniciteit van deze teststoffen.

Vervolgens wordt bepaald welke toedieningsmethode en formulering zich het beste leent voor de ontwikkeling (op basis van literatuur en andere eerdere studies). Aan de hand van de eerste resultaten in vivo wordt bekeken of een andere toedieningswijze en/of formulering noodzakelijk is, dat kan worden gebaseerd op de kinetiek van de stof, moleculair bewijs van effect of zichtbaar bewijs van de aanwezigheid van het molecuul zelf. Ook de resultaten van immunogeniciteit zijn van belang hier, dat wordt bepaald aan de hand van cytokines, flow cytometrische analyse en/of immunohistochemie.

Per aandoening kunnen specifieke toedieningswijzen noodzakelijk zijn; Bij het centraal zenuwstelsel kunnen de toedieningswijzen variëren van oraal tot bijvoorbeeld rechtstreeks in de hersenen m.b.v. een stereotact of intrathecaal; voor aandoeningen van het oog kan het noodzakelijk zijn om intravitreaal te injecteren en voor aandoeningen in de huid is bijvoorbeeld subcutaan of topicaal een geschikte toedieningswijze. Dat zal per experiment vooraf worden afgestemd met de IvD.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Biodistributie van nieuwe oligonucleotiden in de muis.
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.zbo-ccd.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 het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef |
|------------|--|
| 1 | Biodistributie van nieuwe oligonucleotiden in de muis. |

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Deze dierproef is noodzakelijk voor het onderzoeken van de biodistributie van nieuwe oligonucleotiden in de muis voor verschillende aandoeningen.

De dieren krijgen een gelabelde teststof een- of meermalig toegediend via een specifiek geselecteerde methode aan de hand van de verwachtingen van de formulering, en vervolgens wordt er een analyse gedaan naar de biodistributie van oligonucleotiden in de muis.

De uitleesparameters zijn als volgt:

- Hoeveelheid teststof in het plasma na toediening (PK)
- Macroscopische lokalisatie na toediening (hoeveelheid fluorescentie per orgaan).

- Cellulaire en nucleaire lokalisatie van de stof m.b.v. confocale microscopie
- Verder worden diverse immunologische parameters geanalyseerd, zoals cytokine bepalingen, flow cytometrie en immunohistochemie.

Indien we de gelabelde teststof niet kunnen lokaliseren na toediening is dit een duidelijke no-go. Er zijn diverse kwantitatieve (concentratie teststof) en semi-kwantitatieve (lokalisatie van teststof) uitleesparameters welke gebruikt kunnen worden voor statistische onderbouwing van de groepsgroottes. Uitkomsten van een pilot studie waarbij een enkele dosering van de teststof wordt gegeven en na diverse tijdstippen weefsels verzameld voor analyse (concentratie en lokalisatie) zal dienen als uitgangspunt voor de vervolg studies. Gegevens van ieder stadium van de dierproef worden gebruikt om het aantal dieren per groep te bepalen voor het volgende stadium. Deze aantallen zullen per experiment onderbouwd worden doormiddel van powercalculaties en vooraf met de IvD afgestemd worden. Over het algemeen worden voor een dergelijke studie ongeveer 40 dieren gebruikt en verwachten we 4 studies per jaar uit te voeren (160 dieren per jaar, 800 dieren in 5 jaar).

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

De behandeling van de dieren zal zijn: een of meerdere toedieningen van nieuwe oligonucleotiden in verschillende formuleringen via potentieel verschillende toedieningswijzen. Zoals geschreven kan per aandoening de toedieningswijze verschillen. Bij het centraal zenuwstelsel kunnen de toedieningswijzen uitstrekken van oraal tot bijvoorbeeld rechtstreeks in de hersenen m.b.v. een stereotact of intrathecaal; voor aandoeningen van het oog kan het noodzakelijk zijn om intravitreaal te injecteren en voor aandoeningen in de huid is bijvoorbeeld subcutaan of topicaal een goede toedieningswijze.

Voor de plasma analyses kan op meerdere dagen bloed worden afgenomen, dat kan na een of meerdere (dagen na) doseringen. Bij de terminale bloedafname onder anesthesie worden ook organen uitgenomen.

In onderstaande tabel worden de verschillende technieken benoemd.

Nr.	Aard	Duur	Frequentie	Ongeriefinschatting
	<u>Toedieningswijzen</u>			
1	IP injectie	1 min	<u>1-12</u>	<u>2</u>
2	Oraal doseren	1 min	<u>1-12</u>	<u>2</u>
3	IV injectie	2 min	<u>1-12</u>	<u>2</u>
4	Intranasaal doseren	1 min	<u>1-12</u>	<u>3</u>
5	IM injectie	1 min	<u>1-12</u>	<u>2</u>
6	Subcutaan injectie	1min	<u>1-12</u>	<u>2</u>
7	Topicale toediening	1min	<u>1-12</u>	<u>2</u>
8	Intravitreaal	1 min	<u>1</u>	<u>3</u>
9	Intracerebrale injecties	10 min	<u>1</u>	<u>3</u>
10	Intrathecale injecties	5 min	<u>1</u>	<u>3</u>
	<u>Afname technieken</u>			

11	Bloedafname (Wangplexus)	1 min	<u>1-4</u>	<u>2</u>
12	Bloedafname (Staartvene)	1 min	<u>1-4</u>	<u>2</u>
13	Terminale bloedafname onder anesthesie	1 min	<u>1</u>	<u>2</u>
	<u>Andere technieken</u>			
14	Huisvesten in metabolisme kooi	4 uur	<u>1-2</u>	<u>2</u>
15	Wegen	1 min	<u>1-28</u>	<u>2</u>

In bovenstaande tabel zal een eventuele toediening meerdere keren worden gedaan, in dit stadium van de ontwikkeling verwachten we maximaal 4 weken om de dag te doseren, maar dat zal lang niet altijd gelden. Intranasaal, intravitreaal, intracerebrale en intrathecale toediening zal onder anesthesie gebeuren, vandaar een hogere ongeriefinschatting. Het om de dag ip of iv injecteren met stoffen die een 'mild' effect hebben schatten we in als gering ongerief (zie hiervoor Directive 2010/63, annex VIII, sectie III, 1f).

Bloedafname volumes en frequenties zullen beperkt worden volgens Diehl et al 2001, er is rekening gehouden met 4 maal een bloedafname, waarbij gekozen wordt tussen de wang- of staarttechniek.

Terminale bloedafname kan gedaan worden enkele dagen of enkele weken na toediening.

Gemiddeld genomen is de halfwaardetijd van de nieuwe oligonucleotide in hersenen hoger dan in het oog en het oog weer hoger dan in de huid of andere organen.

De verwachte terminale bloedafnames zijn daarmee maximaal, 10, 6 en 4 weken na dosering voor respectievelijk CNS, oog en huid. In eerste instantie worden kortere tijdsperiodes ook meegenomen om een indicatie van de farmacokinetiek te krijgen.

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

Er is geen statistiek onderhevig aan de studie, dit hangt af per studie. Bij de meeste bio distributiestudies is de uitkomst: 'komt de teststof op de plaats van bestemming terecht (intranuclear)' niet kwantitatief en is het eerder een kwestie of het te detecteren is in het desbetreffende orgaan, celtype, en subcellulaire locatie.

Voor concentratie/halfwaarde bepalingen en microscopische analyse is een minimale groepsgrootte van 3 muizen per tijdspunt/dosering nodig (op basis van eerdere experimenten) en zijn controlegroepen essentieel (onbehandeld / placebo).

B. De dieren

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

De muis zal waar mogelijk uit eigen fok zijn, wildtypes (C57Black6/J) waar geen experiment mee gedaan kan worden, of ze zullen worden besteld bij een erkende leverancier. Daarnaast kan ook gebruik gemaakt worden van CAG-EGFP654 muizen, deze muizen zijn genetisch gemodificeerd en brengen eGFP, met daarin een alternatieve splice site, in iedere cel tot expressie. Een specifieke oligonucleotide sequentie kan deze splice site blokkeren en dit resulteert in de aanmaak van het, gemakkelijk te meten, fluorescente eiwit eGFP. Op deze manier kan er naast biodistributie ook de effectiviteit (dose-response) van een specifieke oligo eenvoudig bestudeerd worden.

De CAG-EGFP654 muizen ondervinden geen intrinsiek ongerief door de aangebrachte modificatie.

De muizen zullen over het algemeen als jong volwassen-volwassen worden gebruikt, gemiddeld zal een experiment uit 30-40 muizen bestaan en zal met het huidige aantal ziektebeelden en capaciteit 4 studies per jaar uitgevoerd kunnen worden (160 muizen/jaar) – over een periode van 5 jaar zijn dit 800 muizen.

Het exacte aantal muizen en de statistische onderbouwing (indien mogelijk) zal per experiment verschillen en zal met de IvD afgestemd worden. De sexe is niet van groot belang, in voorkomende gevallen zullen we beide gebruiken, indien er een sexe gekozen wordt zal dit worden afgestemd en met redenen omkleed met de IvD, indien agressiviteit optreedt zal de voorkeur uitgaan naar vrouwen omdat die minder vechten.

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 welk keuzes daarbij zijn gemaakt.

Proefdier vrije alternatieven kunnen helaas niet worden gebruikt omdat we de biodistributie gegevens nodig hebben om verder het ontwikkeltraject tot een medicijn te komen. Het gehele en intacte dier is noodzakelijk om de effecten van absorptie, distributie, metabolisme en excretie van de oligonucleotiden in kaart te brengen.

Voordat een teststof in dieren getest zal worden zijn er diverse zogenaamde “lead selection” studies uitgevoerd welke grofweg bestaan uit:

1: *in silico* en literatuur analyse voor effectiviteit, toxiciteit en immunogeniciteit van de teststof;

2: *in vitro* studies met humane (patiënten) primaire en cellijnen naar effectiviteit (vaststellen van een dose-response), toxiciteit en immunogeniciteit.

Er wordt altijd het minimale aantal dieren gebruikt dat nodig is om een uitspraak te kunnen doen over de biodistributie van de betreffende stof. We geven maximaal 40 per experiment op, maar zullen waarschijnlijk per stof met veel minder dieren toe kunnen. Deze aantallen zijn echter nodig om meerdere formuleringen en technieken toe te kunnen passen. Iedere wijziging zal daarnaast worden afgestemd met de IVD alvorens de proef verder uit te breiden.

Qua monitoring zal van de dieren worden bijgehouden hoeveel bloed er is afgenomen en er geen maximale waarden (Diehl et al., 2001) worden overschreden. Met betrekking tot de experimenten wordt er zoveel mogelijk data gehaald uit een individuele muis en naar aanleiding van de resultaten wordt pas, na afstemming met de IvD, een volgende stap in het project genomen, en wordt er bijvoorbeeld een andere formulering of

toedieningswijze gekozen.

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.

Alle dieren beschikken over voldoende voer, water, rust, en kooiverrijking, ook zullen de personen betrokken bij de studie bekwaam (en bevoegd) zijn. Gezien de werking van de nieuwe oligonucleotide verwachten we geen toxische effecten, pijn, lijden of angst, ook de formuleringen zullen dusdanig gekozen worden dat we hiervan geen negatieve effecten op het dierenwelzijn verwachten.

Injectietechnieken worden waar nodig uitgevoerd onder anesthesie.

We verwachten geen nadelige milieueffecten.

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.

Deze dierproef is nieuw en/of noodzakelijk voor het in kaart brengen van de biodistributie van nieuwe oligonucleotiden, dit bepaalt mede het succes waarmee het medicijn al dan niet kan worden ontwikkeld.

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

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.

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?

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.

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.

Sommige injectietechnieken die vrij invasief zijn en waarbij het standaard is dat er anesthesie wordt toegepast zullen onder Isofluraan worden uitgevoerd om de dieren zo min mogelijk stress te laten ervaren, de stress zal hierbij bestaan uit het bijkomen uit de anesthesie, dat schatten wij in als matig.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Geen

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

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

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.

Het kan voorkomen na een aantal injecties dat een muis irritaties krijgt, omdat het standaard technieken zijn verwachten we dat dit vrijwel niet zal voorkomen. Bijzondere of ingrijpende technieken worden maximaal eenmaal uitgevoerd. We zullen de code of practice welzijnsbewaking en interne procedures aanhouden.

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

<1%

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.

Cumulatief wordt het ongerief ingeschat als matig, ingegeven door de meervoudige doseringen en het eventueel meervoudig bijkomen uit

anesthesie, er worden geen toxische effecten van de nieuwe oligonucleotiden verwacht (hiervoor wordt specifiek in vitro gescreend).
De standaard code of practice dierenwelzijnsbewaking wordt altijd aangehouden.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

Het doden van de dieren is onderdeel van het experiment omdat er organen worden afgenomen voor analyses.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja

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.zbo-ccd.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 het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef |
|------------|--|
| 1 | Biodistributie van nieuwe oligonucleotiden in de muis. |

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Deze dierproef is noodzakelijk voor het onderzoeken van de biodistributie van nieuwe oligonucleotiden in de muis voor verschillende aandoeningen.

De dieren krijgen een gelabelde teststof een- of meermalig toegediend via een specifiek geselecteerde methode aan de hand van de verwachtingen van de formulering, en vervolgens wordt er een analyse gedaan naar de biodistributie van oligonucleotiden in de muis.

De uitleesparameters zijn als volgt:

- Hoeveelheid teststof in het plasma na toediening (PK)
- Macroscopische lokalisatie na toediening (hoeveelheid fluorescentie per orgaan).

- Cellulaire en nucleaire lokalisatie van de stof m.b.v. confocale microscopie
- Verder worden diverse immunologische parameters geanalyseerd, zoals cytokine bepalingen, flow cytometrie en immunohistochemie.

Indien we de gelabelde teststof niet kunnen lokaliseren na toediening is dit een duidelijke no-go. Er zijn diverse kwantitatieve (concentratie teststof) en semi-kwantitatieve (lokalisatie van teststof) uitleesparameters welke gebruikt kunnen worden voor statistische onderbouwing van de groepsgroottes. Uitkomsten van een pilot studie waarbij een enkele dosering van de teststof wordt gegeven en na diverse tijdspunten weefsels verzameld voor analyse (concentratie en lokalisatie) zal dienen als uitgangspunt voor de vervolg studies. Gegevens van ieder stadium van de dierproef worden gebruikt om het aantal dieren per groep te bepalen voor het volgende stadium. Deze aantallen zullen per experiment onderbouwd worden doormiddel van powercalculaties en vooraf met de IvD afgestemd worden. Over het algemeen worden voor een dergelijke studie ongeveer 40 dieren gebruikt en verwachten we 4 studies per jaar uit te voeren (160 dieren per jaar, 800 dieren in 5 jaar).

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

De behandeling van de dieren zal zijn: een of meerdere toedieningen van nieuwe oligonucleotiden in verschillende formuleringen via potentieel verschillende toedieningswijzen. Zoals geschreven kan per aandoening de toedieningswijze verschillen. Bij het centraal zenuwstelsel kunnen de toedieningswijzen uitstrekken van oraal tot bijvoorbeeld rechtstreeks in de hersenen m.b.v. een stereotact of intrathecaal; voor aandoeningen van het oog kan het noodzakelijk zijn om intravitreaal te injecteren en voor aandoeningen in de huid is bijvoorbeeld subcutaan of topicaal een goede toedieningswijze.

Voor de plasma analyses kan op meerdere dagen bloed worden afgenomen, dat kan na een of meerdere (dagen na) doseringen. Bij de terminale bloedafname onder anesthesie worden ook organen uitgenomen.

In onderstaande tabel worden de verschillende technieken benoemd.

Nr.	Aard	Duur	Frequentie	Ongeriefinschatting
	<u>Toedieningswijzen</u>			
1	IP injectie	1 min	<u>1-12</u>	<u>2</u>
2	Oraal doseren	1 min	<u>1-12</u>	<u>2</u>
3	IV injectie	2 min	<u>1-12</u>	<u>2</u>
4	Intranasaal doseren	1 min	<u>1-12</u>	<u>3</u>
5	IM injectie	1 min	<u>1-12</u>	<u>2</u>
6	Subcutaan injectie	1min	<u>1-12</u>	<u>2</u>
7	Topicale toediening	1min	<u>1-12</u>	<u>2</u>
8	Intravitreaal	1 min	<u>1</u>	<u>3</u>
9	Intracerebrale injecties	3 min	<u>1</u>	<u>3</u>
10	Intrathecale injecties	3 min	<u>1</u>	<u>3</u>
	<u>Afname technieken</u>			

11	Bloedafname (Wangplexus)	1 min	<u>1-4</u>	<u>2</u>
12	Bloedafname (Staartvene)	1 min	<u>1-4</u>	<u>2</u>
13	Terminale bloedafname onder anesthesie	1 min	<u>1</u>	<u>2</u>
	<u>Andere technieken</u>			
14	Huisvesten in metabolisme kooi	4 uur	<u>1-2</u>	<u>2</u>
15	Wegen	1 min	<u>1-28</u>	<u>2</u>

In bovenstaande tabel zal een eventuele toediening meerdere keren worden gedaan, in dit stadium van de ontwikkeling verwachten we maximaal 4 weken om de dag te doseren, maar dat zal lang niet altijd gelden. Intranasaal, intravitreaal, intracerebrale en intrathecale toediening zal onder anesthesie gebeuren, vandaar een hogere ongeriefinschatting. Het om de dag ip of iv injecteren met stoffen die een 'mild' effect hebben schatten we in als gering ongerief (zie hiervoor Directive 2010/63, annex VIII, sectie III, 1f).

Bloedafname volumes en frequenties zullen beperkt worden volgens Diehl et al 2001, er is rekening gehouden met 4 maal een bloedafname, waarbij gekozen wordt tussen de wang- of staarttechniek.

Terminale bloedafname kan gedaan worden enkele dagen of enkele weken na toediening.

Gemiddeld genomen is de halfwaardetijd van de nieuwe oligonucleotide in hersenen hoger dan in het oog en het oog weer hoger dan in de huid of andere organen.

De verwachte terminale bloedafnames zijn daarmee maximaal, 10, 6 en 4 weken na dosering voor respectievelijk CNS, oog en huid. In eerste instantie worden kortere tijdsperiodes ook meegenomen om een indicatie van de farmacokinetiek te krijgen.

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

Er is geen statistiek onderhevig aan de studie, dit hangt af per studie. Bij de meeste bio distributiestudies is de uitkomst: 'komt de teststof op de plaats van bestemming terecht (intranuclear)' niet kwantitatief en is het eerder een kwestie of het te detecteren is in het desbetreffende orgaan, celtype, en subcellulaire locatie.

Voor concentratie/halfwaarde bepalingen en microscopische analyse is een minimale groepsgrootte van 3 muizen per tijdstip/dosering nodig (op basis van eerdere experimenten) en zijn controlegroepen essentieel (onbehandeld / placebo).

B. De dieren

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

De muis zal waar mogelijk uit eigen fok zijn, wildtypes (C57Black6/J) uit bijvoorbeeld een (andere) heterozygote fok waar dat moment geen experiment mee gedaan kan worden, of ze zullen worden besteld bij een erkende leverancier. Daarnaast kan ook gebruik gemaakt worden van CAG-EGFP654 muizen, deze muizen zijn genetisch gemodificeerd en brengen eGFP, met daarin een alternatieve splice site, in iedere cel tot expressie. Een specifieke oligonucleotide sequentie kan deze splice site blokkeren en dit resulteert in de aanmaak van het, gemakkelijk te meten, fluorescente eiwit eGFP. Op deze manier kan er naast biodistributie ook de effectiviteit (dose-response) van een specifieke oligo eenvoudig bestudeerd worden.

De CAG-EGFP654 muizen ondervinden geen intrinsiek ongerief door de aangebrachte modificatie.

De muizen zullen over het algemeen als jong volwassen-volwassen worden gebruikt, gemiddeld zal een experiment uit 30-40 muizen bestaan en zal met het huidige aantal ziektebeelden en capaciteit 4 studies per jaar uitgevoerd kunnen worden (160 muizen/jaar) – over een periode van 5 jaar zijn dit 800 muizen.

Het exacte aantal muizen en de statistische onderbouwing (indien mogelijk) zal per experiment verschillen en zal met de IvD afgestemd worden.

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.

Proefdiervrije alternatieven kunnen helaas niet worden gebruikt omdat we de biodistributie gegevens nodig hebben om verder het ontwikkeltraject tot een medicijn te komen. Het gehele en intacte dier is noodzakelijk om de effecten van absorptie, distributie, metabolisme en excretie van de oligonucleotiden in kaart te brengen.

Voordat een teststof in dieren getest zal worden zijn er diverse zogenaamde “lead selection” studies uitgevoerd welke grofweg bestaan uit:

1: *in silico* en literatuur analyse voor effectiviteit, toxiciteit en immunogeniciteit van de teststof;

2: *in vitro* studies met humane (patiënten) primaire en cellijnen naar effectiviteit (vaststellen van een dose-response), toxiciteit en immunogeniciteit.

Er wordt altijd het minimale aantal dieren gebruikt dat nodig is om een uitspraak te kunnen doen over de biodistributie van de betreffende stof. We geven maximaal 40 per experiment op, maar zullen waarschijnlijk per stof met veel minder dieren toe kunnen. Deze aantallen zijn echter nodig om meerdere formuleringen en technieken toe te kunnen passen. Iedere wijziging zal daarnaast worden afgestemd met de IVD alvorens de proef verder uit te breiden.

Qua monitoring zal van de dieren worden bijgehouden hoeveel bloed er is afgenomen en er geen maximale waarden (Diehl et al., 2001) worden overschreden. Met betrekking tot de experimenten wordt er zoveel mogelijk data gehaald uit een individuele muis en naar aanleiding van de resultaten wordt pas, na afstemming met de IvD, een volgende stap in het project genomen, en wordt er bijvoorbeeld een andere formulering of toedieningswijze gekozen.

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.

Alle dieren beschikken over voldoende voer, water, rust, en kooiverrijking, ook zullen de personen betrokken bij de studie bekwaam (en bevoegd) zijn. Gezien de werking van de nieuwe oligonucleotide verwachten we geen toxische effecten, pijn, lijden of angst, ook de formuleringen zullen dusdanig gekozen worden dat we hiervan geen negatieve effecten op het dierenwelzijn verwachten.

Injectietechnieken worden waar nodig uitgevoerd onder anesthesie.

We verwachten geen nadelige milieueffecten.

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.

Deze dierproef is nieuw en/of noodzakelijk voor het in kaart brengen van de biodistributie van nieuwe oligonucleotiden, dit bepaalt mede het succes waarmee het medicijn al dan niet kan worden ontwikkeld.

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

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.

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?

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.

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.

Sommige injectietechnieken die vrij invasief zijn en waarbij het standaard is dat er anesthesie wordt toegepast zullen onder Isofluraan worden uitgevoerd om de dieren zo min mogelijk stress te laten ervaren, de stress zal hierbij bestaan uit het bijkomen uit de anesthesie, dat schatten wij in als matig.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Geen

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

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

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.

Het kan voorkomen na een aantal injecties dat een muis irritaties krijgt, omdat het standaard technieken zijn verwachten we dat dit vrijwel niet zal voorkomen. Bijzondere of ingrijpende technieken worden maximaal eenmaal uitgevoerd. We zullen de code of practice welzijnsbewaking en interne procedures aanhouden.

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

<1%

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.

Cumulatief wordt het ongerief ingeschat als matig, ingegeven door de meervoudige doseringen en het eventueel meervoudig bijkomen uit anesthesie, er worden geen toxische effecten van de nieuwe oligonucleotiden verwacht (hiervoor wordt specifiek in vitro gescreend).

De standaard code of practice dierenwelzijnsbewaking wordt altijd aangehouden.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

Het doden van de dieren is onderdeel van het experiment omdat er organen worden afgenomen voor analyses.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja

Format DEC-advies

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

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

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: Interne RUG code **8072**
 2. Titel van het project: **Onderzoek naar de biodistributie van nieuwe, op oligonucleotiden gebaseerde, teststoffen voor de behandeling van zeer ernstige en zeldzame monogene aandoeningen.**
 3. Titel van de NTS: **Onderzoek naar de biodistributie van nieuwe, op oligonucleotiden gebaseerde, teststoffen voor de behandeling van zeer ernstige en zeldzame genetische aandoeningen.**
 4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning**
 5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: **DEC-RUG**
 - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
 - e-mailadres contactpersoon: [REDACTED]
 6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: **05-10-2016**
 - aanvraag compleet: **05-10-2016**
 - in vergadering besproken: **17-10-2016**
 - anderszins behandeld: **06-12-2016**
 - termijnonderbreking(en) van / tot: **17-10-2016 tot 17-11-2016 en 06-12-2016 tot**
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen: **n.v.t.**
 - aanpassing aanvraag: **17-11-2016, -12-2016**
 - advies aan CCD: **13-12-2016**
 7. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.
De IvD heeft aangegeven dat de aanvraag met de IvD is afgestemd.
- Bij de punten 8 t/m 10 kan worden volstaan met 'n.v.t.' wanneer de betreffende acties niet aan de orde zijn geweest.*
8. Eventueel horen van aanvrager: **n.v.t.**
 - Datum
 - Plaats
 - Aantal aanwezige DEC-leden
 - Aanwezige (namens) aanvrager
 - Gestelde vraag / vragen
 - Verstrekt(e) antwoord(en)

- Het horen van de aanvrager heeft wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag

9. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: **17-10-2016**

Gestelde vraag/opmerking:

1/Er bestaat een ruime hoeveelheid wetenschappelijke literatuur over de potentie van oligonucleotiden als potentiële therapie. Waarom deze informatie volledig ontbreekt in deze aanvraag is onduidelijk. Er is ook zeer veel literatuur over de farmacokinetiek en de distributie van oligonucleotiden over organen. Ook hierover is niets te vinden in aanvraag.

2/Over het ongerief: wat is het ongerief van 28 opeenvolgende i.p. injecties en de andere voorgestelde invasieve methoden?

3/Onder A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters, de statistiek: een opgevoerd criterium is of een stof te detecteren is ja of nee. Dit zou beter onderbouwd moeten worden. Waarom er 40 dieren in een studie worden gebruikt is niet navolgbaar. Wanneer is iets gedetecteerd? Welke criteria worden daarvoor gebruikt? Deze vraag kwam ook naar voren in het IvD afstemmingsdocument en is niet beantwoord. Onder 'B. de dieren': hier wordt een methode geïntroduceerd hoe bio-distributie wordt gemeten. Dit hoort bij 'experimentele aanpak', bij het kopje "dieren" wordt andere informatie gevraagd. Het opgevoerde aantal van 1600 dieren lijkt de capaciteit weer te geven, maar niet het werkelijk aantal benodigde dieren.

4/ De 3V's zijn slecht uitgewerkt (dit is in de NTS al een stuk beter). Dit is ook aangegeven in het IvD afstemmingsdocument.

Datum antwoord: **17-11-2016**

- Verstrek(e) antwoord(en):

1/Toegevoegd onder 3.1: Antisense oligonucleotides (AONs) zijn een veelbelovende vorm van therapie. Echter, de distributie en opname door doelwit organen en celtypen blijft een uitdaging en daarmee de translatie van in vitro en in silico (proof-of-concept) experimenten naar preklinische en klinische studies. Bij in vitro studies gebruikmakende van primaire - patiënten en - muis cel lijnen wordt gebruik gemaakt van transfectie reagentia om de AONs in de cellen te krijgen en is een waardevolle en relatieve simpele methode om de beste kandidaten te selecteren. Deze reagentia zijn niet toepasbaar in vivo door de toxische effecten en daarom zijn er in vivo studies nodig om ook distributie en opname van de desbetreffende kandidaat te bepalen.

Een recente en zeer uitgebreide review door Dr. Juliano geeft een goed overzicht over de verschillende chemische modificaties van oligonucleotides, het effect op de bio distributie en deze uitdagingen (1). Er zijn een diverse barrières met betrekking tot de opname van AONs door het doelwitweefsel: uitscheiding door de nieren, de bloed-retina / bloed-hersen barrière en het endotheel als barriere (na systemische toediening). Om deze hindernissen te overwinnen zijn er recentelijk diverse (klinische) successen geboekt voor neurologische en oog aandoeningen door gebruik te maken van (1) directe toediening in het brein d.m.v. intrathecale en intra-ventriculaire injecties (2-6) – en directe injectie in het corpus vitreum d.m.v. intravitreale injectie (7,8). (2) Uitscheiding door nieren is te verminderen door de binding van de AONs aan serum eiwitten (zoals BSA) te verhogen door gebruik te maken van chemische modificaties zoals de phosphorothioaat i.p.v. fosphaat ketens. Om AONs door de endotheel barrière te laten gaan kan gebruik gemaakt worden van zogenaamde lipide-particles en nanocarriers (9,10). Daarnaast kan zogenaamde 'target delivery' van doelwitweefsel/celtypen worden bereikt door gebruik te maken van de koppeling van specifieke receptor liganten aan de AONs.

Referenties

1. Juliano RL. *The delivery of therapeutic oligonucleotides*. *Nucleic Acids Res.* 2016;347(6228):gkw236.
2. Lagier-Tourenne C, Baughn M, Rigo F, Sun S, Liu P, Li H-R, et al. *Targeted degradation of sense and antisense C9orf72 RNA foci as therapy for ALS and frontotemporal degeneration*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(47):E4530-9.
3. Ostergaard ME, Southwell AL, Kordasiewicz H, Watt AT, Skotte NH, Doty CN, et al. *Rational design of antisense oligonucleotides targeting single nucleotide polymorphisms for potent and allele selective suppression of mutant*

Huntingtin in the CNS. Nucleic Acids Res. 2013;41(21):9634–50.

4. *Kordasiewicz HB, Stanek LM, Wancewicz E V., Mazur C, McAlonis MM, Pytel KA, et al. Sustained Therapeutic Reversal of Huntington's Disease by Transient Repression of Huntingtin Synthesis. Neuron. 2012;74(6):1031–44.*

5. *Rigo F, Chun SJ, Norris D a, Hung G, Lee S, Matson J, et al. Pharmacology of a central nervous system delivered 2'-O-methoxyethyl-modified survival of motor neuron splicing oligonucleotide in mice and nonhuman primates. J Pharmacol Exp Ther. 2014;350(1):46–55.*

6. *Chiriboga CA, Swoboda KJ, Darras BT, Iannaccone ST, Montes J, De Vivo DC, et al. Results from a phase 1 study of nusinersen (ISIS-SMNRx) in children with spinal muscular atrophy. Neurology. 2016;86(10):890–7.*

7. *Hutcherson SL, Lanz R. A randomized controlled clinical trial of intravitreal fomivirsen for treatment of newly diagnosed peripheral cytomegalovirus retinitis in patients with aids. Am J Ophthalmol. 2002;133(4):467–74.*

8. *Gérard X, Perrault I, Munnich A, Kaplan J, Rozet J-M. Intravitreal Injection of Splice-switching Oligonucleotides to Manipulate Splicing in Retinal Cells. Mol Ther Acids. 2015;4(9):e250.*

9. *Zhao J, Feng S-S. Nanocarriers for delivery of siRNA and co-delivery of siRNA and other therapeutic agents. Nanomedicine (Lond). 2015;10(14):2199–228.*

10. *Lorenzer C, Dirin M, Winkler AM, Baumann V, Winkler J. Going beyond the liver: Progress and challenges of targeted delivery of siRNA therapeutics. J Control Release. 2015;203:1–15.*

2/ Na interne evaluatie hebben we hier maximaal om de dag met een maximaal aantal van 12 injecties. De overige zaken zijn ook bekeken en her en der iets aangepast naar 'minder'. Het ongerief schatten we in als gering, deze tekst is bijgevoegd: In bovenstaande tabel zal een eventuele toediening meerdere keren worden gedaan, in dit stadium van de ontwikkeling verwachten we maximaal 4 weken om de dag te doseren, maar dat zal lang niet altijd gelden. Intranasaal, intravitreaal, intracerebrale en intrathecale toediening zal onder anesthesie gebeuren, vandaar een hogere ongeriefinschatting. Het om de dag ip of iv injecteren met stoffen die een 'mild' effect hebben schatten we in als gering ongerief (zie hiervoor Directive 2010/63, annex VIII, sectie III, 1f).

3/ Onder A is de tekst aangepast naar: Deze dierproef is noodzakelijk voor het onderzoeken van de biodistributie van nieuwe oligonucleotiden in de muis voor verschillende aandoeeningen. De dieren krijgen een gelabelde teststof een- of meermalig toegediend via een specifiek geselecteerde methode aan de hand van de verwachtingen van de formulering, en vervolgens wordt er een analyse gedaan naar de biodistributie van oligonucleotiden in de muis. De uitleesparameters zijn als volgt:

-Hoeveelheid teststof in het plasma na toediening (PK)- Macroscopische lokalisatie na toediening (hoeveelheid fluorescentie per orgaan).

-Cellulaire en nucleaire lokalisatie van de stof m.b.v. confocale microscopie

- Verder worden diverse immunologische parameters geanalyseerd, zoals cytokine bepalingen, flow cytometrie en immunohistochemie. Indien we de gelabelde teststof niet kunnen lokaliseren na toediening is dit een duidelijke no-go. Er zijn diverse kwantitatieve (concentratie teststof) en semi-kwantitatieve (lokalisatie van teststof) uitleesparameters welke gebruikt kunnen worden voor statistische onderbouwing van de groeps groottes. Uitkomsten van een pilot studie waarbij een enkele dosering van de teststof wordt gegeven en na diverse tijdstippen weefsels verzameld voor analyse (concentratie en lokalisatie) zal dienen als uitgangspunt voor de vervolg studies. Gegevens van ieder stadium van de dierproef worden gebruikt om het aantal dieren per groep te bepalen voor het volgende stadium. Deze aantallen zullen per experiment onderbouwd worden doormiddel van powercalculaties en vooraf met de IvD afgestemd worden. Over het algemeen worden voor een dergelijke studie ongeveer 40 dieren gebruikt en verwachten we 4 studies per jaar uit te voeren (160 dieren per jaar, 800 dieren in 5 jaar).

4/ De 3V's zijn beter uitgewerkt, onder D staat nu als volgt beschreven: Proefdiervrije alternatieven kunnen helaas niet worden gebruikt omdat we de biodistributie gegevens nodig hebben om verder het ontwikkeltraject tot een medicijn te komen. Het gehele en intacte dier is noodzakelijk om de effecten van absorptie, distributie, metabolisme en excretie van de oligonucleotiden in kaart te brengen.

Voordat een teststof in dieren getest zal worden zijn er diverse zogenaamde "lead selection" studies uitgevoerd welke grofweg bestaan uit: 1: in silico en literatuur analyse voor effectiviteit, toxiciteit en immunogeniciteit van de teststof; 2: in vitro studies met humane (patiënten) primaire en cellijnen naar effectiviteit (vaststellen van een dose-response), toxiciteit en immunogeniciteit. Er wordt altijd het minimale aantal dieren gebruikt dat nodig is om een uitspraak te kunnen doen over de biodistributie van de betreffende stof. We geven maximaal 40 per experiment op, maar zullen waarschijnlijk per stof met veel minder dieren toe kunnen. Deze aantallen zijn echter nodig om meerdere formuleringen en

technieken toe te kunnen passen. Iedere wijziging zal daarnaast worden afgestemd met de IVD alvorens de proef verder uit te breiden. Qua monitoring zal van de dieren worden bijgehouden hoeveel bloed er is afgenomen en er geen maximale waarden (Diehl et al., 2001) worden overschreden. Met betrekking tot de experimenten wordt er zoveel mogelijk data gehaald uit een individuele muis en naar aanleiding van de resultaten wordt pas, na afstemming met de IVD, een volgende stap in het project genomen, en wordt er bijvoorbeeld een andere formulering of toedieningswijze gekozen.

- **De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag**

10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC): **n.v.t.**

- Aard expertise
- Deskundigheid expert
- Datum verzoek
- Strekking van het verzoek
- Datum expert advies
- Advies expert

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Is het project vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)? **Ja**
2. Indien van toepassing, licht toe waarom het project niet vergunningplichtig is en of daar discussie over geweest is.
Indien niet vergunningplichtig, ga verder met onderdeel E. Advies.
3. De aanvraag betreft een **nieuwe aanvraag**
4. Is de DEC competent om hierover te adviseren? **Ja**
5. Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom. **n.v.t.**

C. Beoordeling (inhoud)

1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft (*Zie handreiking 'Invulling definitie project'; zie bijlage I voor toelichting en voorbeeld*).

Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een CRO-project. De DEC vertrouwt erop dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. De DEC is van mening dat de aanvraag toetsbaar is als CRO-project.

2. Signaleer of er mogelijk tegenstrijdige wetgeving is die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan. Het gaat hier om wetgeving die gericht is op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort (bijvoorbeeld Wet dieren en Flora- en faunawet).

Niet tot de taken van de DEC behorend overeenkomstig de WoD.

3. Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën)

aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Nevendoelstellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel. **De doelcategorie sluit aan bij de hoofddoelstelling.**

Belangen en waarden

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen. Beoordeel of het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C4; zie bijlage I voor voorbeeld*).

Het directe doel is het bepalen van de biodistributie van verschillende formuleringen en toedieningsvormen van oligonucleotiden in vivo. Het uiteindelijke doel is te komen tot betere behandelingen van (zeldzame) monogene aandoeningen van onder andere centraal zenuwstelsel-, oog- en huid waarbij het gaat om ziektes waarbij enkele of meerdere mutaties in een enkel gen de oorzaak zijn van de aandoening. Deze ziektes komen in aanmerking voor een op oligonucleotiden gebaseerde platform technologie als therapie. Er is geen directe en reële relatie tussen het directe en uiteindelijke doel temeer daar het een CRO-project betreft. Het uiteindelijke doel zal niet binnen de looptijd van het project gehaald worden. Het project is gericht op het bepalen van de biodistributie van verschillende formuleringen en toedieningsvormen van oligonucleotiden in vivo. Deze informatie is essentieel in het bepalen van de strategie voor verdere ontwikkeling van, op oligonucleotiden gebaseerde, therapie. De aanvrager heeft duidelijk gemaakt wat dit project kan bijdragen aan de ontwikkeling van therapie van ziektes t.g.v. gen mutaties middels oligonucleotiden: het directe doel is dus gerechtvaardigd binnen de context van het onderzoeksveld.

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

De belangrijkste belanghebbenden in dit translationele project, wat gericht is op het onderzoek naar zeldzame monogene aandoeningen waar geen effectieve behandeling voor is, zijn de proefdieren, en de doelgroep/patiënt en diens naasten.

Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: de integriteit van de dieren zal worden aangetast, de dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en ongerief ondergaan.

Waarden die voor patiënten bevorderd worden: de gezondheid van patiënten kan verbeterd worden. Hierdoor kan de kwaliteit van leven verbeterd worden van patiënten en van hun naasten.

6. Geef aan of er sprake kan zijn van substantiële milieueffecten. Zo ja, benoem deze, leg uit waarom daar sprake van kan zijn en geef aan of deze effecten afgedekt worden door specifieke wet- en regelgeving op het gebied van het omgaan met voor het milieu risicovolle stoffen of organismen.
Niet tot de taken van de DEC behorend overeenkomstig de WoD.

Proefopzet en haalbaarheid

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij

de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw beoordeling toe. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C5*). **Voor zover de DEC kan beoordelen zijn de kennis en kunde van de onderzoeksgroep adequaat gezien de wetenschappelijke output alsmede de aandacht voor de drie V's**

8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw beoordeling toe. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C6*). **De DEC is er van overtuigd dat het projectvoorstel aansluit bij recente wetenschappelijke inzichten en geen hiaten bevat die de bruikbaarheid van de resultaten in de weg zullen staan. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en helder gekozen en sluiten aan bij de aangegeven doelstellingen en de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen naar de mening van de DEC leiden tot het behalen van de doelstelling in het kader van het project.**

Welzijn dieren

9. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. Beoordeel of de keuze hiervoor voldoende wetenschappelijk is onderbouwd en of de aanvrager voldoet aan de in de Wet op de Dierproeven (Wod). voor de desbetreffende categorie genoemde beperkende voorwaarden. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C1; zie bijlage I voor toelichting en voorbeelden*). **N.v.t.**

- Bedreigde diersoort(en) (10e, lid 4)
- Niet-menselijke primaten (10e)
- Dieren in/uit het wild (10f)
- Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn)
- Zwerfdieren (10h)
- Hergebruik (1e, lid 2)
- Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
- Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
- Dodingsmethode niet volgens bijlage IV richtlijn (13c, lid 3)

10. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan, omdat het, om redenen van dierenwelzijn of diergezondheid of om wetenschappelijke redenen, noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. **De DEC heeft zich ervan verzekerd dat zulks het geval is.**

11. Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*). **De DEC vertrouwt erop dat de aanvrager al het mogelijke zal doen om het eventuele ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen.**

12. Het uitvoeren van dierproeven zal naast het ongerief vaak gepaard gaan met aantasting van de integriteit van het dier. Beschrijf op welke wijze er sprake is van aantasting van integriteit. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*). (*zie bijlage I voor voorbeeld*). **De integriteit van dieren wordt fysiek aangetast door de genetische verandering in de dieren. De integriteit van het dier wordt aangetast door opoffering.**

13. Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

Naar de mening van de DEC zijn de humane eindpunten goed gedefinieerd. Parameters die bepalen of welzijn aan zou kunnen tasten zijn gedefinieerd en worden bepaald.

3V's

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

De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Distributie van oligonucleotiden over weefsels en organen is alleen in vivo te bepalen.

15. Beoordeel of het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en of er een heldere strategie is om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

Naar de mening van de DEC is het aantal te gebruiken dieren realistisch ingeschat en wel zodanig dat niet meer dan nodig, maar ook niet minder dan nodig dieren worden gebruikt voor het behalen van een betrouwbaar wetenschappelijke resultaat zulks mede gebaseerd op de door de aanvrager aangeleverde literatuur referenties.

16. Beoordeel of het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project zodanig is opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

De DEC heeft zich ervan verzekerd dat de aanvrager al het mogelijke zal doen om het eventuele ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen. Hierbij heeft de DEC onder andere de pijnbestrijding en huisvesting in haar beoordeling betrokken.

17. Beoordeel, indien het wettelijk vereist onderzoek betreft, of voldoende aannemelijk is gemaakt dat er geen duplicatie plaats zal vinden en of de aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om tijdens de uitvoering van het project te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt. Licht uw beoordeling toe.

Voor zover de DEC kan beoordelen zijn de kennis en kunde van de onderzoeksgroep adequaat en mede gezien het daartoe strekkende antwoord van de aanvrager in de projectaanvraag heeft de DEC reden aan te nemen dat onnodige duplicatie achterwege blijft.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3; zie bijlage I voor voorbeeld*).

In onderhavige projectaanvraag worden dieren van beide geslachten

gebruikt. De onderzoeker heeft naar de mening van de DEC deze keuze in de projectaanvraag voldoende onderbouwd. Alhoewel de DEC-RUG vermindering van proefdieren in voorraad gedood toejuicht is zij overigens van mening dat dit aspect met name met de centrale dienst proefdieren en de aanvrager kortgesloten dient te worden daar de DEC niet betrokken is bij de fok en aankoop van proefdieren.

19. Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef). Indien dieren gedood worden, geef aan of en waarom dit noodzakelijk is voor het behalen van de doelstellingen van het project. Indien dieren gedood worden, geef aan of er een voor de diersoort passende dodingsmethode gebruikt wordt die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Zo niet, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. Indien van toepassing, geeft ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd (Zie *Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

Naar de mening van de DEC is dit genoegzaam beschreven in de projectaanvraag door de aanvrager.

20. Indien niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren worden gedood om niet-wetenschappelijke redenen, is herplaatsing of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is. **N.v.t.**

NTS

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

Naar de mening van de DEC is zulks het geval.

D. Ethische afweging

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

Rechtvaardigt de doelstelling van het project "*Onderzoek naar de biodistributie van nieuwe, op oligonucleotiden gebaseerde, teststoffen voor de behandeling van zeer ernstige en zeldzame monogene aandoeningen*", de opoffering en het matige ongerief, dat de dieren wordt aangedaan in het onderhavige project?

2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn ten opzichte van elkaar af. Om dit proces te vergemakkelijken, kunt u de belangrijkste belanghebbenden en de belangrijkste waarden die in het geding zijn waarderen. U kunt dit verwoorden in termen van gering, matig of veel/ernstig voordeel of nadeel. Geef aan waarom de DEC bevordering van waarden (baten) voor de ene belanghebbende prevaleert boven de aantasting van waarden (kosten) voor de andere belanghebbende (Zie *Praktische handreiking ETK: Stap 3.B*; zie bijlage I voor voorbeelden).

**Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: matig nadeel.
Waarden die voor de onderzoekers bevorderd worden: dit aspect is voor de weging door de DEC-RUG niet relevant.**

Waarden die voor de doelgroep bevorderd worden: mogelijk substantieel voordeel.

Algemeen: vergroting van medische kennis met betrekking tot het ontwikkelen van behandelingen van (zeldzame) monogene aandoeningen.

De DEC-RUG is van mening dat de belangen van de samenleving en de patiënten en hun naasten binnen het project "Onderzoek naar de biodistributie van nieuwe, op oligonucleotiden gebaseerde, teststoffen voor de behandeling van zeer ernstige en zeldzame monogene aandoeningen" zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de proefdieren. Voor de betrokken proefdieren leiden deze proeven, na matig ongerief, tot de dood. Zij worden door de experimenten in hun welzijn geschaad. Ten gevolge van de proeven zullen de dieren geen stress ondervinden of pijn ondergaan. De integriteit van de dieren zal worden aangetast door de genetische veranderingen en opoffering aan het eind van de proeven.

Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit project echter leiden tot een relevante uitbreiding van medisch-wetenschappelijke kennis over het ontwikkelen van behandelingen van (zeldzame) monogene aandoeningen middels oligonucleotiden.

Vandaar dat de DEC-RUG het onderhavige onderzoek, zowel vanuit wetenschappelijk als vanuit maatschappelijk oogpunt, van substantieel belang acht. Het is aannemelijk dat de doelstelling behaald zal worden. De onderzoekers zullen zoveel mogelijk trachten het lijden van de dieren te beperken, waardoor het werkelijke ongerief van de dieren beperkt blijft in relatie tot het te behalen voordeel.

3. Beantwoord de centrale morele vraag. Maak voor het beantwoorden van deze vraag gebruik van bovenstaande afweging van morele waarden. Maak daarnaast gebruik van de volgende moreel relevante feiten: belang onderzoek (C4), kennis en kunde van betrokkenen (C7), haalbaarheid doelstellingen (C8), categorieën en herkomst dieren (C9), 3V's (C14-C18), ongerief (C10-13 en C19) en relevante wet en regelgeving (C2). Onderbouw hoe al deze elementen zijn meegewogen bij de beantwoording van de centrale morele vraag, zodanig dat het navolgbaar is zonder gedetailleerde kennis te hebben van het projectvoorstel (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.C; zie bijlage I voor voorbeeld).

De DEC-RUG beantwoordt de centrale morele vraag, vermeld onder D1, bevestigend.

Hoewel de DEC-RUG de intrinsieke waarde van het dier onderschrijft en oog heeft voor het te ondergane ongerief van de proefdieren, weegt het substantiële belang van dit project naar haar mening zwaarder.

De DEC-RUG is van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De onderzoekers beschikken over de benodigde kennis en technische expertise. Er is geen sprake van duplicatie.

In de gekozen strategie wordt op bevredigende wijze tegemoetgekomen aan de vereisten van vervanging, vermindering en verfijning. De DEC-RUG is er van overtuigd dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om zowel het ongerief van de dieren als het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken. De DEC-RUG is ervan overtuigd dat er geen alternatieven zijn, waardoor deze dierproef met minder ongerief of met minder, dan wel zonder levende dieren zou kunnen worden uitgevoerd.

Op grond van deze overwegingen beschouwt de DEC-RuG de voorgestelde dierproeven in het projectvoorstel "Onderzoek naar de biodistributie van nieuwe, op oligonucleotiden gebaseerde, teststoffen voor de behandeling van zeer ernstige en zeldzame monogene aandoeningen." als ethisch gerechtvaardigd en voorziet de DEC-RuG derhalve het onderhavige projectvoorstel van een positief advies.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

2. Het uitgebrachte advies is kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt in de DEC. Indien gebaseerd op een meerderheidsstandpunt, specificeer het minderheidsstandpunt op het niveau van verschillende belanghebbenden en de waarden die in het geding zijn (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.A; zie bijlage I voor voorbeeld*).

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

3. Omschrijf de knelpunten/dilemma's die naar voren zijn gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies zowel binnen als buiten de context van het project (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.B*).

N.v.t. De DEC is overigens niet gewoon projectaanvragen buiten de context c.q. haar verantwoordelijkheid en competentie te beoordelen.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Innoser Laboratories BV

[REDACTED]

Zernikedreef 9

2333 CK LEIDEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD907002016788

Bijlagen

2

Datum 19 december 2016

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 16 december 2016. Het gaat om uw project "Onderzoek naar de biodistributie van nieuwe, op oligonucleotiden gebaseerde, teststoffen voor de behandeling van zeer ernstige en zeldzame monogene aandoeningen.". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD907002016788. 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. U ontvangt binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. Als wij nog informatie van u 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 voldoen, 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.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:

19 december 2016

Aanvraagnummer:

AVD907002016788

Datum:
19 december 2016
Aanvraagnummer:
AVD907002016788

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 90700
Naam instelling of organisatie: Innoser Laboratories BV
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 61886890
Straat en huisnummer: Zernikedreef 9
Postcode en plaats: 2333 CK LEIDEN
IBAN: NL22ABNA0581547756
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: InnoSer Laboratories

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
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

Datum:

19 december 2016

Aanvraagnummer:

AVD07002016788

Over uw project

Geplande startdatum:

1 februari 2017

Geplande einddatum:

31 januari 2022

Titel project:

Onderzoek naar de biodistributie van nieuwe, op oligonucleotiden gebaseerde, teststoffen voor de behandeling van zeer ernstige en zeldzame monogene aandoeningen.

Titel niet-technische samenvatting:

Onderzoek naar de biodistributie van nieuwe, op oligonucleotiden gebaseerde, teststoffen voor de behandeling van zeer ernstige en zeldzame monogene aandoeningen.

Naam DEC:

DEC Rug

Postadres DEC:

A. Deusinglaan 1, [REDACTED] 9713 AV GRONINGEN

E-mailadres DEC:

secrdec.umcg@umcg.nl

Betaalgegevens

De leges bedragen:

€ 935,-

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:

[REDACTED]

Functie:

[REDACTED]

Plaats:

Leiden

Datum:

16 december 2016



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Innoser Laboratories BV

Zernikedreef 9

2333 CK LEIDEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD907002016788

Bijlagen

2

Datum 19 december 2016

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 19 december 2016

Vervaldatum: 18 januari 2017

Factuurnummer: 16700788

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD907002016788	€ 935,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL29INGB 070.500.1512 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93144, 2509 AC te 's Gravenhage.

Van: [REDACTED]
Verzonden: maandag 23 januari 2017 9:27
Aan: 'Info-zbo'
CC: [REDACTED]
Onderwerp: RE: aanvraag AVD907002016788
Bijlagen: bijlage_-_beschrijving_dierproeven_1.0_Modelv8.doc; format_nts-nieuwv8.doc

Categorieën: Dossier: [REDACTED]

Ls,
Hartelijk dank voor de mogelijkheid tot het wijzigen, bijgevoegd de wijzigingen in twee documenten. Indien ik de ftp moet gebruiken verzoek ik u mij de inloggegevens ook te sturen, dit ivm een it crash on site bij ons,

Met vriendelijke groet/Best regards,
[REDACTED]



[REDACTED]
[REDACTED]
InnoSer Nederland BV / InnoSer Laboratories BV
Runderweg 6 Zernikedreef 9
8219 PK 2333 CK
Lelystad Leiden

Van: Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]
Verzonden: dinsdag 17 januari 2017 10:52
Aan: [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: aanvraag AVD907002016788

Geachte [REDACTED]

U heeft bij de CCD een aanvraag tot projectvergunning ingediend, bij de behandeling hiervan willen wij u vragen een aantal punten te verduidelijken. Het betreft uw aanvraag :"

Onderzoek naar de biodistributie van nieuwe, op oligonucleotiden gebaseerde, teststoffen voor de behandeling van zeer ernstige en zeldzame monogene aandoeningen".

Met aanvraagnummer AVD907002016788.

In de NTS wordt bij 3.1 voor het algemene publiek niet duidelijk waar deze projectaanvraag om gaat en wat de aanleiding is om dit project uit te voeren, en u gebruikt te technische taal en begrippen. Kunt u punt 3.1 herschrijven zodat het begrijpelijker wordt waarom dit project wordt uitgevoerd?

Onder punt 3.3 staat een tegenstrijdigheid voor wat betreft het aantal dieren. In de eerste zin beschrijft u een aantal van 1600 en in de laatste zin beschrijft u 800 dieren. Dit aantal komt ook overeen met het aantal dieren in de bijlage dierproeven.

In de bijlage dierproeven beschrijft u onder B. de dieren, dat u WT muizen gebruikt waar geen experiment mee gedaan kan worden. Wij nemen aan dat u hier WT muizen bedoeld die 'over' zijn uit de fok van een transgene lijn? Kunt u dit punt aanpassen in de bijlage dierproeven?

Uw aanvraag wordt in de CCD vergadering van 27 januari besproken. Kunt u de aanpassingen uiterlijk donderdag 26 januari aan ons toesturen?

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 emailadres!)

[Click here to report this message as SPAM](#)

-- Powered by ATERA Networks --



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Innoser Laboratories BV

Zernikedreef 9
2333 CK LEIDEN


**Centrale Commissie
Dierproeven**
Postbus 20401
2500 EK Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD907002016788
Bijlagen
1

03 FEB. 2017

Datum 2 februari 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 

Op 16 december 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Onderzoek naar de biodistributie van nieuwe, op oligonucleotiden gebaseerde, teststoffen voor de behandeling van zeer ernstige en zeldzame monogene aandoeningen." met aanvraagnummer AVD907002016788. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 23 januari 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Op ons verzoek heeft u de NTS aangepast en meer begrijpelijk herschreven voor het algemene publiek. Daarnaast heeft u het aantal dieren in de NTS aangepast. Bijlage 3.4.4.1 is aangepast wat betreft de herkomst van de dieren.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning.

Met het oog op artikel 10a, lid 1, zijn er algemene voorwaarden gesteld.

U kunt met uw project "Onderzoek naar de biodistributie van nieuwe, op oligonucleotiden gebaseerde, teststoffen voor de behandeling van zeer ernstige en zeldzame monogene aandoeningen." starten. De vergunning wordt afgegeven van 3 februari 2017 tot en met 31 januari 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Rug gevoegd. Dit advies is opgesteld op 13 december 2016. 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. Dit advies van de commissie nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

Datum:
2 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD907002016788

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.centralecommissiedierproeven.nl. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

Datum:
2 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD907002016788

ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

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: Innoser Laboratories BV

Adres: Zernikedreef 9

Postcode en plaats: 2333 CK LEIDEN

Deelnemersnummer: 90700

deze projectvergunning voor het tijdvak 3 februari 2017 tot en met 31 januari 2022, voor het project "Onderzoek naar de biodistributie van nieuwe, op oligonucleotiden gebaseerde, teststoffen voor de behandeling van zeer ernstige en zeldzame monogene aandoeningen." met aanvraagnummer AVD907002016788, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Rug. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]. Voor de uitvoering van het project is Toezichthouder WOD en dierenarts verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 16 december 2016
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 16 december 2016;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per brief op 23 januari 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 13 december 2016, ontvangen op 16 december 2016.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 23 januari 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Biodistributie van nieuwe oligonucleotiden in de muis.				
	Muizen (<i>Mus musculus</i>) /	800	100% Matig	

Voorwaarden

Op grond van artikel 10a1 lid 2 van de Wet op de dierproeven zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen

De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat go/no go momenten worden afgestemd met de IvD.

In artikel 10, lid 1 sub a 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

Aanvraagnummer:

AVD907002016788

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 afstemming met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarde wijzigen of intrekken.



Aanvraagnummer:

AVD907002016788

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 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

Aanvraagnummer:

AVD907002016788

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 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 13d 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 13c 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.



Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

- U bent van plan om één of meerdere dierproeven uit te voeren.
- Met dit formulier vraagt u een vergunning aan voor het project dat u wilt uitvoeren. Of u geeft aan wat u in het vergunde project wilt wijzigen.
- Meer informatie over de voorwaarden vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl, of in de toelichting op de website.
- Of 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	11800
		<input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen	
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	Academisch Medisch Centrum
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]
		KvK-nummer	343362777
		Straat en huisnummer	Meibergdreef 31
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>	Postbus	
		Postcode en plaats	1105AZ Amsterdam
		IBAN	NL68TABO0136166741
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	AMC Crediteurenadministratie
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(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.	(Titel) Naam en voorletters	[Redacted] <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.
		Functie	Postdoc
		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 | <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 | 01 - 01 - 2017 |
| Einddatum | 01 - 01 - 2022 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Role of intestinal bacteria in development of diabetes in obesity
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- De rol van darmbacteriën in de ontwikkeling van diabetes en overgewicht
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|-----------------------------------|
| Naam DEC | Dierexperimentencommissie AMC |
| Postadres | Meibergdreef 31, 1105AZ Amsterdam |
| E-mailadres | |

4 Betaalgegevens


- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 935 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


- 12 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 

Functie 

Plaats Amsterdam

Datum 16 - 12 - 2016

Handtekening 



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. Vul uw
1 deelnemernummer van | 11800 |
| 1. Vul de naam van de
2 instelling of organisatie | AMC |
| 1. Vul de titel van het
3 project in. | Role of intestinal bacteria in development of diabetes in obesity |

2 Categorie van het project

- | | |
|--|---|
| 2. In welke categorie valt
1 het project. | <input checked="" type="checkbox"/> Fundamenteel onderzoek |
| <i>U kunt meerdere
mogelijkheden kiezen.</i> | <input checked="" type="checkbox"/> Translationeel of toegepast onderzoek |
| | <input type="checkbox"/> Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie |
| | <input type="checkbox"/> Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van |
| | <input type="checkbox"/> Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort |
| | <input type="checkbox"/> Hoger onderwijs of opleiding |
| | <input type="checkbox"/> Forensisch onderzoek |
| | <input type="checkbox"/> 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 'hogere onderwijs of opleiding' aan waarom in dit project, in relatie tot het opleidingsprogramma en eindtermen, is gekozen voor dierproeven.

Introduction

Obesity is a predisposing factor for development of chronic diseases such as cardiovascular disease (CVD) and type 2 diabetes (T2DM). These diseases are major causes of morbidity and mortality and carry significant economic burden. Strategies to reduce obesity and obesity-related diseases are therefore urgently needed. This project proposal will focus on obesity and T2DM.

Both the industrialized and developing world have experienced an obesogenic shift in lifestyle induced by increased caloric intake and reduced caloric output. Although weight-loss is an effective means to reduce the insulin resistant phenotype in early T2DM in the obese, it is difficult to achieve long-term life style changes to maintain a healthy body weight [1]. The development of obesity and progression to T2DM is complex and multifactorial: it is highly subject to individual (genetic) susceptibility and environmental factors. In line, a subpopulation of obese humans never develops metabolic pathologies like T2DM at all. An imbalance between intake and output of energy therefore does not fully capture the complex mechanisms underlying the development of T2DM in obesity. Obesity-induced inflammatory changes, especially in white adipose tissue, have been postulated to play a crucial part in the pathophysiology of obesity and T2DM. Factors mediating these inflammatory changes are largely unknown. In recent years, the gut microbiota has been put forward as factor that contributes to such inflammatory changes.

Microbiota-mediated development of obesity and T2DM

In the past decade, it became evident that the intestinal microbiota plays a significant role in the development of metabolic pathologies including obesity and T2DM. A reduced number of bacterial genes (bacterial richness) in the intestine with a concomitant increase in inflammatory profile [2, 3] and increased circulating levels of bacterial 16s rDNA [4] have been suggested to have predictive value for development of obesity-associated insulin resistant state in humans. Evidence for a causal role of the microbiota came from observations that colonization of *ad libitum*-fed, germ-free mice with microbiota from obese (murine or human) donors increased weight gain to a higher extent compared to colonization with microbiota from lean (murine or human) donors [5, 6]. In line with these observations,

Although several intestinal bacterial species have been correlated with obesity, increased fasting blood glucose levels, increased HbA1c levels and development of insulin resistance (all precursors of T2DM), it is not yet clear whether these bacteria are causal to or a result of these metabolic disturbances.

inflammatory pathways, in particular in visceral adipose tissue. This in turn contributes to development of insulin resistance. Other (Gram-negative) bacteria or bacterial products might do the same but this has as yet not been investigated.

Unknowns: The identity of bacteria and/or bacterial products that causally influence host metabolism (*e.g.*, body weight, glucose tolerance, insulin sensitivity).

Microbiota-mediated effects on gut barrier function and bacterial translocation

Migration of bacteria and/or bacterial metabolites from the intestine into the periphery (defined as bacterial translocation) have recently been suggested as a potential link between activation of (peripheral) inflammatory pathways and subsequent development of insulin resistance [9, 10]. Nevertheless, the extent to which bacteria are capable to translocate from the intestinal lumen into otherwise sterile peripheral tissues remains to be determined. Moreover, it is currently unknown if bacterial DNA, as detected in adipose tissue, circulation and liver of obese and T2DM mouse models and human subjects, is derived from alive bacteria or whether it is derived from bacteria that have been ingested by immune cells in lymph nodes in tissues surrounding the intestine.

Conditions that favor or prevent translocation of bacteria or bacterial metabolites will be important to understand the process and to develop means to improve intestinal barrier function in obese and T2DM patients. We hypothesize that an altered microbiota composition, as observed in obesity and T2DM, may directly affect intestinal epithelial permeability by 'loosening' the epithelial cells lining the intestine. Bacteria and bacterial metabolites may also affect specific cell types that preserve intestinal barrier function such as Paneth and Goblet cells. These cells can be considered intestinal gate keepers and a decreased function, as observed in obese humans and mice, has been associated with increased bacterial translocation, intestinal dysfunction and development of disease (*e.g.*, inflammatory bowel disease, potentially diabetes) [11-14].

Unknowns: The mechanism by which bacteria or bacterial metabolites affect intestinal barrier function and augment translocation from the intestinal lumen to the circulation and peripheral tissues (*e.g.*, adipose tissue and liver).

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?

The overall aim of this project proposal is to obtain mechanistic insight in the role of the gut microbiota in development of obesity and T1DM (see 3.1 for background information). We will specifically focus on:

- Microbiota-mediated development of obesity and TIIDM
- Microbiota-mediated effects on bacterial translocation and gut barrier function

Experiments suggested in this project proposal will provide data on these specific focus points. Both focus points are highly related and will –when combined- provide a complete picture of the overall aim. Using ‘Go’ and ‘No-go’ criteria (as described in 3.4.3.) will allow for a focused approach of the research aim and facilitates efficient use of mice.

Feasibility

This project is a continuation of an existing line of research [REDACTED]. Within [REDACTED] there is sufficient knowledge on successful execution of experiments with animal models enabling us to successfully test our hypotheses and conclusively address our research questions.

The project proposal is feasible within the suggested 5-year time frame. Mouse numbers for suggested experiments are on average ~30 mice/month for 5 years which is manageable with the manpower we have for the coming 5 yrs [REDACTED]

3.3 Belang

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

The obesity pandemic drives the development of medical conditions such as TIIDM. Obesity and TIIDM are leading causes of morbidity and mortality worldwide with estimated costs exceeding 400 billion euro over the past 5 years and an estimated 250,000 deaths each year [15, 16]. It is predicted that by 2050, an alarming one in three people worldwide will be diagnosed with TIIDM [17].

The development of obesity and progression to TIIDM is complex and multifactorial (*e.g.*, driven by both genetic and environmental factors). Long-term life style changes aiming to maintain a healthy body weight have been proven ineffective [1]. Development of strategies to prevent, treat and cure obesity and related comorbidities therefore has high priority. Mechanistic insight in processes that contribute to development of obesity and TIIDM is important in this quest.

The gut microbiota plays an important role in maintaining host health. Alterations in gut microbiota composition are at the basis of several metabolic pathologies, including obesity and TIIDM [18, 19]. Research on the role of the gut microbiome in health and disease has gained significant attention and effort in the past decade. Although there is evidence for a contributing role of the microbiota in development of obesity and TIIDM (see section 3.1, description of the framework of this project proposal), studies providing mechanistic insight in this relation are still scarce. Additionally, it remains to be determined if changes in microbiota composition *per se* are enough to develop these pathologies or whether additional triggers such as diet, host inflammatory response or host genetic make-up are additional requirements to develop obesity and TIIDM in mice and men.

Data obtained from the experiments proposed in this project proposal will provide mechanistic insight in microbiota-mediated changes in intestinal barrier function, bacterial

translocation, activation of inflammatory signaling events and their combined contribution to development of obesity and T2DM. Our top-down approach –in which we start with observations and data from human cohorts- will render results of this project translatable to humans. **Results from this project will contribute to the(patho)physiological understanding of the role of the gut microbiota in development of obesity and T1DM and provide information to establish starting points for novel treatment strategies in humans.**

3.4 Onderzoeksstrategie

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

The overall project strategy will be top-down. Interventions will be designed based on data from healthy versus obese/T1DM humans in which gut and adipose tissue microbiota composition is compared and associated with corresponding health status. In addition, proteomics analysis of portal vein blood from lean and obese, T2DM subjects will reveal bacterial metabolites of interest.

We will perform mechanistic studies in mice to assess if and how bacteria/bacterial metabolites of interest contribute to development of the obese and diabetic phenotype. We are particularly interested in bacteria and bacterial metabolites that translocate from the intestinal lumen into the periphery, affect immune signaling pathways and augment or prevent obesity and T2DM development. The sequence of suggested experimental procedures is based on clear Go/No Go criteria (see 3.4.3).

The interventions can be a combination of administration/elimination of a bacterium/bacterial metabolite of interest under certain dietary conditions. Below, we explain strategies with regard to defining an intervention.

Intervention strategy for administration of bacteria or bacterial metabolites

When administered to mice, this bacterium accelerates development of obesity and T1DM. Furthermore, mice that received [redacted] had increased activation of inflammatory markers and increased levels [redacted] in peripheral tissues. We hypothesize that [redacted] –using yet unknown mechanisms- translocates from the intestine into peripheral tissues of the host [redacted] it activates inflammation, which has for long been associated with development of T1DM. This hypothesis, however, remains to be proven and will be one of the topics of this project proposal.

From our human cohorts, we will select other bacteria or bacterial metabolites that correlate (either positively or negatively) with obesity and T1DM and assess their role in development of obesity and T1DM (see 3.4.3. for ‘Go’ and ‘No-go’ criteria). In this phase of the project proposal, however, it is difficult to predict which bacteria will be selected in the coming 5 years. Nevertheless the project strategy will be similar for the interventions that will be chosen.

Intervention strategy for elimination of specific bacterial strain

Methods that aim to specifically eliminate unfavorable bacteria [REDACTED] from the intestine will be a valuable tool to study the effect of elimination of a particular bacterium from the intestine on development of obesity and insulin resistance. Additionally, such methods might in the future be developed into successful treatment options for microbiota-related diseases in humans. Antibiotics treatment is usually the method of choice to eliminate bacteria. However, antibiotics rarely have specific action against particular bacterial species. Furthermore, antibiotics severely affect the entire gut microbiota community (sometimes chronically) and long-term antibiotics use can lead to antibiotics resistance.

Bacteriophages are viruses that infect and eliminate bacteria in a species-specific manner. Since bacteriophages do not target eukaryotic cells, they are a safe option for use in humans [20]. As such, they have been used as an FDA-approved method to kill *Listeria* bacteria on food products (U.S. FDA/CFSAN: Agency Response Letter, GRAS Notice No. 000218). In Eastern Europe, bacteriophages have successfully been used for over 90yrs to treat antibiotic-resistant infections [21, 22]. Additionally, bacteriophages can be modified (engineered) in such a way that they maintain their specific infectious capacity with subsequent elimination of the target bacterium without being able to replicate. This way, bacteriophages can be dosed rather specifically and used in a manner that prevents potential response of the host to bacteriophages. We will use bacteriophages as a tool to study the effect of elimination of a particular bacterial species from the gut on intestinal barrier function and development of obesity and T1DM.

Strategy for administration of compounds that affect intestinal barrier function:

As stated in the introduction, bacteria might directly affect intestinal epithelial permeability by 'loosening' the epithelial cells lining the intestine through yet unknown mechanisms. Additionally, they may affect specific cell types that preserve intestinal barrier function such as Paneth and Goblet cells. One of the mechanisms underlying decreased Paneth and Goblet cell function in obesity and T1DM is endoplasmic reticulum (ER) stress [23]. This specific form of organelle stress, which is increased in many cell types (*e.g.*, hepatocytes, adipocytes, intestinal epithelial cells, Paneth cells and Goblet cells) in obese humans and mice compared to lean humans and mice, leads to severe metabolic dysfunction of these cells [24] and potentially reduces intestinal barrier function.

Interventions that alter epithelial, Paneth or Goblet cell function (*e.g.*, by administering 'probiotics' that promote growth of bacteria that maintain healthy epithelial function or by administering ER stress reducing compounds), and thereby improve intestinal barrier function and ameliorate development of obesity and insulin resistance, are of interest in this project proposal.

Strategy for choice of diet:

Dietary composition is an important contributor to development of obesity and T1DM. To clarify whether dietary composition is a prerequisite for microbiome-mediated development of obesity and T1DM or whether administration of bacteria can induce obesity and T1DM without the requirement of a specific dietary composition, we will perform experiments in mice fed different diets (*e.g.*, chow or high-fat diet).

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

Mice will be administered selected bacterium or bacterial metabolite and subjected to dietary regimens (e.g., chow vs high-fat diet). An alternative approach would be to eliminate bacterium of interest using bacteriophages directed against a bacterium of interest. Primary *in vivo* readouts of interest are effects of the intervention on body weight, glucose tolerance and insulin sensitivity. Intestinal barrier function will be assessed after termination of the mice.

Microbiota-mediated development of obesity and T1DM

Following Go/No-Go decision making (see 3.4.3), we will then carry out dedicated studies to unravel the mechanism by which the intervention influences metabolic processes that are typically deranged in obesity and T1DM.

- **lipid production.** Hepatic or intestinal lipid production is typically deranged in obesity and T1DM and severely increases the chance to develop cardiovascular disease (CVD, a major comorbidity in T1DM) and fatty liver disease in humans. Additionally, it has been suggested that bacteria or bacterial compounds (especially LPS) have high affinity for lipids and might translocate with lipids in the intestine into the body.
- **energy metabolism** Alterations in microbiome composition and function have been associated with changes in energy homeostasis. Certain microbiota can increase energy harvest from food which potentially contributes to increased weight gain.
- **cholesterol metabolism** Cholesterol homeostasis is often deranged in obesity and T2DM. Increased LDL-cholesterol levels increase the chance to develop cardiovascular disease (CVD, a major comorbidity in T1DM). The intestine plays a crucial role in whole body cholesterol homeostasis and bacteria and their metabolites have been shown to affect cholesterol levels in the body.
- **bile salt metabolism** In addition to their function as an intestinal soap – dissolving dietary lipids- bile salts are signaling molecules that play a regulatory role in glucose and lipid metabolism. Bacteria in the intestine can metabolize and convert bile salts: bile salt composition is therefore in great part determined by the gut microbiota.
- **insulin sensitivity** Although we assess insulin-mediated glucose clearance, the hyperinsulinemic euglycemic clamp is the gold standard for studying insulin sensitivity *in vivo*. This test allows for analysis of insulin-mediated inhibition of hepatic glucose production and insulin-mediated uptake of glucose in the periphery.

Experiments that assess these metabolic processes will provide insight in the physiological effect of the intervention on metabolic pathways involved in development of or that are affected by obesity and T1DM.

Microbiota-mediated effects on bacterial translocation and gut barrier function

Following Go/No-Go decision making (see 3.4.3), we will carry out dedicated *in vivo* studies to unravel the mechanism by which the intervention influences intestinal permeability and routes by which the bacteria enter the periphery.

We will assess the effect of the intervention on intestinal barrier function and translocation of bacteria by:

- **Intestinal permeability assays** Intestinal permeability will be assessed using a fluorescent polysaccharide or (fluorescently) labeled bacteria that can be traced in several tissues/organs.
- **Lymph duct cannulation** Following translocation across the intestinal epithelium, bacteria can enter the body through the portal system or via the lymphatic system. To assess the latter, we will collect and analyze (labeled) bacteria in lymph fluid.

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.

The overall aim and specific focus points in this project are closely related: altered gut microbiota composition has been shown by us and others to contribute to development of obesity and TIIDM. Data on causality, however, are scarce. We hypothesize that microbiota contributes to development of obesity and TIIDM by favoring translocation of bacteria or bacterial metabolites from the intestine to peripheral tissues. This hypothesis is translated in the two focus points (see 3.1 and 3.2).

Since the experiments that address the focus points cannot be carried out in one mouse experiment, we designed a series of experiments aiming to answer the specific focus points.

This approach also provides the opportunity to create 'Go' and 'No-go' criteria thereby preventing carrying out unnecessary procedures.

Go and No-Go stepwise approach:

1) Design intervention

Intervention of interest will be determined based on human data (see strategy 3.4.1).

2) Start intervention

Since we work in the framework of obesity and TIIDM, one of the first criteria is that the intervention has to have a significant effect on one of the key parameters of obesity and TIIDM development (*i.e.*, **Primary outcome parameters**, these are body weight, glucose tolerance en insulin sensitivity).

Based on the results of the primary outcome parameters, we will decide whether or not to continue with an intervention:

No-go → none of the primary interventions were changes following intervention. Do not continue this intervention. Follow-up animal experiments will not be carried out. Redesign intervention (*e.g.*, choose other bacterium/intervention)

Go (and milestone!) → one of the primary outcome parameters is affected by the intervention. We consider this a Go and mechanistic studies will be performed.

3) Use intervention for mechanistic studies

Based on results of primary outcome parameters, we can prioritize a follow-up mechanistic study. For example, in case of

Altered body weight? Then energy metabolism analysis might have priority

Altered insulin sensitivity? Then hyperinsulinemic clamp might have priority

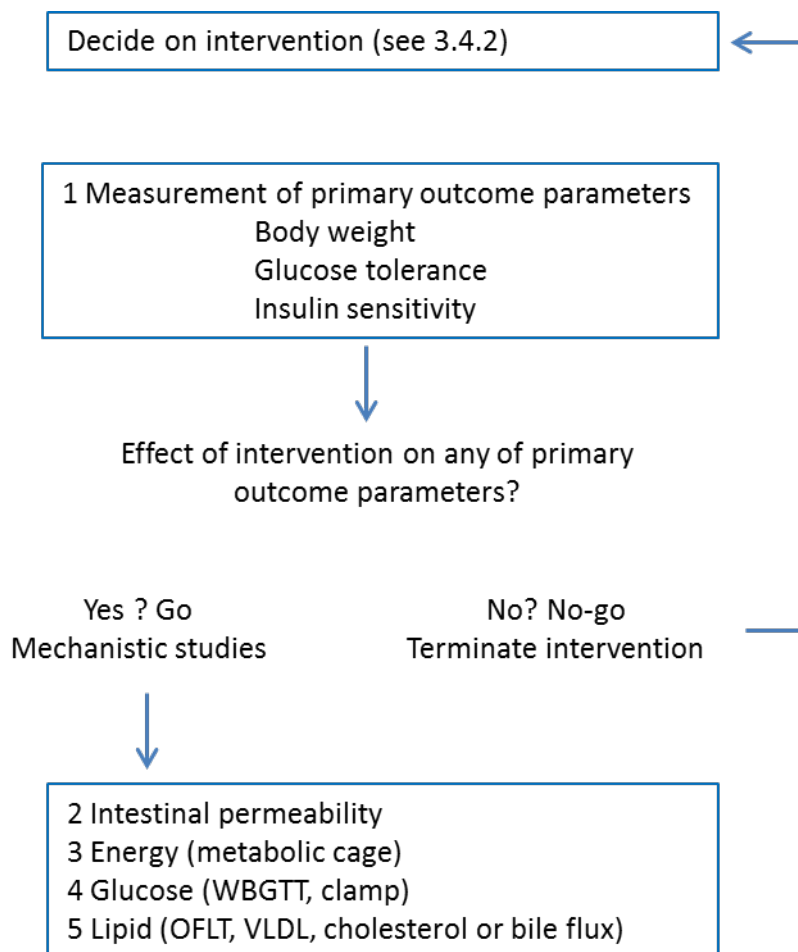


Figure 1. Summary of Go and No-go approach. The numbers in this flow scheme correspond

with the animal experiments described in Appendix 1.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Effect of bacterial intervention on development of obesity and T2DM and bacterial translocation

References

1. Friedman, J.M., *Modern science versus the stigma of obesity*. Nat Med, 2004. **10**(6): p. 563-9.
2. Cotillard, A., et al., *Dietary intervention impact on gut microbial gene richness*. Nature, 2013. **500**(7464): p. 585-8.
3. Le Chatelier, E., et al., *Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers*. Nature, 2013. **500**(7464): p. 541-6.
4. Amar, J., et al., *Involvement of tissue bacteria in the onset of diabetes in humans: evidence for a concept*. Diabetologia, 2011. **54**(12): p. 3055-61.
5. Ridaura, V.K., et al., *Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice*. Science, 2013. **341**(6150): p. 1241214.
6. Turnbaugh, P.J., et al., *An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest*. Nature, 2006. **444**(7122): p. 1027-31.
8. Alang, N. and C.R. Kelly, *Weight gain after fecal microbiota transplantation*. Open Forum Infect Dis, 2015. **2**(1): p. ofv004.
9. Cox, A.J., N.P. West, and A.W. Cripps, *Obesity, inflammation, and the gut microbiota*. Lancet Diabetes Endocrinol, 2015. **3**(3): p. 207-15.
10. Lam, Y.Y., et al., *Role of the gut in visceral fat inflammation and metabolic disorders*. Obesity (Silver Spring), 2011. **19**(11): p. 2113-20.
11. Biswas, A., et al., *Induction and rescue of Nod2-dependent Th1-driven granulomatous inflammation of the ileum*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(33): p. 14739-44.
12. Johansson, M.E., J.M. Larsson, and G.C. Hansson, *The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108 Suppl 1**: p. 4659-65.
13. Mankertz, J. and J.D. Schulzke, *Altered permeability in inflammatory bowel disease: pathophysiology and clinical implications*. Curr Opin Gastroenterol, 2007. **23**(4): p. 379-83.
14. Teltschik, Z., et al., *Intestinal bacterial translocation in rats with cirrhosis is related to compromised Paneth cell antimicrobial host defense*. Hepatology, 2012. **55**(4): p. 1154-63.
15. Cecchini, M., et al., *Tackling of unhealthy diets, physical inactivity, and obesity: health effects and cost-effectiveness*. Lancet, 2010. **376**(9754): p. 1775-84.

16. Neeland, I.J., et al., *Dysfunctional adiposity and the risk of prediabetes and type 2 diabetes in obese adults*. JAMA, 2012. **308**(11): p. 1150-9.
17. Boyle, J.P., et al., *Projection of the year 2050 burden of diabetes in the US adult population: dynamic modeling of incidence, mortality, and prediabetes prevalence*. Popul Health Metr, 2010. **8**: p. 29.
18. Sekirov, I., et al., *Gut microbiota in health and disease*. Physiol Rev, 2010. **90**(3): p. 859-904.
19. Tremaroli, V. and F. Backhed, *Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism*. Nature, 2012. **489**(7415): p. 242-9.
20. Abedon, S.T., et al., *Phage treatment of human infections*. Bacteriophage, 2011. **1**(2): p. 66-85.
21. Summers, W.C., *Bacteriophage therapy*. Annu Rev Microbiol, 2001. **55**: p. 437-51.
22. Trudil, D., *Phage lytic enzymes: a history*. Virol Sin, 2015. **30**(1): p. 26-32.
23. Hodin, C.M., et al., *Reduced Paneth cell antimicrobial protein levels correlate with activation of the unfolded protein response in the gut of obese individuals*. J Pathol, 2011. **225**(2): p. 276-84.
24. Lee, J. and U. Ozcan, *Unfolded protein response signaling and metabolic diseases*. J Biol Chem, 2014. **289**(3): p. 1203-11.



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.	<input type="text" value="11800"/>	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	<input type="text" value="AMC"/>	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
	<i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>	<input type="text" value="1"/>	<input type="text" value="Effect of bacterial intervention on development of obesity and T2DM and bacterial translocation"/>

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Experimental approach:

Mice will be administered with selected bacterium or bacterial metabolite and subjected to dietary regimens (*e.g.*, chow vs high-fat diet). An alternative approach would be to eliminate bacterium of interest using bacteriophages directed against selected bacterium. **Primary outcome parameters** are body weight, glucose tolerance and insulin sensitivity (as assessed by procedures 1a-d described below).

Secondary outcome parameters Tissues will be analyzed after termination of the experiment (*e.g.*, bacterial DNA content in tissues, expression of proteins and genes involved in glucose and energy metabolism).

Following Go-No Go decision making (*i.e.*, if one of the primary outcome parameters is affected, see 3.4.3 Project proposal), we will carry out dedicated studies to further unravel the mechanism by which the intervention influences metabolic processes that are typically deranged in obesity and T2DM (procedures 3 – 5). Additionally, dedicated experiment assessing intestinal permeability will be carried out (procedure 2)

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

Procedures and justifications (J):

Supplementation or removal of bacteria.

Bacteria or bacterial metabolites will be supplemented or removed (using bacteriophages) by gavage (orogastric administration). This will require careful restraining of the mice. **(J)** Precise dosing is crucial and bacteria/bacteriophages are very sensitive to environmental exposure (e.g., cannot be exposed to oxygen) and have to be administered locally.

1 Measurements of primary outcome parameters:

a) body weight

Mice will be weighed throughout the experimental period. **(J)** It is of critical importance to closely monitor body weight in all experiments. This indicates overall health of the mice and is a crucial determinant for development of obesity.

b) Glucose tolerance testing (GTT) and Insulin tolerance testing (ITT)

Mice will be fasted prior to these tests. Blood glucose will be measured from the tip of the tail using a glucometer prior to an intraperitoneal (ip) injection or oral bolus of glucose. Subsequently, blood glucose levels will be measured from the tip of the tail using a glucometer at several time intervals after glucose administration. **(J)** This test gives a rapid and validated estimation of whole body glucose responsiveness. After recovery the same mice can be used for an ITT; Blood glucose will be measured from the tip of the tail prior to an ip injection of insulin. Blood glucose levels will be measured from the tip of the tail using a glucometer at several time intervals after insulin administration. **(J)** This test provides a validated estimation of whole body insulin responsiveness without requirement of invasive surgical procedures.

c) Tissue collection

After **a-c** have been performed, mice will be anesthetized. Tissues and organs will be removed and snap frozen in liquid nitrogen or processed according to requirements of further analysis. *Ex vivo* analysis of tissues (e.g., lipid analysis, bacterial rDNA analysis, histology, cytokine profiling, FACS analysis, protein and gene expression analysis), will **(J)** provide mechanistic insight in regulatory pathways that coordinate *in vivo* observations.

Cumulative discomfort: "licht"

Power analysis performed by us in previous mouse studies usually suggests using around 10 mice per group to obtain relevant differences in insulin sensitivity and glucose tolerance.

Group size: (based on unpublished data) Significance value: 0.05, power of the study: 0.8, effect size: 20%, standard deviation: 16% -> 10 animals per group.

2) Intestinal permeability

FITC-dextran, D-Xylose or fluorescently labeled bacteria are examples of compounds that allow for analysis of passage of molecules (either in between intestinal cells or through intestinal cells, respectively). Mice will be fasted prior to receiving an oral bolus of such a compound. Blood will subsequently be collected at several time intervals after administration. During termination of the

mice a large blood sample will be collected in which, apart from permeability markers, also blood lipids can be measured. **(J)** Translocation of FITC-dextran or D-Xylose from the intestine into the blood stream is a measure of intestinal permeability and reflects gut barrier function.

Mice will be anesthetized and the common mesenteric lymph duct will be exposed by removal of surrounding tissues. A small catheter will be inserted into the lymph duct through a small incision and fixed to the lymph duct using tissue glue. Mice will remain anesthetized throughout the experiment and will receive an analgesic. Lymph will be collected at several time intervals after start of the experiment. After collection of the last sample, mice will be terminated. **(J)** Collected lymph will be analyzed for lipid content, presence of bacteria and immune cells. We hypothesize that translocated bacteria or bacterial products enter the system via the lymphatic system. This procedure will provide crucial insight in the route of bacterial entrance into the system.

Cumulative discomfort: "matig"

Group size: Significance value: 0.05, power of the study: 0.8, effect size: 25%, standard deviation: 23% -> 13 animals per group

3 Energy homeostasis

Metabolic cages

Whole body energy metabolism will be assessed using an open circuitry calorimetric system (PhenoMaster system) or comparable device. Mice will be single housed in and habituated to the cages prior to the start of the analysis. Individual food intake will be assessed. **(J)** Alterations in microbiome composition have been associated with changes in energy homeostasis. Metabolic cages allow for sensitive analysis of energy homeostasis in a minimally invasive manner.

Cumulative discomfort: "matig"

Group size: Significance value: 0.05, power of the study: 0.8, effect size: 25%, standard deviation: 20% -> 10 animals per group

4 Glucose/insulin homeostasis

4a) Whole body glucose tolerance test

Mice will be fasted prior to the test. Mice are injected intraperitoneally with a low dose of stable isotope-labeled glucose. Before and every 30 minutes for 6 hours, blood glucose concentrations are measured in blood through tail-tip bleeding. At the same time points, blood spots are taken on filter paper. After the test a blood sample will be taken from the tail vein. **(J)** This test monitors glucose homeostasis under basal conditions and has the advantage that mice are not terminated after the test but can be reused for other tests. (Please note that this test differs from the test described in **1b**)

4b) Hyperinsulinemic euglycemic clamp

Mice will be equipped with a jugular vein cannula that allows for non-invasive administration of solutions in awake mice. In short, mice will be anesthetized and a cannula will be inserted and fixed into the jugular vein. The free end of the cannula will subsequently be tunneled to a small incision in the neck. The cannula will be attached to the skull using acrylic glue. Mice will be administered an analgesic and allowed to recover for 3-6 days prior to infusion experiments. After placement of the jugular vein cannula, mice will be housed individually to prevent cage mates from chewing on the cannula or stitches.

Mice will be fasted prior to the test. Mice will be infused with solutions containing insulin and/or

glucose (stable isotope-labeled). The infusion rate of the solutions will be adjusted to rates required to maintain euglycemia. Blood glucose will be measured from the tip of the tail at several time intervals. After the experiment, mice will be terminated by heart puncture under anesthesia. **(J)** The hyperinsulinemic euglycemic clamp is the gold standard for studying insulin sensitivity *in vivo*.

Cumulative discomfort of this (glucose) experimental setup: "matig"

Power analysis performed by [REDACTED] in previous mouse studies using this set up suggests 10-11 mice per group will be required to obtain relevant differences in tests **4a-b**.

Group size: [REDACTED] Significance value: 0.05, power of the study: 0.8, effect size: 32%, standard deviation: 27% -> 11 animals per group.

5 Lipid homeostasis

Except for the oral fat load test (**a**), mice are terminated after measurements of lipid metabolism. Experiments below will therefore be carried out in separate cohorts of mice.

5a Oral fat load test (OFLT)

Mice will be fasted prior to the test. Blood will be drawn prior to oral administration of corn oil. To prevent rapid lipid turnover an inhibitor of lipolysis will be administered as well. Subsequent blood samples will be collected at several time points after corn oil administration. **(J)** Lipid concentration in the plasma will be used as a measure of intestinal lipid uptake. Additional analysis of the collected blood samples will reveal insight in postprandial endotoxemia (*i.e.*, co-translocation of LPS or bacteria with lipids).

5b Very Low Density Lipoprotein (VLDL) production

Mice will be fasted prior to this experiment. Blood will be drawn prior to administration of a lipase inhibitor that prevents break down of lipids in the circulation. Subsequent accumulation of lipids in the blood is a measure for lipid production by the liver. Blood will subsequently be collected at several time intervals. Immediately after collection of the last blood sample, mice will be terminated and a large blood sample will be collected. **(J)** Enhanced hepatic lipid secretion (in the form of VLDL-triglycerides) is an important hallmark of obesity and diabetes. Changes in VLDL secretion following bacterial interventions will therefore be a read out of insulin sensitivity.

Cumulative discomfort: "matig" **5a+b**

Group size: [REDACTED] Significance value: 0.05, power of the study: 0.8, effect size: 32%, standard deviation: 27% -> 11 animals per group.

5c Cholesterol flux

Mice will be administered with stable (non-radioactive) isotopes of cholesterol. Blood will be collected at several time points after administration. At the end of the experiment, mice will be submitted to bile duct ligation to collect bile (a major exit route of cholesterol from the body is via bile). Mice will be terminated by heart puncture and tissues/organs will be collected for further analysis of stable isotope enrichment. **(J)** The intestine plays a crucial role in whole body cholesterol homeostasis. This flux analysis allows us to determine *in vivo* cholesterol turnover and contribution of several body compartments to cholesterol homeostasis when microbiome composition/immune system has been altered.

Cumulative discomfort: "licht"

Group size: (Boesjes et al 2014 PloS One) Significance value: 0.05, power of the study: 0.8, effect size: 25%, standard deviation: 23% -> 13 animals per group

5d Bile salt flux

Mice will be intravenously administered with a stable (non-radioactive) isotope-labeled bile salt. Blood will be collected at several time points after administration. At the end of the experiment, mice will be submitted to bile duct ligation to collect bile and subsequently terminated. **(J)** Bile salt composition is in great part determined by the gut microbiota. In addition to *ex vivo* determination of bile salt composition in several compartments (*e.g.*, feces, plasma), flux analysis of bile salts (*e.g.*, of cholate) *in vivo* will demonstrate if altered microbiome composition affects bile salt turnover.

Cumulative discomfort: "licht"

Group size: [REDACTED] Significance value: 0.05, power of the study: 0.8, effect size: 25%, standard deviation: 23% -> 13 animals per group

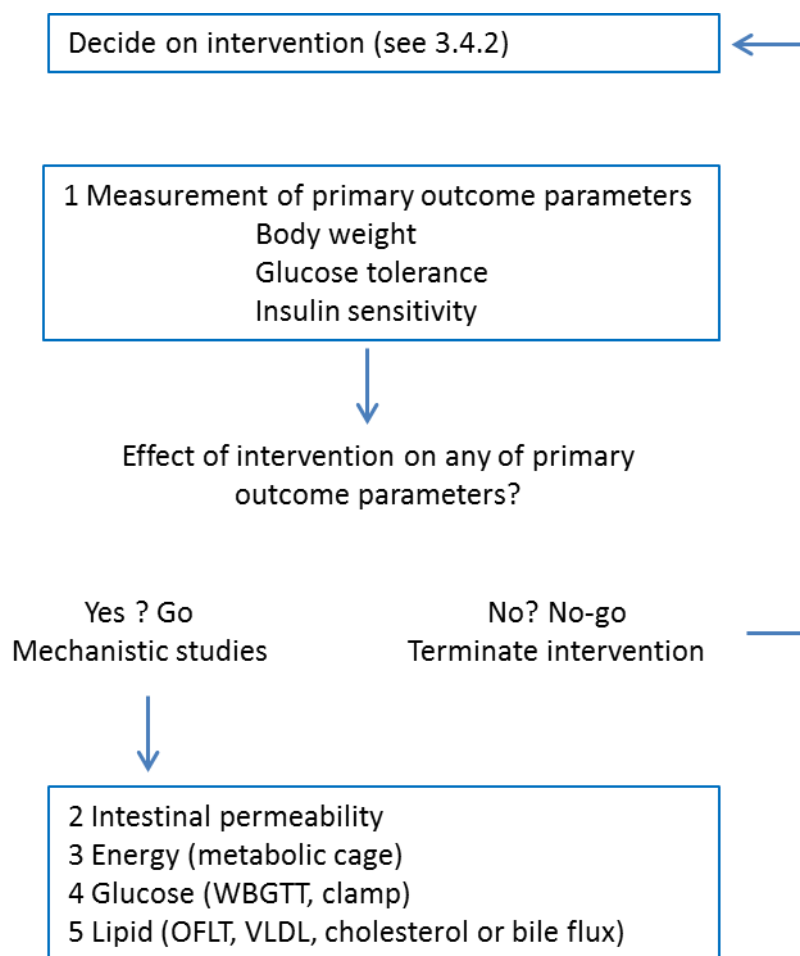


Figure 1. Summary of Go and No-go approach (see project proposal 3.4.3). Numbers in flow

scheme correspond with the animal experiments as indicated in the Appendix

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

Statistical groupsize calculation is used to minimize the total number of animals required (Van Lenth the American statistician 2001 Some practical guidelines for effective sample size determination). The extensive experience of our laboratory will be used in minimizing the required number of animals per group as much as possible. Animals will be followed up longitudinally and used to analyze multiple aspects of glucose, lipid and bile acid metabolism. Experiments are designed to extract the maximum amount of information out of each animal without causing unnecessary discomfort and discomfort beyond 'matig'. The number of animals required for these experiments are based on sample-size calculations using historical published and unpublished data from our laboratory, from our collaborators and from literature.

B. De dieren

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

Species: mouse

Origin: commercial providers, collaborating research groups

Age: adult mice (range ~4 and 20 weeks)

Gender: The experiments described in this proposal will only make use of male animals.

Reasons:

1) The objective and sub-goals do not include any aspect on gender. It is not within the scope of this proposed research to include the element of gender because it does not contribute to answering any of the sub-goals nor the objective. 2) Our main objective is to study the role of gut bacteria in development of obesity and type 2 diabetes. In order to do so, one of the requirements is to have a validated model (=male mice) that develop the pathology in standardized condition (eg, high-fat diet). Only under these conditions, it will be possible to study the additional role of bacteria. (Since female mice generally respond differently to HFD feeding compared to males (eg, female mice seem to be fairly protected from adipose tissue inflammation, glucose intolerance, hyperinsulinemia and islet hypertrophy), female animals are a less suitable model system. Use of female mice would require validation, optimization and standardization of all procedures. It is not within the scope of this proposed research (nor do we have the financial means or time to do so) to include the optimization and standardization of new animal models, new diets, new disease phenotypes, new measurement techniques and new surgeries.

Estimated numbers:

Since we cannot predict if bacteria/bacteriophages will be successful (as determined using methods described under Beoogde handlingen 1a-d), we will here assume that all interventions will be successful and therefore that all suggested experimental procedures will be carried out (all go).

The estimated maximal number and associated discomfort for individual animals for procedure 1 will be 210, discomfort "licht":

10 mice per group * 3 groups (control, heat-inactivated control, active bacteria) (10*3=30); estimated number of bacteria/bacterial metabolites or bacteriophages assessed in five year license is 7 (30*7=210)

The estimated maximal number and associated discomfort for individual animals for procedure 2 will be 273, discomfort "matig".

13 mice per group * 3 groups (control, heat-inactivated control, active bacteria) ($13*3=39$); estimated number of bacteria/bacterial metabolites or bacteriophages assessed in five year license is 7 ($39*7=273$)

The estimated maximal number and associated discomfort for individual animals for procedure 3 will be 231, discomfort "matig":

10 mice per group * 3 groups (control, heat-inactivated control, active bacteria) ($10*3=30$); estimated number of bacteria/bacterial metabolites or bacteriophages assessed in five year license is 7 ($30*7=210$)

The estimated maximal number and associated discomfort for individual animals for procedure 4 will be 231, discomfort "matig":

11 mice per group * 3 groups (control, heat-inactivated control, active bacteria) ($11*3=33$); estimated number of bacteria/bacterial metabolites or bacteriophages assessed in five year license is 7 ($33*7=231$)

The estimated maximal number and associated discomfort for individual animals for procedure 5a+b will be 231, discomfort "matig":

11 mice per group * 3 groups (control, heat-inactivated control, active bacteria) ($11*3=33$); estimated number of bacteria/bacterial metabolites or bacteriophages assessed in five year license is 7 ($33*7=231$)

The estimated maximal number and associated discomfort for individual animals for procedure 5c will be 273, discomfort "licht":

13 mice per group * 3 groups (control, heat-inactivated control, active bacteria) ($13*3=39$); estimated number of bacteria/bacterial metabolites or bacteriophages assessed in five year license is 7 ($39*7=273$)

The estimated maximal number and associated discomfort for individual animals for procedure 5d will be 273, discomfort "licht":

13 mice per group * 3 groups (control, heat-inactivated control, active bacteria) ($13*3=39$); estimated number of bacteria/bacterial metabolites or bacteriophages assessed in five year license is 7 ($39*7=273$)

Estimated number of mice: 1701 mice (not corrected for HEP)

Maximum discomfort: "matig" (Discomfort "matig" in 58% of animals; "licht" in 42% animals)

945 mice (=55%) have discomfort 'matig'. A maximum of 10% of mice in this category might reach a HEP. We therefore calculate an additional 10% of mice for this category (=95 mice). The discomfort matig will therefore be 58%.

The total number of mice is $1701 + 95 = 1796$

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.

Reduce:

Several of the suggested procedures (e.g., OGTT/ITT/OFLT) can be carried out within one animal experiment thereby reducing animal numbers. Other experiments, however, require dedicated groups of mice because the procedure results in termination of the animal (e.g., euglycemic clamps, VLDL secretion, lipid fluxes). This unfortunately prevents the possibility to reuse the animal for additional experimental procedures. To maximize usage of materials (e.g., blood or tissues) collected, these will be available to collaborating research groups.

Using 'Go' and 'No-go' criteria (see section A), we will proceed (or not) with in-depth follow-up experiments and decide which experiments are required and which ones can be skipped. This allows for development of dedicated experiments thereby reducing the number of mice required to answer the scientific questions.

All procedures will be carried out by well-trained, experienced technicians, postdocs and students. This will significantly reduce failure of experimental procedures (and thereby loss of animals).

Since restraining (for gavage) can be stressful to unaccustomed animals, we will perform daily placebo gavages prior to starting the experiments in order to habituate the mice, thereby reducing the amount of stress during the experiment. While this might rather amplify the cumulative amount of stress for the mice, the results will diverge less, which will contribute to a reduction of the number of animals needed.

Refine:

Mice will be acclimated prior to the experiments. Except for metabolic cage experiments, mice will be housed in groups. We will work with male mice that sometimes fight. This will be closely monitored and aggressors will be separated from the groups in case of severe fighting.

Surgical procedures and/or repetitive procedures that might cause pain or serious discomfort (e.g., repetitive blood sampling) to the animal will be performed under appropriate soothing conditions (i.e., administration of anesthetic and/or analgesic).

All procedures will be carried out and supervised by well-trained, experienced technicians, postdocs and students. This will significantly reduce complications and unnecessary stress on the

animals.

Replace:

Methods aiming to reduce or replace suggested experiments include *in vitro* (in organoids or cell models) assessment of efficacy, safety and effect of bacteria and compounds of interest. Although these studies will be carried out prior to the animal experiments, they cannot yet fully replace studies that require multicellular, complex systems.

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.

We do not propose experiments that require materials that are damaging to the environment. We will make sure to order bacteria and compounds in amounts sufficient for the suggested experiments thereby reducing waste. Any leftover materials will be disposed of according to health and safety guidelines.

To reduce stress during the intervention, we would like to refer to our reduction points:

Since restraining (for gavage) can be stressful to unaccustomed animals, we will perform daily placebo gavages prior to starting the experiments in order to habituate the mice, thereby reducing the amount of stress during the experiment. While this might rather amplify the cumulative amount of stress for the mice, the results will diverge less, which will contribute to a reduction of the number of animals needed.

Except for metabolic cage and hyperinsulinemic euglycemic clamp experiments, mice will be housed in groups. We will work with male mice that sometimes fight. This will be closely monitored and aggressors will be separated from the groups in case of severe fighting.

Surgical procedures and/or repetitive procedures that might cause pain or serious discomfort (e.g., repetitive blood sampling) to the animal will be performed under appropriate soothing conditions (i.e., administration of anesthetic and/or analgesic).

All procedures will be carried out and supervised by well-trained, experienced technicians, postdocs and students. This will significantly reduce complications and unnecessary stress on the animals. Inexperienced participants to the studies will receive training in dedicated animals (oefenprotocol) prior to joining the experiments.

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.

We have performed literature studies and are in close contact with research groups that work in the same field and have related research questions. We have no indications that the suggested experiments have been previously performed.

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

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.

Studies assessing energy metabolism require individual housing of the mice in metabolic cages that might contain a roster for a max of 5 days.

After placement of jugular vein catheter, mice will be housed individually to prevent cage mates from chewing on the stitches or catheter connection point.

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?

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.

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.

Anesthesia will be administered prior to surgical procedures and termination of the mice. Means: inhalation (e.g., isoflurane) or injection (e.g., Hypnorm and Diazepam,)

Analgesia will be administered after survival surgery and during surgery under anesthesia (e.g., lymph and bile cannulation). Means: injection: (e.g., Buprenorphine)

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

We do not predict additional health deteriorations

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

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

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.

Criteria: weight loss (>10%/week), isolation, decreased locomotion, wounds, hunched back or diarrhea

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

<10% overall

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.

The highest inconvenience score of suggested experiments in this Appendix 1 is "matig", therefore the overall discomfort score will be 'matig'.

(Discomfort "matig" in 58% of animals; "licht" in 42% animals)

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee

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

Tissues/organs will be collected for subsequent analysis in the laboratory.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



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.	11800				
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	AMC				
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left;">Volgnummer</th> <th style="text-align: left;">Type dierproef</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="padding: 2px;">1</td> <td style="padding: 2px;">Effect of bacterial intervention on development of obesity and T2DM and bacterial translocation</td> </tr> </tbody> </table>	Volgnummer	Type dierproef	1	Effect of bacterial intervention on development of obesity and T2DM and bacterial translocation
Volgnummer	Type dierproef					
1	Effect of bacterial intervention on development of obesity and T2DM and bacterial translocation					

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Experimental approach:

Mice will be administered with selected bacterium or bacterial metabolite and subjected to dietary regimens (*e.g.*, chow vs high-fat diet). An alternative approach would be to eliminate bacterium of interest using bacteriophages directed against selected bacterium. **Primary outcome parameters** are body weight, glucose tolerance and insulin sensitivity (as assessed by procedures 1a-d described below).

Secondary outcome parameters Tissues will be analyzed after termination of the experiment (*e.g.*, bacterial DNA content in tissues, expression of proteins and genes involved in glucose and energy metabolism).

Following Go-No Go decision making (*i.e.*, if one of the primary outcome parameters is affected, see 3.4.3 Project proposal), we will carry out dedicated studies to further unravel the mechanism by which the intervention influences metabolic processes that are typically deranged in obesity and T2DM (procedures 3 – 5). Additionally, dedicated experiment assessing intestinal permeability will be carried out (procedure 2)

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

Procedures and justifications (J):

Supplementation or removal of bacteria.

Bacteria or bacterial metabolites will be supplemented or removed (using bacteriophages) by gavage (orogastric administration). This will require careful restraining of the mice. **(J)** Precise dosing is crucial and bacteria/bacteriophages are very sensitive to environmental exposure (e.g., cannot be exposed to oxygen) and have to be administered locally.

1 Measurements of primary outcome parameters:

a) body weight

Mice will be weighed throughout the experimental period. **(J)** It is of critical importance to closely monitor body weight in all experiments. This indicates overall health of the mice and is a crucial determinant for development of obesity.

b) Glucose tolerance testing (GTT) and Insulin tolerance testing (ITT)

Mice will be fasted prior to these tests. Blood glucose will be measured from the tip of the tail using a glucometer prior to an intraperitoneal (ip) injection or oral bolus of glucose. Subsequently, blood glucose levels will be measured from the tip of the tail using a glucometer at several time intervals after glucose administration. **(J)** This test gives a rapid and validated estimation of whole body glucose responsiveness. After recovery the same mice can be used for an ITT; Blood glucose will be measured from the tip of the tail prior to an ip injection of insulin. Blood glucose levels will be measured from the tip of the tail using a glucometer at several time intervals after insulin administration. **(J)** This test provides a validated estimation of whole body insulin responsiveness without requirement of invasive surgical procedures.

c) Tissue collection

After **a-c** have been performed, mice will be anesthetized. Tissues and organs will be removed and snap frozen in liquid nitrogen or processed according to requirements of further analysis. *Ex vivo* analysis of tissues (e.g., lipid analysis, bacterial rDNA analysis, histology, cytokine profiling, FACS analysis, protein and gene expression analysis), will **(J)** provide mechanistic insight in regulatory pathways that coordinate *in vivo* observations.

Cumulative discomfort: "licht"

Power analysis performed by us in previous mouse studies usually suggests using around 10 mice per group to obtain relevant differences in insulin sensitivity and glucose tolerance.

Group size: (based on unpublished data) Significance value: 0.05, power of the study: 0.8, effect size: 20%, standard deviation: 16% -> 10 animals per group.

2) Intestinal permeability

FITC-dextran, D-Xylose or fluorescently labeled bacteria are examples of compounds that allow for analysis of passage of molecules (either in between intestinal cells or through intestinal cells, respectively). Mice will be fasted prior to receiving an oral bolus of such a compound. Blood will subsequently be collected at several time intervals after administration. During termination of the

mice a large blood sample will be collected in which, apart from permeability markers, also blood lipids can be measured. **(J)** Translocation of FITC-dextran or D-Xylose from the intestine into the blood stream is a measure of intestinal permeability and reflects gut barrier function.

Mice will be anesthetized and the common mesenteric lymph duct will be exposed by removal of surrounding tissues. A small catheter will be inserted into the lymph duct through a small incision and fixed to the lymph duct using tissue glue. Mice will remain anesthetized throughout the experiment and will receive an analgesic. Lymph will be collected at several time intervals after start of the experiment. After collection of the last sample, mice will be terminated. **(J)** Collected lymph will be analyzed for lipid content, presence of bacteria and immune cells. We hypothesize that translocated bacteria or bacterial products enter the system via the lymphatic system. This procedure will provide crucial insight in the route of bacterial entrance into the system.

Cumulative discomfort: "matig"

Group size: Significance value: 0.05, power of the study: 0.8, effect size: 25%, standard deviation: 23% -> 13 animals per group

3 Energy homeostasis

Metabolic cages

Whole body energy metabolism will be assessed using an open circuitry calorimetric system (PhenoMaster system) or comparable device. Mice will be single housed in and habituated to the cages prior to the start of the analysis. Individual food intake will be assessed. **(J)** Alterations in microbiome composition have been associated with changes in energy homeostasis. Metabolic cages allow for sensitive analysis of energy homeostasis in a minimally invasive manner.

Cumulative discomfort: "matig"

Group size: Significance value: 0.05, power of the study: 0.8, effect size: 25%, standard deviation: 20% -> 10 animals per group

4 Glucose/insulin homeostasis

4a) Whole body glucose tolerance test

Mice will be fasted prior to the test. Mice are injected intraperitoneally with a low dose of stable isotope-labeled glucose. Before and every 30 minutes for 6 hours, blood glucose concentrations are measured in blood through tail-tip bleeding. At the same time points, blood spots are taken on filter paper. After the test a blood sample will be taken from the tail vein. **(J)** This test monitors glucose homeostasis under basal conditions and has the advantage that mice are not terminated after the test but can be reused for other tests. (Please note that this test differs from the test described in **1b**)

4b) Hyperinsulinemic euglycemic clamp

Mice will be equipped with a jugular vein cannula that allows for non-invasive administration of solutions in awake mice. In short, mice will be anesthetized and a cannula will be inserted and fixed into the jugular vein. The free end of the cannula will subsequently be tunneled to a small incision in the neck. The cannula will be attached to the skull using acrylic glue. Mice will be administered an analgesic and allowed to recover for 3-6 days prior to infusion experiments. After placement of the jugular vein cannula, mice will be housed individually to prevent cage mates from chewing on the cannula or stitches.

Mice will be fasted prior to the test. Mice will be infused with solutions containing insulin and/or

Cumulative discomfort: "licht"

Group size: [redacted] Significance value: 0.05, power of the study: 0.8, effect size: 25%, standard deviation: 23% -> 13 animals per group

5d Bile salt flux

Mice will be intravenously administered with a stable (non-radioactive) isotope-labeled bile salt. Blood will be collected at several time points after administration. At the end of the experiment, mice will be submitted to bile duct ligation to collect bile and subsequently terminated. **(J)** Bile salt composition is in great part determined by the gut microbiota. In addition to *ex vivo* determination of bile salt composition in several compartments (*e.g.*, feces, plasma), flux analysis of bile salts (*e.g.*, of cholate) *in vivo* will demonstrate if altered microbiome composition affects bile salt turnover.

Cumulative discomfort: "licht"

Group size: (Boesjes et al 2014 PloS One) Significance value: 0.05, power of the study: 0.8, effect size: 25%, standard deviation: 23% -> 13 animals per group

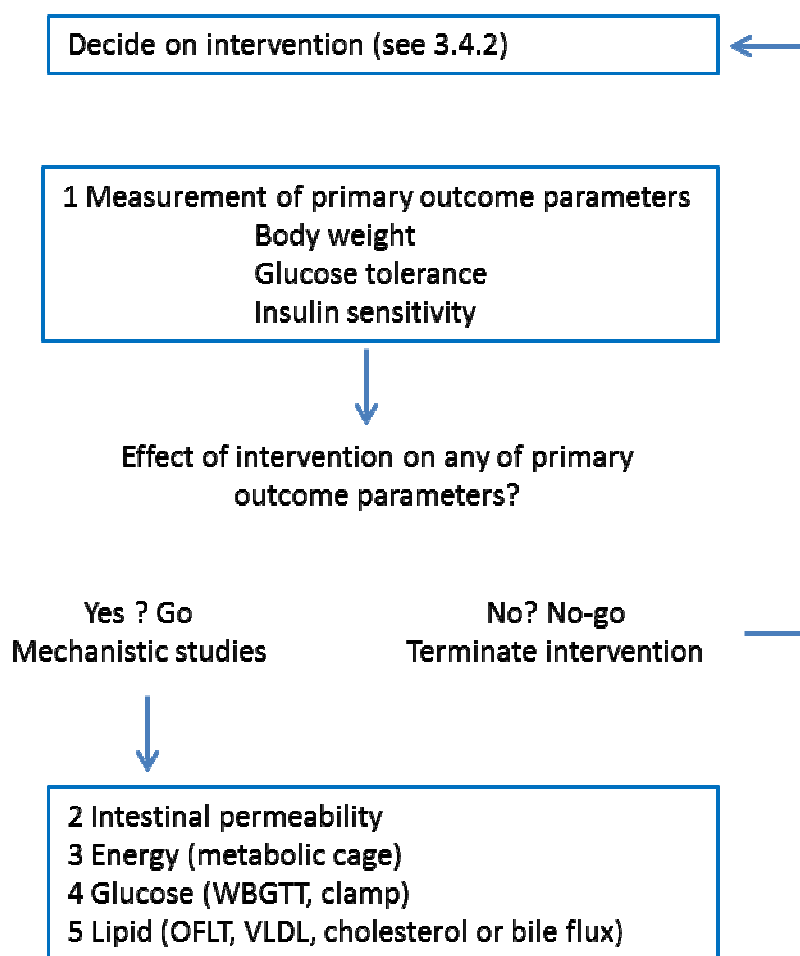


Figure 1. Summary of Go and No-go approach (see project proposal 3.4.3). Numbers in flow

scheme correspond with the animal experiments as indicated in the Appendix

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

Statistical groupsize calculation is used to minimize the total number of animals required (Van Lenth the American statistician 2001 Some practical guidelines for effective sample size determination). The extensive experience of our laboratory will be used in minimizing the required number of animals per group as much as possible. Animals will be followed up longitudinally and used to analyze multiple aspects of glucose, lipid and bile acid metabolism. Experiments are designed to extract the maximum amount of information out of each animal without causing unnecessary discomfort and discomfort beyond 'matig'. The number of animals required for these experiments are based on sample-size calculations using historical published and unpublished data from our laboratory, from our collaborators and from literature.

B. De dieren

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

Species: mouse

Origin: commercial providers, collaborating research groups

Age: adult mice (range ~4 and 20 weeks)

Gender: The experiments described in this proposal will only make use of male animals.

Reasons:

1) The objective and sub-goals do not include any aspect on gender. It is not within the scope of this proposed research to include the element of gender because it does not contribute to answering any of the sub-goals nor the objective. 2) Our main objective is to study the role of gut bacteria in development of obesity and type 2 diabetes. In order to do so, one of the requirements is to have a validated model (=male mice) that develop the pathology in standardized condition (eg, high-fat diet). Only under these conditions, it will be possible to study the additional role of bacteria. (Since female mice generally respond differently to HFD feeding compared to males (eg, female mice seem to be fairly protected from adipose tissue inflammation, glucose intolerance, hyperinsulinemia and islet hypertrophy), female animals are a less suitable models system. Use of female mice would require validation, optimization and standardization of all procedures. It is not within the scope of this proposed research (nor do we have the financial means or time to do so) to include the optimization and standardization of new animal models, new diets, new disease phenotypes, new measurement techniques and new surgeries.

Estimated numbers:

Since we cannot predict if bacteria/bacteriophages will be successful (as determined using methods described under Beoogde handelingen 1a-d), we will here assume that all interventions will be successful and therefore that all suggested experimental procedures will be carried out (all go).

The estimated maximal number and associated discomfort for individual animals for procedure 1 will be 210, discomfort "licht":

10 mice per group * 3 groups (control, heat-inactivated control, active bacteria) (10*3=30); estimated number of bacteria/bacterial metabolites or bacteriophages assessed in five year license is 7 (30*7=210)

The estimated maximal number and associated discomfort for individual animals for procedure 2 will be 273, discomfort "matig".

13 mice per group * 3 groups (control, heat-inactivated control, active bacteria) ($13*3=39$); estimated number of bacteria/bacterial metabolites or bacteriophages assessed in five year license is 7 ($39*7=273$)

The estimated maximal number and associated discomfort for individual animals for procedure 3 will be 231, discomfort "matig":

10 mice per group * 3 groups (control, heat-inactivated control, active bacteria) ($10*3=30$); estimated number of bacteria/bacterial metabolites or bacteriophages assessed in five year license is 7 ($30*7=210$)

The estimated maximal number and associated discomfort for individual animals for procedure 4 will be 231, discomfort "matig":

11 mice per group * 3 groups (control, heat-inactivated control, active bacteria) ($11*3=33$); estimated number of bacteria/bacterial metabolites or bacteriophages assessed in five year license is 7 ($33*7=231$)

The estimated maximal number and associated discomfort for individual animals for procedure 5a+b will be 231, discomfort "matig":

11 mice per group * 3 groups (control, heat-inactivated control, active bacteria) ($11*3=33$); estimated number of bacteria/bacterial metabolites or bacteriophages assessed in five year license is 7 ($33*7=231$)

The estimated maximal number and associated discomfort for individual animals for procedure 5c will be 273, discomfort "licht":

13 mice per group * 3 groups (control, heat-inactivated control, active bacteria) ($13*3=39$); estimated number of bacteria/bacterial metabolites or bacteriophages assessed in five year license is 7 ($39*7=273$)

The estimated maximal number and associated discomfort for individual animals for procedure 5d will be 273, discomfort "licht":

13 mice per group * 3 groups (control, heat-inactivated control, active bacteria) ($13*3=39$); estimated number of bacteria/bacterial metabolites or bacteriophages assessed in five year license is 7 ($39*7=273$)

Estimated number of mice: 1701 mice (not corrected for HEP)

Maximum discomfort: "matig" (Discomfort "matig" in 58% of animals; "licht" in 42% animals)

945 mice (=55%) have discomfort 'matig'. A maximum of 10% of mice in this category might reach a HEP. We therefore calculate an additional 10% of mice for this category (=95 mice). The discomfort matig will therefore be 58%.

The total number of mice is 1701 + 95 = 1796

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.

Reduce:

Several of the suggested procedures (e.g., OGTT/ITT/OFLT) can be carried out within one animal experiment thereby reducing animal numbers. Other experiments, however, require dedicated groups of mice because the procedure results in termination of the animal (e.g., euglycemic clamps, VLDL secretion, lipid fluxes). This unfortunately prevents the possibility to reuse the animal for additional experimental procedures. To maximize usage of materials (e.g., blood or tissues) collected, these will be available to collaborating research groups.

Using 'Go' and 'No-go' criteria (see section A), we will proceed (or not) with in-depth follow-up experiments and decide which experiments are required and which ones can be skipped. This allows for development of dedicated experiments thereby reducing the number of mice required to answer the scientific questions.

All procedures will be carried out by well-trained, experienced technicians, postdocs and students. This will significantly reduce failure of experimental procedures (and thereby loss of animals).

Since restraining (for gavage) can be stressful to unaccustomed animals, we will perform daily placebo gavages prior to starting the experiments in order to habituate the mice, thereby reducing the amount of stress during the experiment. While this might rather amplify the cumulative amount of stress for the mice, the results will diverge less, which will contribute to a reduction of the number of animals needed.

Refine:

Mice will be acclimated prior to the experiments. Except for metabolic cage experiments, mice will be housed in groups. We will work with male mice that sometimes fight. This will be closely monitored and aggressors will be separated from the groups in case of severe fighting.

Surgical procedures and/or repetitive procedures that might cause pain or serious discomfort (e.g., repetitive blood sampling) to the animal will be performed under appropriate soothing conditions (i.e., administration of anesthetic and/or analgesic).

All procedures will be carried out and supervised by well-trained, experienced technicians, postdocs and students. This will significantly reduce complications and unnecessary stress on the

animals.

Replace:

Methods aiming to reduce or replace suggested experiments include *in vitro* (in organoids or cell models) assessment of efficacy, safety and effect of bacteria and compounds of interest. Although these studies will be carried out prior to the animal experiments, they cannot yet fully replace studies that require multicellular, complex systems.

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.

We do not propose experiments that require materials that are damaging to the environment. We will make sure to order bacteria and compounds in amounts sufficient for the suggested experiments thereby reducing waste. Any leftover materials will be disposed of according to health and safety guidelines.

To reduce stress during the intervention, we would like to refer to our reduction points:

Since restraining (for gavage) can be stressful to unaccustomed animals, we will perform daily placebo gavages prior to starting the experiments in order to habituate the mice, thereby reducing the amount of stress during the experiment. While this might rather amplify the cumulative amount of stress for the mice, the results will diverge less, which will contribute to a reduction of the number of animals needed.

Except for metabolic cage and hyperinsulinemic euglycemic clamp experiments, mice will be housed in groups. We will work with male mice that sometimes fight. This will be closely monitored and aggressors will be separated from the groups in case of severe fighting.

Surgical procedures and/or repetitive procedures that might cause pain or serious discomfort (e.g., repetitive blood sampling) to the animal will be performed under appropriate soothing conditions (i.e., administration of anesthetic and/or analgesic).

All procedures will be carried out and supervised by well-trained, experienced technicians, postdocs and students. This will significantly reduce complications and unnecessary stress on the animals. Inexperienced participants to the studies will receive training in dedicated animals (oefenprotocol) prior to joining the experiments.

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.

We have performed literature studies and are in close contact with research groups that work in the same field and have related research questions. We have no indications that the suggested experiments have been previously performed.

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

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.

Studies assessing energy metabolism require individual housing of the mice in metabolic cages that might contain a roster for a max of 5 days.

After placement of jugular vein catheter, mice will be housed individually to prevent cage mates from chewing on the stitches or catheter connection point.

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?

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.

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.

Anesthesia will be administered prior to surgical procedures and termination of the mice. Means: inhalation (e.g., isoflurane) or injection (e.g., Hypnorm and Diazepam,)

Analgesia will be administered after survival surgery and during surgery under anesthesia (e.g., lymph and bile cannulation). Means: injection: (e.g., Buprenorphine)

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

We do not predict additional health deteriorations

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

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

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.

Criteria: weight loss (>10%/week), isolation, decreased locomotion, wounds, hunched back or diarrhea

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

<10% overall

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.

The highest inconvenience score of suggested experiments in this Appendix 1 is "matig", therefore the overall discomfort score will be 'matig'.

(Discomfort "matig" in 58% of animals; "licht" in 42% animals)

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee

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

Tissues/organs will be collected for subsequent analysis in the laboratory.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.



Ja

Format DEC-advies

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

A. Algemene gegevens over de procedure

Bij de punten 1 t/m 7 dienen altijd de gevraagde gegevens te worden ingevuld.

1. Aanvraagnummer
2. Titel van het project **Role of intestinal bacteria in development of diabetes in obesity**
3. Titel van de NTS **De rol van darmbacteriën bij diabetes en overgewicht**
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning**
 - ~~wijziging van vergunning met nummer~~
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC **DEC-AMC**
 - telefoonnummer contactpersoon 
 - e-mailadres contactpersoon 
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken **10-11-2016**
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van / tot
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag
 - advies aan CCD
7. Afstemming IvD

De relevante onderdelen van de vergunningaanvraag (projectvoorstel en bijlagen) zijn in een traject voorafgaand aan de indiening ervan bij de DEC in overleg met de IvD tot stand gekomen.
8. Eventueel horen van aanvrager **n.v.t.**
 - Datum
 - Plaats
 - Aantal aanwezige DEC-leden
 - Aanwezige (namens) aanvrager
 - Gestelde vraag / vragen
 - Verstrekt(e) antwoord(en)
 - Het horen van de aanvrager heeft wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag
9. Correspondentie met de aanvrager **n.v.t.**
 - Datum
 - Gestelde vraag/vragen
 - Datum antwoord

- Verstrek(e) antwoord(en)
- De antwoorden hebben wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag

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

- Aard expertise
- Deskundigheid expert
- Datum verzoek
- Strekking van het verzoek
- Datum expert advies
- Advies expert

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Is het project vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)? Indien van toepassing, licht toe waarom het project niet vergunningplichtig is en of daar discussie over geweest is.

>Ja

Indien niet vergunningplichtig, ga verder met onderdeel E. Advies.

2. De aanvraag betreft

> een nieuwe aanvraag.

3. Is de DEC competent om hierover te adviseren?

> Ja

4. Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom.

> Nee

C. Beoordeling (inhoud)

1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft (*Zie handreiking 'Invulling definitie project'; zie bijlage I voor toelichting en voorbeeld*).

Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling (het verkrijgen van inzicht in de rol van darmbacteriën (microbiota) in de ontwikkeling van obesitas en type 2 diabetes) en kan getypeerd worden als een project met twee subdoelen, die tijds- en uitkomstafhankelijk zijn. De twee subdoelen zijn gericht op:

- i) microbiota gemedieerde ontwikkeling van obesitas en type 2 diabetes;
- ii) microbiota gemedieerde effecten op bacteriële translocatie en darmbarrièrefunctie.

Het eerste subdoel wordt behaald door mechanistische studies in muizen waarin onderzocht wordt hoe bacteriën en bacteriële metabolieten bijdragen aan het ontwikkelen van obesitas en type 2 diabetes.

Voor het tweede subdoel wordt onderzocht hoe bacteriën en bacteriële metabolieten die zich kunnen verplaatsen van het darmlumen naar de periferie, en hoe deze translocatie de immuunsignaleringsroutes kan beïnvloeden en vervolgens de ontwikkeling van deze aandoeningen versterkt of juist remt. Het eerste subdoel levert informatie over het effect van de bacterie (of zijn metabolieten) op het ontwikkelen van deze aandoeningen, waarna in het tweede subdoel het onderliggende mechanisme door middel van translocatie verder wordt onderzocht. De subdoelen zijn volledig en duidelijk uitgewerkt. Dit maakt de aanvraag tot een navolgbaar geheel. Het project is haalbaar, afgaande op het voorwerk en ervaring van deze onderzoekers, de omvang en de aangegeven tijdsspanne.

Het is helder welke handelingen en ongerief individuele dieren zullen ondergaan in de dierproeven die nodig zijn om de subdoelen te bereiken.
Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

2. Geef aan of er aspecten in deze aanvraag zijn die niet in overeenstemming zijn met wet- en regelgeving anders dan de Wod? Denk hierbij aan bijvoorbeeld de Flora en fauna wet en Wet dieren. Indien van toepassing, leg uit om welke aspecten het gaat en waarom hier sprake van is.
 - > Niet, voor zover kan worden opgemaakt uit de aanvraag.
3. Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Nevendoelstellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel.
 - > De aangekruiste doelcategorieën "fundamenteel" en "translationeel onderzoek" sluiten aan bij de hoofddoelstelling. Er wordt fundamenteel onderzoek gedaan hoe darmbacteriën de immuunrespons kunnen beïnvloeden door de translocatie van het darmlumen naar de periferie. Het translationele gedeelte van deze studie gebruikt ziektemodellen om dit effect van bacteriën op de ziekte te bestuderen. Er zullen interventies worden toegepast door de bacterie-stam te verwijderen of juist toe te dienen. Deze kennis kan bijdragen aan het ontwikkelen van nieuwe behandelmethodes voor obesitas en type 2 diabetes.

Belangen en waarden

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een reële relatie is tussen beide doelstellingen (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C4; zie bijlage 1 voor voorbeeld*).
 - > Het directe doel van het project is het krijgen van inzicht in de rol van darmmicrobiota in de ontwikkeling van obesitas en type 2 diabetes (translationeel onderzoek). Er wordt fundamenteel onderzoek uitgevoerd naar het onderliggende mechanisme waarbij de focus ligt op de capaciteit van de bacteriën om van het darmlumen naar de periferie te migreren en zo immunologische processen te beïnvloeden.

Het uiteindelijke doel is het verkrijgen van nieuwe startpunten voor het ontwikkelen van nieuwe behandelingen voor obesitas en type 2 diabetes.

Het betreft hier zowel fundamenteel als translationeel onderzoek. Het directe doel vormt een logisch en onmisbaar deel van de route naar het uiteindelijke doel.
5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 2.B en tabel 1; zie bijlage 1 voor voorbeeld*).
 - > De belangrijkste belanghebbenden in dit project dat gericht is op het verkrijgen van inzicht in de rol van darmbacteriën in de ontwikkeling van obesitas en type 2 diabetes, zijn de proefdieren, de onderzoekers, de mensen met obesitas en patiënten met type 2 diabetes.

Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: de dieren die gebruikt worden zullen licht (45%) tot matig (55%) ongerief hebben. De verschillende methodes en behandelingen worden uitgebreid besproken in de bijlage "Beschrijving dierproeven" met het bijbehorende cumulatief ongerief per methode.

Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: de onderzoekers zullen kennis verkrijgen. Ook zullen de carrièremogelijkheden van de onderzoekers verbeteren door publicaties en mogelijk patenten.

Waarden die voor de mensen met obesitas en diabetes type 2 patiënten bevorderd worden: het ontwikkelen van een nieuwe behandelmethodede om deze ziektes te bestrijden.

6. Geef aan of er sprake kan zijn van substantiële milieueffecten. Zo ja, benoem deze, leg uit waarom daar sprake van kan zijn en of geef aan of deze effecten afgedekt worden door specifieke wetgeving.

> Er is geen sprake van substantiële milieueffecten, voorzover de DEC dit kan overzien.

Proefopzet en haalbaarheid

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw antwoord toe. (Zie *Praktische handreiking ETK: Stap 1.C5*).

> De IvD ziet erop toe dat alle personen die bij dit onderzoek betrokken zullen zijn, zowel de analisten en onderzoekers die de experimenten gaan uitvoeren, als de onderzoekers die het project hebben vormgegeven en opgeschreven, voldoen aan de wettelijke eisen van deskundigheid en kennis.

Dit project is een voortzetting van een bestaande onderzoekslijn van deze onderzoeksgroep [REDACTED]. Binnen de onderzoeksgroep, de afdeling en hun samenwerkingsverbanden is er voldoende expertise in huis om alle voorgestelde proeven uit te kunnen voeren en is er voldoende kunde in huis om aan de 3V beginselen te kunnen voldoen.

Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw antwoord toe. (Zie *Praktische handreiking ETK: Stap 1.C6*).

> De opzet van het project en van de experimenten die worden ingezet voor elk van de subdoelen, is logisch en goed te begrijpen. Er is hier sprake van een project met heldere onderzoeksopzet, die aansluit bij de gestelde doelen. De DEC verwacht dat de doelstellingen bereikt kunnen worden.

Welzijn dieren

8. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. Beoordeel of de keuze hiervoor voldoende wetenschappelijk is onderbouwd en de aanvrager voldoet aan de in de Wod voor de desbetreffende categorie genoemde beperkende voorwaarden. Licht uw antwoord toe (Zie *Praktische handreiking ETK: Stap 1.C1*; zie bijlage I voor toelichting en voorbeelden).

- Bedreigde diersoort(en) (10e, lid 4)
- Niet-menselijke primaten (10e)
- Dieren in/uit het wild (10f)

- Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn)
- Zwerfdieren (10h)
- Hergebruik (1e, lid 2)
- Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
- Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
- Dodingsmethode niet volgens bijlage IV richtlijn (13c, lid 3)

> Er is geen sprake van bijzondere dieren, omstandigheden of behandelingen.

9. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de richtlijn. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan omdat het om wetenschappelijke redenen noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht toe waarom wel/niet.

> Er is voldaan aan bijlage III

10. Beoordeel of het ongerief als gevolg van de dierproeven realistisch is ingeschat en geclassificeerd, waarbij uitgegaan wordt van de kans op angst, pijn, stress en/of ziekte bij individuele dieren (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*).

> Ongeriefinschatting is in overleg met de IvD tot stand gekomen, met gebruikmaking van de Toelichting Codering Ongerief. De DEC is van mening dat het ongerief realistisch is ingeschat en geclassificeerd.

11. Geef aan op welke wijze de integriteit van de dieren wordt aangetast (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*). (*zie bijlage I voor voorbeeld*).

> De "heelheid" van het dier wordt nergens in die mate aangetast dat sprake is van vermindering of ontneming van soortspecifieke eigenschappen, ernstige pijn of langdurig ongerief.

12. Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. Licht uw antwoord toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

> Het humane eindpunt is helder gedefinieerd, en de inschatting van het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken (>10% gewichtsverlies/week, afzonderen, verminderde activiteit, wondjes, bolle rug of diarree) lijkt op basis van de ervaring van de onderzoeksgroep, realistisch ingeschat (<10% van de dieren).

13. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn? Onderbouw uw antwoord (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

> De aanvrager geeft aan dat in vitro methodes gebruikt worden waar het kan maar dat deze niet het complete multicellulaire, complexe systeem kunnen nabootsen dat betrokken is bij het ontwikkelen van deze aandoeningen. Daarom zijn in vivo proeven onvermijdelijk.

14. Beoordeel of het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en of er een heldere strategie is om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Onderbouw uw antwoord (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

> De groep heeft veel ervaring met de assays en de ziektemodellen waardoor ze een realistische inschatting kunnen maken van (klinisch/biologisch) relevante verschillen en de te verwachten variatie. Met behulp van deze informatie is voor elk van de experimenten een minimale groeps grootte berekend, uitgaande van 80% power en een tweezijdig significantieniveau van 0.05.

15. Beoordeel of het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project zodanig is opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd? Licht uw antwoord toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

> Interventies met bacteriën of bacteriële metaboliëten worden gebaseerd op gegevens verkregen uit analyses van darm- en vetweefsel van gezonde mensen ten opzichte van mensen met obesitas/type 2 diabetes. Hierdoor wordt getracht bacteriestammen te selecteren die een hoge potentie lijken te hebben om daadwerkelijk een effect te hebben. Daarna wordt een interventie gestart waar bekeken wordt of de interventie een significant effect heeft op één van de vastgestelde criteria die samenhangen met de ontwikkeling van obesitas en/of type 2 diabetes. Daarna zal pas verder gegaan worden met de verdere analyse van het geïnduceerde fenotype van de ziekte op verschillende manieren. Het inbouwen van verschillende Go/No Go beslissingen borgt de verfijning omdat alleen de vervolg analyses matig ongerief kunnen veroorzaken in de dieren. Er wordt zo voorkomen dat dieren onnodig aan deze analyses onderworpen worden. Het humane eindpunt voor het ziektemodel is duidelijk geformuleerd, waarmee de mate van verfijning verder is geborgd.

16. Beoordeel, indien het wettelijk vereist onderzoek betreft, of voldoende aannemelijk is gemaakt dat er geen duplicatie plaats zal vinden en of de aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om tijdens de uitvoering van het project te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt. Onderbouw uw antwoord.

> n.v.t.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

17. Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd? Geef ook aan welke maatregelen verder zijn getroffen om bij fok of aankoop van dieren het aantal in voorraad gedood te beperken (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3; zie bijlage I voor voorbeeld*).

> In dit onderzoek wordt enkel gebruik gemaakt van mannelijke muizen. De onderzoekers geven de volgende wetenschappelijke reden, waardoor de DEC deze keuze voldoende onderbouwd vindt:

Vrouwelijke muizen reageren anders op een hoog vet dieet en zijn meer beschermd tegen het ontwikkelen van obesitas en type 2 diabetes. Hierdoor zijn vrouwelijke muizen minder geschikt als modeldier. Het model is volledig gevalideerd in mannelijke muizen en dus niet in vrouwelijke dieren vanwege de verwachte ongeschiktheid.

18. Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef). Indien dieren gedood worden, geef aan of en waarom dit noodzakelijk is voor het behalen van de doelstellingen van het project. Indien dieren gedood worden, geef aan of er een voor de diersoort passende dodingsmethode gebruikt wordt die vermeld staat in bijlage IV van de richtlijn. Zo niet, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht dit toe. Indien van toepassing, geeft ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

> De dieren worden in het kader van de proef gedood volgens een methode van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Doden is noodzakelijk omdat in het kader van het experiment de weefsels uit het dier moeten worden gehaald voor analyse.

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

> n.v.t.

NTS

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

> Ja, deze is in overleg met de afdeling communicatie van de vergunninghouder bewerkt met het oog op de begrijpelijkheid.

D. Ethische afweging

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

Rechtvaardigt het verkrijgen van inzicht in de rol die darmbacteriën of hun metaboliëten spelen in het ontwikkelen van obesitas en type 2 diabetes, het geringe (45%) tot matige (55%) ongerief dat de 1796 muizen als proefdieren in het onderzoek zullen ervaren?

2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn ten opzichte van elkaar af. Om dit proces te vergemakkelijken, kunt u de belangrijkste belanghebbenden en de belangrijkste waarden die in het geding zijn waarderen. U kunt dit verwoorden in termen van gering, matig of veel/ernstig voordeel of nadeel. Geef aan waarom de DEC bevordering van waarden (baten) voor de ene belanghebbende prevaleert boven de aantasting van waarden (kosten) voor de andere belanghebbende (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.B; zie bijlage I voor voorbeelden*).

De belangrijkste belanghebbenden in dit fundamentele en translationele project dat gericht is op het verkrijgen van inzicht in de rol die darmbacteriën of hun metaboliëten spelen in het ontwikkelen van obesitas en type 2 diabetes in een muizenmodel, zijn op korte termijn de proefdieren en de onderzoekers.

Op de wat langere termijn bestaan de belanghebbenden uit de groepen patiënten die lijden aan obesitas en/of type 2 diabetes.

De maximaal 1796 proefdieren worden door dit onderzoek geschaad omdat het stress en pijn (vasten, verblijven in een metabole kooi, plaatsing canule bovenop de kop) veroorzaakt. De dieren zullen licht (45%) tot matig (55%) ongerief ondergaan.

De andere groep direct belanghebbenden, namelijk de onderzoekers, zullen kennis en inzichten krijgen over de rol van bacteriën en/of bacteriële metaboliëten in de ontwikkeling van obesitas en type 2 diabetes. Aanvullende belangen van onderzoekers zouden kunnen zijn dat meewerken aan dit onderzoek hun carrièremogelijkheden vergroot door publicaties en dat zij nieuwe vindingen mogelijk kunnen patenteren.

De waarden en belangen van patiënten spelen een belangrijke rol in het translationele deel van dit onderzoek. De bruikbaarheid van dit idee kan een belangrijke bijdrage leveren aan het daadwerkelijk ontwikkelen van deze therapie.

Het geringe tot matige ongerief dat de dieren zullen ondergaan, acht de DEC gerechtvaardigd door de verwachte gunstige gevolgen van dit onderzoek. De DEC waardeert het aantonen van de interventie op de microbiota van de darm als behandeling voor obesitas en type 2 diabetes alsmede het wetenschappelijke belang van het fundamentele gedeelte (het verkrijgen van mechanistisch inzicht in de eerder waargenomen associatie van de samenstelling van de darmmicrobiota met deze aandoeningen), als het meest zwaarwegende gevolg dat tegenover het ongerief van de 1796 muizen staat.

3. Beantwoord de centrale morele vraag. Maak voor het beantwoorden van deze vraag gebruik van bovenstaande afweging van morele waarden. Maak daarnaast gebruik van de volgende moreel relevante feiten: belang onderzoek (C4), kennis en kunde van betrokkenen (C7), haalbaarheid doelstellingen (C8), categorieën en herkomst dieren (C9), 3V's (C14-C18), ongerief (C10-13 en C19) en relevante wet en regelgeving (C2). Onderbouw hoe al deze elementen zijn meegewogen bij de beantwoording van de centrale morele vraag, zodanig dat het navolgbaar is zonder gedetailleerde kennis te hebben van het projectvoorstel (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.C; zie bijlage 1 voor voorbeeld*).

De rol van darmbacteriën bij diabetes en overgewicht

De DEC is van mening dat het belang van het verkrijgen van inzicht in de rol die darmbacteriën en hun metaboliëten kunnen spelen in het ontwikkelen van obesitas en type 2 diabetes en daarbij het inzicht wat een interventie met specifiek bacteriestammen en hun metaboliëten voor effect kan hebben in een muizenmodel voor obesitas en/of type 2 diabetes, het lichte (45%) tot matige (55%) ongerief dat de in totaal 1796 muizen als proefdieren in dit onderzoek zullen ervaren, rechtvaardigt.

De DEC acht het aannemelijk dat de doelstelling behaald zal worden. Dit project heeft zowel een fundamenteel als translationeel karakter. Eerst zal bepaald worden of een interventie met een bacteriestam effect heeft op parameters die betrokken zijn bij het ontwikkelen van deze aandoeningen. Daarna zal het effect nader bestudeerd worden en daarnaast zal er ook fundamenteel onderzoek gedaan worden naar hoe bacteriën of hun metaboliëten de darmwand passeren en in de periferie terechtkomen en hoe deze translocatie de immuunrespons binnen deze ziektes kan beïnvloeden.

De DEC is bovendien van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en dat de gekozen strategie en de experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van deze doelstellingen binnen de kaders van het project. De DEC is er verder van overtuigd dat de aanvrager voldoende kennis en kunde heeft om de doelstelling te behalen. Tevens verwacht de DEC op basis van deze aanvraag dat zowel het ongerief van de dieren alsmede het aantal benodigde dieren tot een minimum beperkt blijft. De aanvrager heeft volgens de DEC overtuigend aangegeven dat gebruik van muizen voor het behalen van het directe doel noodzakelijk is en dat er geen geschikte proefdiervrije alternatieven mogelijk zijn.

Gezien het bovenstaande is de DEC van mening dat dit project het gebruik van proefdieren rechtvaardigt.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

- De DEC adviseert de vergunning te verlenen.**

- De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
 - Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.

 - Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist

 - Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...

- De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
 - De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen

 - De volgende doorslaggevende ethische bezwaren: ...

 - De volgende tekortkomingen in de aanvraag: ...

2. Het uitgebrachte advies kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt in de DEC. Indien gebaseerd op een meerderheidsstandpunt, specificeer het minderheidsstandpunt op het niveau van verschillende belanghebbenden en de waarden die in het geding zijn (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.A; zie bijlage I voor voorbeeld*).

Het advies is in de DEC vergadering unaniem tot stand gekomen.

3. Omschrijf de knelpunten/dilemma's die naar voren zijn gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies zowel binnen als buiten de context van het project (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.B*).

Dit projectvoorstel heeft geen knelpunten of dilemma's opgeleverd bij het opstellen van het advies zowel binnen als buiten de context van het project.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academisch Medisch Centrum

[REDACTED]

Meibergdreef 31

1105 AZ AMSTERDAM



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD118002016794

Bijlagen

2

Datum 20 december 2016

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 16 december 2016. Het gaat om uw project "Role of intestinal bacteria in development of diabetes in obesity". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD118002016794. 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. U ontvangt binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. Als wij nog informatie van u 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 voldoen, 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.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:

20 december 2016

Aanvraagnummer:

AVD118002016794

Datum:
20 december 2016
Aanvraagnummer:
AVD118002016794

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 11800
Naam instelling of organisatie: Academisch Medisch Centrum
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 343362777
Straat en huisnummer: Meibergdreef 31
Postcode en plaats: 1105 AZ AMSTERDAM
IBAN: NL68TABO0136166741
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: AMC Crediteurenadministratie

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Datum:
20 december 2016
Aanvraagnummer:
AVD118002016794

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Afdeling: [REDACTED]
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 januari 2017
Geplande einddatum: 1 januari 2022
Titel project: Role of intestinal bacteria in development of diabetes in obesity
Titel niet-technische samenvatting: De rol van darmbacteriën in de ontwikkeling van diabetes en overgewicht
Naam DEC: Dierexperimentencommissie AMC
Postadres DEC: Meibergdreef 31, 1105AZ Amsterdam
E-mailadres DEC: [REDACTED]

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 935,-
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: Voorzitter IvD
Plaats: Amsterdam
Datum: 16 december 2016

Datum:
20 december 2016
Aanvraagnummer:
AVD118002016794



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

[REDACTED]
Meibergdreef 9
1105 AZ AMSTERDAM
[POSTNET]

**Centrale Commissie
Dierproeven**
Postbus 20401
2500 EK Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD118002016794
Bijlagen
2

Datum 20 december 2016
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 20 december 2016
Vervaldatum: 19 januari 2017
Factuurnummer: 16700794
Ordernummer: 7195

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD118002016794	€ 935,00

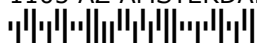
Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL29INGB 070.500.1512 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93144, 2509 AC te 's Gravenhage.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academisch Medisch Centrum

Meibergdreef 31
1105 AZ AMSTERDAM



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD118002016794

Datum 4 januari 2017
Betreft aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 16 december 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Role of intestinal bacteria in development of diabetes in obesity" met aanvraagnummer AVD118002016794. 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

In de Bijlage Dierproeven geeft u aan dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd volgens Bijlage III van de richtlijn (vraag F). Er zijn echter dieren die individueel gehuisvest worden, wat niet volgens Bijlage III is. Bijvoorbeeld bij het huisvesten in metabole kooien. Kunt u aangeven of er hier sprake is van een metabole kooi waarbij de dieren op een roosterbodem gehuisvest zijn en in dat geval, hoe lang de dieren hierin gehuisvest zijn. De afwijkende huisvesting geldt ook voor de dieren die na de vena jugularis canulatie individueel gehuisvest zijn. Kunt u dit in een nieuwe Bijlage Dierproeven aanpassen?

Verder geeft u aan dat 55% van de dieren matig en 45% licht ongerief zullen ondervinden. Uitgaande van 1701 dieren klopt dit inderdaad. U wilt echter 95 dieren toevoegen, wat een totaal van 1796 dieren oplevert. Kunt u het percentage van het ongerief aanpassen?

Het ongerief benoemt u ook in de NTS. Wilt u daarnaast de zin in 3.6 ook aanpassen: "De dieren worden na afloop van de proeven gedood afgemaakt."? In de NTS beschrijft u onder punt 4.3 dat de dieren in groepen worden gehuisvest, wat niet voor alle dieren geldt. Wilt u een nieuwe NTS sturen waarin u de genoemde punten heeft aangepast?

Datum:
4 januari 2017
Aanvraagnummer:
AVD118002016794

Leges

De leges die u verschuldigd bent zijn nog niet door ons ontvangen of de betaling is nog niet verwerkt. Uw aanvraag is niet compleet als de leges niet zijn ontvangen.

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. Stuur u het per post op, gebruik dan het formulier dat u bij deze brief krijgt.

Wanneer een beslissing

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

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



Melding bijlagen

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

Naam instelling: Academisch Medisch Centrum

Adres:

Postcode en plaats:

Aanvraagnummer: AVD118002016794

2 Bijlagen

Welke bijlagen stuurt u mee?

Vink de bijlagen aan of vul de naam of omschrijving in.

Projectvoorstel

Beschrijving Dierproeven

Niet-technische samenvatting

Melding Machtiging

Aanvraagformulier

.....

.....

.....

Datum:

4 januari 2017

Aanvraagnummer:

AVD118002016794

3 Ondertekening

Naam:

Datum: - -

Handtekening:

Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:
Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academisch Medisch Centrum

Meibergdreef 31
1105 AZ AMSTERDAM



**Centrale Commissie
Dierproeven**
Postbus 20401
2500 EK Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
Info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD118002016794
Bijlagen
1

Datum 6 februari 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 16 december 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Role of intestinal bacteria in development of diabetes in obesity" met aanvraagnummer AVD118002016794. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 10 januari 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Dit betrof de afwijkende huisvesting van de dieren, het te verwachten ongerief en een nieuwe NTS. Bijlage 3.4.4.1 en de Niet Technische Samenvatting zijn aangepast.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning.

Met het oog op artikel 10a, lid 1, zijn er algemene voorwaarden gesteld.

U kunt met uw project "Role of intestinal bacteria in development of diabetes in obesity" starten. De vergunning wordt afgegeven van 7 februari 2017 tot en met 1 januari 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie Dierexperimentencommissie AMC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 10 november 2016. 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. Dit advies van de commissie nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

Datum:
6 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD118002016794

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.centralecommissiedierproeven.nl. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

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: Academisch Medisch Centrum

Adres: Meibergdreef 31

Postcode en plaats: 1105 AZ AMSTERDAM

Deelnemersnummer: 11800

deze projectvergunning voor het tijdvak 7 februari 2017 tot en met 1 januari 2022, voor het project "Role of intestinal bacteria in development of diabetes in obesity" met aanvraagnummer AVD118002016794, volgens advies van Dierexperimentencommissie Dierexperimentencommissie AMC. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 16 december 2016
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 16 december 2016;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 10 januari 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 10 november 2016, ontvangen op 16 december 2016.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 10 januari 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Effect of bacterial intervention on development of obesity and T2DM and bacterial translocation				
	Muizen (Mus musculus) /	1.796	58% Matig 42% Licht	

Voorwaarden

Op grond van artikel 10a1 lid 2 van de Wet op de dierproeven zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen

De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat go/no go momenten worden afgestemd met de IVD.

In artikel 10, lid 1 sub a 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

Aanvraagnummer:
AVD118002016794

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 afstemming met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarde wijzigen of intrekken.



Aanvraagnummer:
AVD118002016794

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 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

Aanvraagnummer:
AVD118002016794

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 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 13d 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 13c 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.

De Minister heeft vrijstelling ontheffing verleend volgens artikel 13c, die de afwijkende methode van doden op basis van wetenschappelijke motivering ten minste even humaan acht als de in de richtlijn opgenomen passende methoden.

Inventaris Wob-verzoek W17-07										
		wordt verstrekt				weigeringsgronden				
nr.	document NTS 2016795	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1	
1	Aanvraagformulier				x		x			
2	NTS initieel			x						
3	NTS aangepast	x								
4	Project proposal				x		x	x		
5	bijlage animal procedure 1				x		x	x		
6	bijlage animal procedure 2				x		x	x		
7	Ontvangstbevestiging				x		x			
8	acceptatiebrief				x		x			
9	brief vragen CCD aan vergunninghouder				x		x			
11	DEC advies				x		x			
12	Advies CCD aan bestuur		x							x
13	Beschikking				x		x			

AVD 118002016795



22 DEC. 2016

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 11800 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen	
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	Academic Medical Center Amsterdam
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]
		KvK-nummer	343362777
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	Straat en huisnummer	Meibergdreef 31
		Postbus	
		Postcode en plaats	1105AZ Amsterdam
		IBAN	NL68RABO0136166741
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Zie bijgesloten procedure voor betaling AMC
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED] <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.
		Functie	Senior Scientist
		Afdeling	[REDACTED]
		Telefoonnummer	[REDACTED]
		E-mailadres	[REDACTED]
1.5	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED] <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	Scientist
		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="radio"/> Dhr. <input type="radio"/> Mw.
	Functie	Scientist	
	Afdeling	[REDACTED]	
	Telefoonnummer	[REDACTED]	
	E-mailadres	[REDACTED]	
1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?	<input checked="" type="radio"/> Ja > Stuur dan het ingevulde formulier Melding Machtiging mee met deze aanvraag		
	<input type="radio"/> Nee		

2 Over uw aanvraag

2.1 Wat voor aanvraag doet u?	<input checked="" type="checkbox"/> Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3
	<input type="checkbox"/> Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2
2.2 Is dit een <i>wijziging</i> voor een project of dierproef waar al een vergunning voor verleend is?	<input type="checkbox"/> 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
	<input type="checkbox"/> Ja > Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier <input checked="" type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3
2.3 Is dit een <i>melding</i> voor een project of dierproef waar al een vergunning voor is verleend?	<input checked="" type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3
	<input type="checkbox"/> 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 - 03 - 2017
	Einddatum	1 - 03 - 2022
3.2 Wat is de titel van het project?	Preclinical testing of the efficacy of monoclonal antibodies against human cancer	
3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Testen antistoffen tegen kanker	
3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?	Naam DEC	DEC AMC
	Postadres	Meibergdreef 31
	E-mailadres	[REDACTED]

4 Betaalgegevens

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

<input checked="" type="checkbox"/> Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1187,00	Lege
<input type="checkbox"/> Wijziging €	Lege
<input type="checkbox"/> Via een eenmalige incasso	
<input checked="" type="checkbox"/> Na ontvangst van de factuur	

5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht
<input checked="" type="checkbox"/> Projectvoorstel
<input checked="" type="checkbox"/> Niet-technische samenvatting
Overige bijlagen, indien van toepassing
<input checked="" type="checkbox"/> Melding Machtiging
<input type="checkbox"/>

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	[REDACTED]
Plaats	Amsterdam
Datum	19-12-2016
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.

Background cancer

Every year, more than 30% of the deaths in the Netherlands are caused by cancer (WHO – cancer program). Although major improvements in the therapies for several types of cancer have reduced

lethality (breast cancer, prostate cancer), many cancer types remain resistant to therapy resulting in poor survival rates. Additionally, intense treatment regimens in particular with cytostatic or cytotoxic drugs can result in serious treatment-related complications with lifelong increased morbidity and mortality risk. Novel tumor-specific therapies with less side effects and better therapeutic efficacy than the current treatment modalities are therefore highly desired. Tumor-specific therapeutic antibodies could be such new treatment modality.

Therapeutic antibodies

Over the last 30 years, monoclonal antibodies (mAbs) have emerged as efficacious cancer therapeutics. Most recent antibody based strategies that are clinically successful have been focused on targeting and activating immune cells by blocking inhibitory molecules, so-called check-point inhibitors. Despite clinical success, these antibodies often give rise to severe autoimmunity while large groups of patients remain unresponsive.

There is therefore a growing demand for antibodies that directly target and kill the tumor cells. Testing the efficacy of such mAbs is the main purpose of this application.

Antibody based therapies can invoke tumor cell death by different mechanisms such as blocking cell surface receptors responsible for growth and survival or trigger immune effector mechanisms such as Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity (ADCC) and Complement Dependent Cytotoxicity (CDC) via their Fc-tail.

Recently, it was shown that the anti-tumor response of tumor-binding antibodies with limited killing effect can be successfully enhanced by linking the antibody to a cytostatic drug, so called antibody-drug-conjugates (ADCs). In addition, bi-specific antibodies have been made with one arm binding to the tumor and the other arm reacting with and activating cytotoxic cells such as Cytotoxic T cells (CTL) or Natural Killer (NK) cells. Such bispecific antibodies kill tumor cells *in vivo*. We will refer to these engineered antibodies as "modified" in the remainder of this document.

As compared to more classical treatment regiments such as irradiation and chemotherapy tumor targeting antibodies typically display relative mild side-effects in cancer patients. Several monoclonal antibodies are currently successfully used in the clinic (for instance Rituximab (anti-CD20) or Trastuzumab (anti-Her2)) and many more are in development (Weiner, 2015)

Development of new therapeutic antibodies

[REDACTED]

We assume that cancer patients who show long term remission or stable disease following chemo or immune targeting therapies ("elite" patients) make antibodies that contribute to prolonged survival. From these patients we isolate and screen the antibody-producing B cells to find antibodies with therapeutic potential against novel targets or epitopes. This original approach allows us to isolate the most effective and safe monoclonal antibody from an elite patient as it has been naturally selected against the tumor of the patient.

Alternatively, we can successfully isolate antibodies from immunized mammals. This approach allows the generation of an antibody against a specific known target. Most of the antibody currently approved for clinical use has been generated by immunizing mammals.

Lead candidate antibodies are selected on the basis of their capacity to bind tumor cells and their ability to block the growth of tumor cells *in vitro*. We are particularly interested in antibodies that exhibit strong potential against more than one tumor type, for instance they react with both [REDACTED] carcinoma.

These antibodies may be applied as therapeutics for treatment of cancer patients either as a "naked" antibody (that is the non-modified form) or as a modified antibody. In addition, they may be useful for diagnosis for cancer. For instance, antibodies that react with tumor cells of subsets of patients suffering a

particular cancer may be used to stratify the patient group and refine the best therapeutic strategy.

In vivo efficacy testing

To address the question whether our mAbs can be further developed as therapeutic we need to assess their efficacy in eliminating tumor cells *in vivo*. As tumor progression is a complex process involving the tumor environment, blood and lymph vessels and tumor cells can spread throughout the body (metastasis), the use of experimental animals is required to reliably assess the action of a mAb on the tumor because we cannot do these experiments in human beings. For both ethical and practical reasons mice are the most accessible experimental animals for this purpose. Although they remain a model and as such have limitations (presence of murine stroma, species-specific cytokines or hormones, absence of a full human immune system, ...), it has been demonstrated that the histo-morphology and gene expression profiles human tumors growing in such mouse models are quite similar to the originating tumor (DeRose et al., 2011; Loukopoulos et al., 2004) .

3.2 Purpose

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

- If the project is focused 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 objective of this project is to identify antibodies that impair tumor growth and/or spreading *in vivo*, or eliminate the tumor cells all together. To achieve this objective, we will test whether mAbs that have been isolated from cured cancer patients or immunized animals affect the growth of one or more tumor types in an *in vivo* mouse model. The results of those experiments will inform us whether further pre-clinical development of the mAbs is warranted. Once proven functional in a mouse model our antibodies may be tested for toxicity in for instance Cynomolgus monkeys (crab-eating macaques), experiments that are necessary for filing the antibody as an Investigational New Drug (IND) to the EMA (European Medicines Agency) or FDA (Food and Drug Administration). Approval of such organizations is required for initial testing of new therapeutics in patients. Should the antibody not be efficacious in the mouse models, this very costly and time-consuming follow up will not be done.

The antibodies that will be evaluated in this project are selected after extensive stringent *in vitro* characterizations. Only a limited number of mAbs will qualify to be tested *in vivo* in this project based on their reactivity, stability and specificity to tumor cells vs healthy tissue. We anticipate that we will test up to 5 mAbs per year.

Several cancer types and antibodies or combinations of antibodies will be tested for anti-tumor reactivity. To assess this main objective, 2 steps will be required in this project:

- 1. Development of tumor xenograft mouse models.** First for each different tumor we will conduct a pilot experiment to establish a model to grow that particular tumor in mice. Sources of tumor cells may be *in vitro* grown cell lines, patient derived tissues or organoids derived from tumor cells. Some tumors rely on human stroma for their growth. In those cases, we will also provide human stromal cells (such as mesenchymal stem cells) to support tumor growth. The development of similar models has most likely been performed by other labs. However, the models need to be established and refined in our hands before testing the antibody. This will be performed after systematic review of the works of other labs.
- 2. Antibody efficacy testing.** Antibodies with therapeutic potential will be tested for efficacy in mice grafted with tumors (as established under step 1). We will assess that the injection of this mAb stops or at least delays tumor growth and metastasis. We will first test 'naked' antibodies. If these 'naked' antibodies are highly specific for binding to tumor cells (thus show no/minimal binding to healthy tissues), but do not affect the tumor we may modify the antibody to an antibody-drug conjugate (ADC). In an ADC format the antibody is directly coupled to a highly cytotoxic drug. Alternatively, in a bi-specific format the anti-tumor antibody is coupled to a second antibody that binds cytotoxic T cells or cytotoxic NK cells. Bi-specific antibodies served to bring tumor cells and

the cytotoxic lymphoid cells in close proximity after which the cytotoxic cells will recognize and kill the tumor.

Before the modified antibodies can be used in *in vivo* experiments we will extensively characterize their activities in *in vitro* experiments. If these experiments are not positive, thus the tumor cells are not killed *in vitro*, the antibody formats will not be used in the *in vivo* experiments.

The objectives are achievable since there is a large body of literature that describe tumor models similar to those we want to establish here. Moreover, we have extensive experience with grafting human tissues (both tumor and healthy) in mice.

Antibodies against several tumor types are developed by different teams in our lab. In order to ensure that a tumor model is developed only once and handled consistently, a dedicated team of skilled persons experienced in animal experience has been set up to test all those antibodies. This allows us to efficiently combine experiments when possible (reducing number of control mice needed) and ensure that the best techniques are applied through our continuous training and exchange with *in vivo* models specialists.

Overview of the number of mice involved:

Appendix	Aim	Number of mice / year	Total number of mice
1	Establishing 5 tumor models / year	100	500
2	Efficacy of mAb alone	420	2 100
	Efficacy of mAb in combination	600	3 000
total			5 600 mice

3.3 Relevance

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

We aim to develop therapeutic antibodies for cancer types with high unmet medical need, both hematopoietic malignancies and solid tumors.

Hematopoietic malignancies

Acute Myeloid Leukemia (AML) is a disease with a high unmet medical need that is prevalent mostly in elderly. Multiple Myeloma (MM) is even more devastating and except for an experimental drug no cure exists for this disease.

A method of choice for treatment of AML and MM is hematopoietic stem cell transplantation. However, a suitable donor is often not available and this approach typically results in severe graft versus host responses. Moreover, with MM, the probability of relapse (return of the tumor) is very high.

Solid tumors

In recent clinical trials antibodies that boost the patient immune response (so called checkpoint inhibitor antibodies) have proven themselves as valuable therapeutics for solid tumors such as melanoma and colon carcinoma. These strategies are prone to induce severe autoimmunity. Moreover, in melanoma only 40% of the patient population shows a response to these drugs with an extend lifespan of 2-3 year at most for metastatic disease. Pancreas cancer is inoperable and incurable. An extremely harsh chemotherapy regimen can be given, but is still very inefficient. Typically, when patients with pancreas carcinoma of the duct are diagnosed the disease has metastasized. At this stage of disease, the 5-year survival is around 1%. Similarly, metastasized prostate cancer, breast cancer, ovarium cancer, renal cell carcinoma, colon carcinoma and non-small-cell lung cancer also presents a high medical need with in Europe a 5-year survival rate of less than 30%, 22%, 17%, 10%, 5%, 1% respectively.

Clinical relevance

Thus there is an urgent need for new treatment options for patients suffering from these cancers. We isolate antibodies with therapeutic potential from rare elite patients that display an exceptionally positive clinical outcome. Since the antibodies generated have already proven themselves in a patient they may allow for a much more efficacious treatment as compared to the current standards of care. We also anticipate that antibody treatment will result in less treatment-related complications than current therapies for AML, MM, melanoma, and colon carcinoma and for much needed novel treatment options for pancreatic cancer.

Currently the aim is to develop antibodies targeting the cancer types described above, later other cancers will follow. In this proposal we will test the efficacy of novel antibodies reactive to cancer cells in human tumor xenograft mouse models.

3.4 Research strategy

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

The goal of the project is to isolate tumor-reactive antibodies from cancer patients or immunized animals that show prolonged survival or at least display signs of tumor regression. The goal is to develop these antibodies for treatment of the next generation cancer patients.

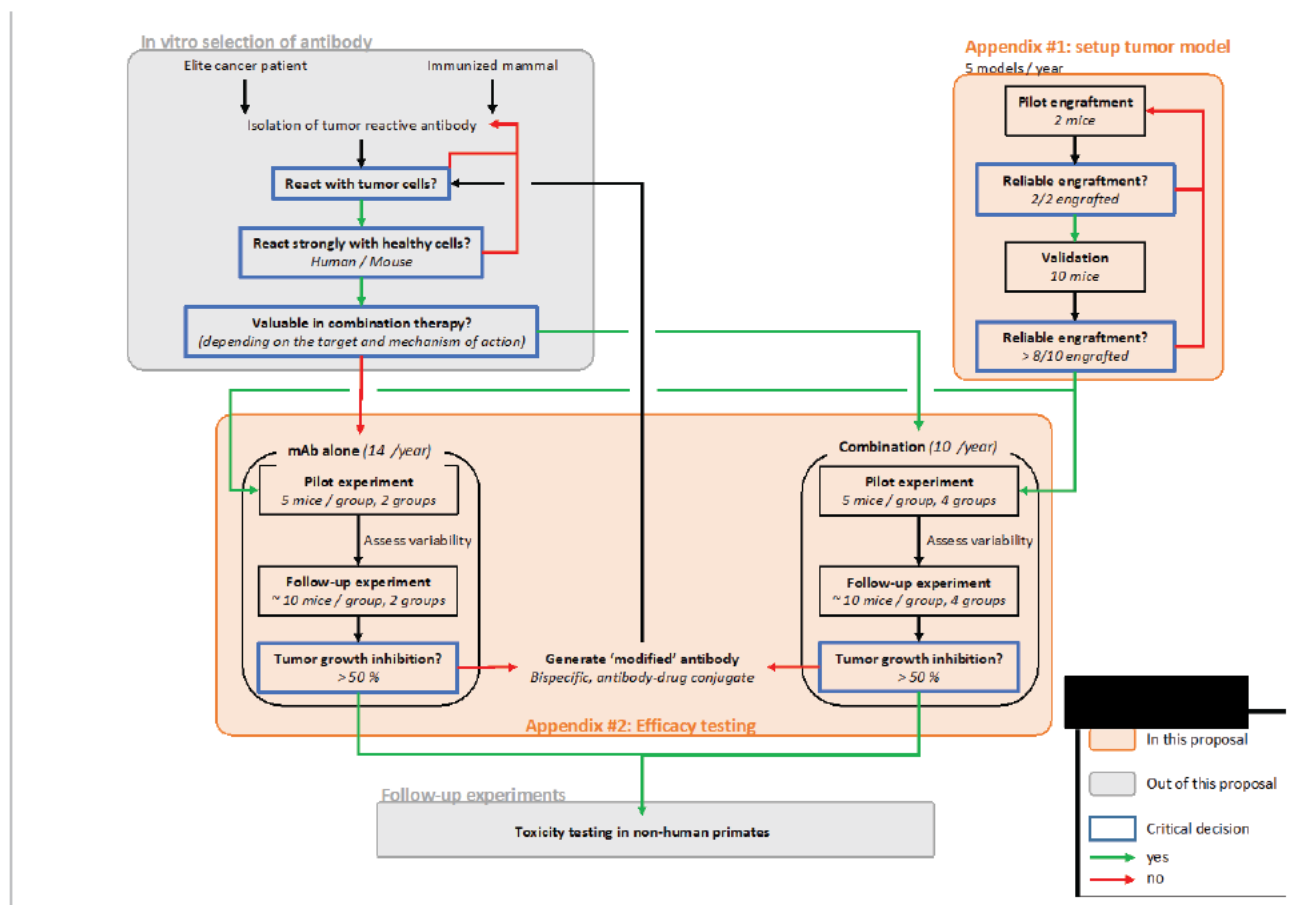
In the lab candidate antibodies are tested for their anti-tumor reactivity and selected for minimal reactivity to healthy cells. Antibodies that meet these criteria need to be tested for inhibition of tumor growth and/or metastasis in an *in vivo* setting.

Before starting an *in vivo* experiment, the reactivity of our antibodies against several tumor types will be evaluated *in vitro*. Antibodies reactive against more than one tumor type is especially interesting as new drug candidates. Based on this evaluation, the *in vivo* experiments may not be restricted to the original tumor only. If the antibody reacts to multiple tumor types *in vitro*, the tumor type of the original elite patients will be tested first and the others candidate tumors might be tested as well.

The *in vivo* testing consists of 2 parts.

1. Develop human tumor xenograft mouse models for both hematopoietic and solid cancers including but not limited to AML, Multiple Myeloma, melanoma, colon carcinoma, pancreas carcinoma, prostate cancer, renal cell carcinoma, breast cancer, ovarium cancer, non-small-cell lung carcinoma (**Appendix#1**);
2. Determine the ability of the antibodies to control tumor growth and metastasis in tumor xenografted mice (**Appendix#2**).

A schematic overview of the project and the successive decision points (go / no go) is depicted in the figure below.



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.

Part 1. Tumor xenograft development *in vivo*.

In this part, immunocompromised mice or mice carrying a human immune system will be transplanted with tumor tissue derived from patients, tumor cell lines, or organoids thereof. The use of immunocompromised mice is required to allow efficient engraftment of human cells without being rejected by the host immune system. The presence of human immune cells might be required for the full efficacy of some of our antibodies. For instance, in the past we have isolated antibodies which kill tumor cells via Antibody Dependent Cell Cytotoxicity (ADCC). This mechanism of killing requires the presence of NK cells to eliminate the tumor.

Animal models for the tumors described here are described by other labs. A careful review of the literature will help us refine our procedures.

For adult mice, the cells will be injected intravenously, intraperitoneally, subcutaneously or orthotopically. In newborn mice, cells may be injected intrahepatically. This route allows efficient engraftment of human hematopoietic cells (either to establish a human immune system or to engraft hematological malignancies). Tumor pieces will be transplanted subcutaneously or orthotopically. Some tumors require additional cells or structure to faithfully engraft (e.g. bone stromal cells). In this case, those cells will be implanted in advance in the mice or co-transplanted with the tumor. In case the tumors are grafted under the skin, tumor growth will be monitored by caliper measurement. When possible the tumor cells grafted in the mice are modified to express reporter genes (e.g. luciferase or GFP) allowing us to determine growth and tumor cell spreading by bioluminescence/fluorescence camera. In addition, for testing the effect of antibodies on blood tumors (leukemia's) we may regularly sample blood and measure the number of GFP positive tumor cells in the blood or measure tumor-released molecules in the blood stream. When the transplant reaches a maximum tumor size (usually 2 cm³), mice will be sacrificed and the tissue will be collected and analyzed.

Patient derived tumor material is typically limited and not enough for a complete experiment. To increase

the obtained tumor tissue, we will first expand it in a small number of mice. From these mice the tumor tissue will be harvested and secondary transplanted to a larger cohort of mice. This should produce enough mice all carrying the exact same tumor allowing appropriate statistical analysis to observe an antibody mediated tumor effect.

Part 2. Efficacy of candidate mAbs.

Antibodies that in *in vitro* assays show reactivity to tumor cells, while minimally affecting healthy cells, are selected for further characterization in an *in vivo* setting.

To generate information on the exact mechanism(s) by which the different antibodies exert their anti-tumor mechanism and to determine the most optimal setting for tumor eradication different experimental settings might be applied;

Direct inhibition of growing tumors

To determine whether an antibody is able to slow down the growth of a tumor, we will first establish a growing tumor in mice. After intravenous injection of antibody, changes in tumor size are measured in time.

In this setting when using a highly aggressive tumor we may observe metastasis from the subcutaneous tumor to internal organs. Antibody mediated inhibition of metastasis will be observed by bioluminescence imaging. If the tumor cells cannot be modified to express luciferase, other approaches such as qPCR quantification of human cells in a mouse organs or histology will be used.

Inhibition of metastasis (detachment of a tumor cells from the original tumor, migration and seeding in a new location)

For tumors that do not easily metastasize from the subcutaneous site we will inject tumor cells directly in the blood stream. After this metastatic lesions will most likely form in lungs and liver. By luciferase imaging antibody mediated inhibition of metastasis can be monitored by bioluminescence imaging.

Inhibition of tumor seeding (adherence of tumor cells in a new environment)

For antibodies that are predicted to impair the seeding of tumor cells and thus outgrowth of new tumor masses the antibody will be injected before or simultaneously with the graft of tumor cells. Tumor growth is monitored both by caliper measurement and bioluminescence imaging.

Comparison to and combination with existing therapies

To get an idea how our new antibodies compare to known therapies for cancer treatment mice will be treated with drugs or treatment regimens currently used as the standard of care.

In addition, we may use our antibodies in combination with other therapeutic agents (e.g. small molecule inhibitor or checkpoint inhibitor antibodies (e.g. anti CTLA4 or anti PD1/PDL1) to determine if these drugs have a synergistic effect on tumor growth.

Antibodies requiring effector cells or complement

For antibodies that in *in vitro* assays have shown to require effector cells such as Natural Killer (NK) cells, macrophages, or neutrophils to exert their anti-tumor effect via Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity (ADCC) we may co-inject human hematopoietic cells (e.g. total peripheral blood mononuclear cell or enriched NK cells) or use mice carrying a human immune system (HIS mice).

Similarly, for antibodies that require complement to exert their anti-tumor response via Complement Dependent Cytotoxicity (CDC) we will co-inject complement in complement-deficient mice strains.

Alternative antibody formats

To enhance its effect, we may couple the antibody to a cytotoxic drug generating so called Antibody Drug Conjugates (ADCs). Alternatively, to attract cytotoxic T cells to the tumor site the lab developed a technique to make bi-specific antibodies linking an anti-tumor and an anti-CD3 antibody together

Lastly, for antibodies where effector functions such as ADCC and CDC are undesirable Fab-fragments (antibodies lacking the Fc-tail required for effector functions) will be generated.

All these different antibody formats have been shown to be clinically effective.

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.

Both parts of this proposal as well as the *in vitro* work preceding the experiments described in this proposal are interconnected (see also accompanying decision tree);

Background

██████████ has the ability to develop antibodies directly from patients with a good clinical outcome. The assumption is that these antibodies have already been proven themselves to contribute to the control or eradication of tumor cells. Moreover, since these antibodies are derived from human individuals they are expected to be safe for clinical use. Nevertheless, both safety and efficacy need to be tested in the pre-clinical trajectory.

In vitro selection of antibodies

In our laboratories the patient derived antibodies are tested for reactivity to both tumor cells and healthy cells. If we have indications that the antibodies have an unacceptable strong reactivity against healthy cells further development is not warranted.

Simultaneously the antibodies are subjected to a series of assays to elucidate the mechanism by which tumor growth or spreading is inhibited. Unfortunately, *in vitro* assays only partially mimic the processes that are involved in disease progression. Mouse models provide an amenable and efficient way of determining tumor growth under conditions resembling a human setting.

In vivo antibody efficacy assay

Establishment of the different xenograft tumor models is required to test the effects of antibodies (**Appendix#1**). We will setup a number of different models depending on the tumor type and research question that needs to be answered.

In **Appendix#2** we describe the actual experiments to determine the inhibition of tumor growth and spreading by the antibodies under investigations.

Follow up to this proposal

Antibodies that have been proven effective, thus reducing tumor growth or eliminate the tumor, may be chosen to continue the preclinical stage of drug development. Most likely this will include GMP complying production of the antibodies and subsequent toxicity testing in non-human primates (note: this type of toxicity test is not part of this DEC application). Such studies are required by the EMA or FDA before they give approval to test the antibodies in patients.

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	Setup tumor xenograft models
2	Antibody efficacy testing
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	

References

DeRose, Y.S., Wang, G., Lin, Y.-C.C., Bernard, P.S., Buys, S.S., Ebbert, M.T., Factor, R., Matsen, C., Milash, B.A., Nelson, E., et al. (2011). Tumor grafts derived from women with breast cancer authentically reflect tumor pathology, growth, metastasis and disease outcomes. *Nat. Med.* 17, 1514–1520.

Loukopoulos, P., Kanetaka, K., Takamura, M., Shibata, T., Sakamoto, M., and Hirohashi, S. (2004). Orthotopic transplantation models of pancreatic adenocarcinoma derived from cell lines and primary tumors and displaying varying metastatic activity. *Pancreas* 29, 193–203.

[REDACTED]

Weiner, G.J. (2015). Building better monoclonal antibody-based therapeutics. *Nat. Rev. Cancer* 15, 361–370.



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'.	11800	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	AMC	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
	1	Xenograft

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 goal of the project is to develop new monoclonal antibodies for cancer treatment. For this purpose, we want to test antibodies with therapeutic potential or modified version thereof (antibody drug conjugates, bi-specific antibodies or other derivatives) on tumor development *in vivo*. To be able to test the effect of the antibodies on tumor cells *in vivo*, reliable models of tumor engraftment and well-characterized growth are needed. To this aim, human tumor cells or tissue are grafted in mice after which tumor growth and spreading is followed in time. We already know that the antibodies currently under development are reactive to multiple types of cancer. To test the antibodies against different types of cancer, we need to develop a broad selection of human tumor xenograft models. The following table gives examples of the different cancers that we will explore. Additional tumor types might be added if we find a promising antibody candidate reactive against another type of cancer. The development of the different tumor mouse models is described here in **Appendix#1**.

Hematopoietic cancers

[Redacted]	[Redacted]
------------	------------

Solid cancers

[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]

We plan to develop and validate *in vivo* models of tumor growth for the purpose of testing the anti-tumor reactivity of new antibodies with therapeutic potential. For every tumor and tissue type a careful review of the literature will help us select the best conditions to reliably engraft and grow it *in vivo*. For all the models developed in this **Appendix#1**, the primary outcomes will be the reproducible engraftment and growth of the tumor tissue as measured by the presence of engrafted cells or tissues in the animal. Additionally, at the end of the procedure tumor tissue and mouse organs will be collected for analysis by a renowned pathologist. Also we may determine the gene expression profile and confirm the expression of the antibody target antigen. Once we have established, refined and validated protocols allowing reliable tumor engraftment and development in mice they will be used to test the efficacy and our antibodies as described in **Appendix#2**.

Our lab has extensive experience with the engraftment of () cells in immunocompromised mice under previously approved protocols. In these cases, where procedures for tumor engraftment are running satisfactory most procedures described in this **Appendix#1** can be largely omitted and we will proceed with testing the efficacy of tumor-specific antibodies.

In order to be effective, some antibodies need human effector cells such as T cells and NK cells. Whether this is the case with particular antibodies that we wish to test in the mouse models, will first be determined by *in vitro* experiments. If these experiments show that the antibody under investigation indeed requires human effector cells for an effective anti-tumor response peripheral blood mononuclear cells (PBMC) or individual hematopoietic subsets (for example T cells, NK cells, myeloid cells) will be co-injected in the relevant mouse model simultaneously with the antibody. Alternatively, to provide the antibody with a source of human effector cells the experiments may be performed in mice carrying a human immune system, so called HIS mice. Hereto immunocompromised mice are, several weeks prior to the tumor xenograft experiment, engrafted with human hematopoietic stem cells (HSCs). Mice successfully grafted with HSCs develop a human immune system that can aid anti-cancer antibodies to stop or slow down disease progression.

The procedures described below will be carried out for each tumor cells type. This will allow us to refine and optimize the models in the experiments described in **Appendix#2**.

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

I- General overview of the process.

The following steps are an indication of the procedures that could be performed in order to obtain a reliable tumor model. For every tumor type, only a selection of those procedures will be applied based on the literature, our knowledge and the mechanism of action of our antibody.

For instance, the engraftment of followed the following path:

- We started by engrafting immune-deficient animals with cell lines subcutaneously. This proved a reliable engraftment technique and this model was used to study the effect of antibody on an established tumor.
- As one of our antibody's mechanism involved the presence of human effector cells, we refined our model by working with immune-compromised mice harboring human immune cells. Immunocompromised mice were sublethally irradiated before injection of human hematopoietic stem cells. After validation of the presence of human cells in the peripheral blood of the animals, cell lines were injected subcutaneously as before. Both the human engraftment and the tumor growth in this second model were reliable and allowed the use of this

model to test the efficacy of our antibody.

II- Pre-conditioning of the mice (Optional).

From literature, it is known that human tumor cells can grow out in immune-deficient mice. However, engraftment of tissues is not always successful and can in particular be difficult for patient derived tumor samples. To facilitate the engraftment of tissues we may pre-condition the mice to further dampen their immune response. The following approaches can be used:

- Sublethal irradiation. The dose of irradiation may vary according to the mouse strain and the age of the animals: typically, new-born mice receive a 3.5Gy irradiation dose, with the notable exception of the animals bearing the scid-mutation (such as NSG mice) that only tolerate a dose of 1.0Gy due to their relative high radio-sensitivity. Adult mice receive higher irradiation dose (respectively 4.5Gy and 2.0Gy). Alternatively, a double dose at two time points can be given: 2x 1-4.5Gy in 2 sessions at least 2 hours apart.
- Sublethal chemotherapy (e.g. busulfan) treatment. Both strategies will result in depletion of the mouse hematopoietic stem cells, resulting in a reduced number of mouse immune cells. 25 mg/kg will be injected IP (20 μ l/g bodyweight) in adult mice. If needed, because one injection is not sufficient to achieve the desired pre-conditioning a second injection can be given after 12-24h.
- We may also have to deplete certain mouse cell types that affect the growth of the tumor (for instance macrophages or monocytes). This may be done by using depleting antibodies. Depending on the half-life of the antibody used, the injection may be repeated several time throughout the duration of the experiment.

From our experience, we anticipate that 30% of the tumor types we will work with require pre-conditioning.

III- Engraftment of tumor tissue

Tumor can be grafted in mice in different forms:

a. Engraftment of Tumor cells.

Single cell suspension of tumors cells will be obtained from either cultured tumor cell-lines or patient derived material. The obtained cells can be genetically engineered to express reporter markers (such as luciferase or a fluorescent protein) in order to quantify their proliferation *in vivo*.

The single-cell suspension will be injected via different routes according to Diehl *et al.*, J. of Applied Toxicology, 2001:

- Intravenously (maximum volume: 125 μ l),
- Subcutaneously in 2 flanks (maximum volume per injection site: 10 μ l/g). In this case cells can be injected alone or combined with Matrigel. The number of cells that needs to be injected to obtain a reliable engraftment is dependent of the tumor cells and will be evaluated for every model based on the literature available.
- Subcutaneously in a scaffold, a three-dimensional microenvironment that provides a niche for the tumor cells. Some tumors require specific environment that can be provided by engrafting 2-3 mm calcium phosphate scaffolds under the skin via surgery (Groen Blood 2012). Adequate pain relief will be applied before surgery and it will be performed under anesthesia on a thermally-controlled surgical pad. The incision will be closed with two a-traumatic stiches. Tumor cells are either preloaded in the scaffold before its implantation or loaded in the implanted scaffold by an injection through the skin. Alternatively, a supporting structure can be developed by the subcutaneous injection of human stromal cells and Matrigel (10 μ l/g). The injection of these cells will results in the formation *in situ* of a structure susceptible to support tumor growth in a physiological environment.
- Intrahepatically in newborn mice (30 μ l max). At birth the mouse liver is a major

hematopoietic organ that support the engraftment of human hematopoietic cells (Traggiari et al., 2004) . In particular, for AML this has been shown to generate a reliable model (Ellegast et al., 2016) .

- In order to reliably engraft, it is known for some tumors or tissues that support cells (e.g. stromal cells, hematopoietic cells) are required *in vivo*. If needed, those cells can be co-transplanted with the tumor cells (see below) or implanted in advance. Those human cells can be injected in the liver of newborns (up to 5 days) (30 µl max) or in adult SC 10µl/g; IP 20 µl/g or IV 5 µl/g.

b. Subcutaneous engraftment of tumor or organoid tissue.

If available, pieces of tumor tissue, surgically resected from patients, may be transplanted to create so-called Patient Derived Xenografts (PDX) in the mice. These mice are called PDX mice. The original material that comes from the operation room will be cut into small tumor pieces and placed subcutaneously in both flanks. Adequate pain relief will be applied before surgery and it will be performed under anesthesia on a thermally-controlled surgical pad.

c. Orthotopic transplant of tumor or organoid cells

To further improve our tumor xenograft models tumors may be grown in their respective environment (for example XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX). In this case, tumor cells or human organoid tissue will be injected *in situ* using surgery. The volume of injection is depending of the organs and will be establish for every procedure based on the literature with a maximum of 100 µl. Adequate pain relief will be applied before surgery and it will be performed under anesthesia on a temperature controlled surgical pad. An incision in the abdominal wall will be performed and the cells injected in the target organs. The abdominal wall will be sutured with absorbable suture. The skin incision will be closed with two a-traumatic stitches.

To expand tumor cells or produce a cohort of mice carrying the exact same tumor the tumor may be harvested from the original mice and secondary transplanted to new mice. This expansion of the tumor for subsequent experiment can be done with procedures described in 2a, b and c.

IV- Co-injection of effector cells

Some antibodies require the presence of effector cells to exert their anti-tumor effect. Their efficacy will therefore be assessed in Appendix #2 in presence of said effector cells. Since these effector cells (e.g. total Peripheral Blood Mononuclear Cells, T cells or NK cells) may also affect the growth of the grafted tumors, we will characterize in this appendix their effect on the growth of the tumor. The number of effector cells given may differ for each tumor type.

In addition, we may regulate the activity of the effector cells by giving the mice stimulating or inhibitory cytokines or other factors. One example is a complex of IL-15 and IL15R α , which has been shown to induce NK cell proliferation and differentiation (Huntington et al., 2009) .

The cells will be injected either IV 5 µl/g; IP 20 µl/g; SC 10µl/g directly in the tumor. The inhibitory or stimulatory factors will be injected either IV 5 µl/g or IP 20 µl/g.

V- Monitoring tumor or tissue growth

Caliper measurement

After tumor cell graft or tissue implantation, animals will be monitored for tumor formation and growth. If the tumor has been implanted under the skin, a caliper will be used to measure tumor size twice a week.

Bioluminescence imaging

Genetically modifying the tumor cells to express markers such as luciferase and GFP allows in vivo imaging of the tumor size using a bioluminescence imager. Injection of

Luciferin will be performed IP (20 µl/g) at least 10 minutes before imaging. To enhance the sensitivity of imaging the mice are either shaved using an electric razor or treated with a hair removal product such as Veet. To obtain exploitable pictures, the imaging procedure will be performed under anesthesia. As the acquisition can take several minutes, mice will be kept warm during the procedure.

Plasma markers

Alternatively, tumor specific markers, number of circulating tumor cells (CTCs) or tumor derived extracellular vesicles may be quantified in the plasma of the mice. Bleeding every 1 to 2 weeks (with a maximum volume of 10% (8 ml/kg) of the circulating blood if the mice are bled once every 14 days or 7% (6.4 ml/kg) if the mice are bled weekly).

VI- Surgical resection of subcutaneous tumors

Metastasis is the cause of 80-90% of human cancer deaths (Weigelt et al., 2005). Long-term follow-up of the mice to study the occurrence of metastasis is thus essential. The tumor that grows at the site of inoculation is the primary tumor; all tumors that grow at distant sites (as a result of metastasis) are secondary tumors. To allow longer follow up of growing secondary tumors the subcutaneous growing primary tumor can be surgically removed. When the primary tumor reaches a size of approximately 1 cm³ a skin incision is made at the tumor site, the tumor is removed and the skin is closed using stitches or biological glue (Doornebal et al., 2013; Sukin et al., 2001). Adequate pain relief will be applied before surgery and the surgery will be performed under anesthesia on a temperature controlled surgical pad. The treated mice will be monitored for a maximum of 8 weeks to assess the growth of secondary tumors. This technique will be mostly applied when working with tumor cells modified to express luciferase to allow easier tracking of metastasis development. If signs of discomfort (i.e. shortness of breath in case of lung tumors) mice will be sacrificed earlier.

VII- Sacrifice

The total duration of the experiments will vary depending on the aggressiveness of the tumor but mice will always be sacrificed before the age of 8 months.

Animals will be euthanized before the planned end of the experiment when the size of one of the subcutaneous grafts reaches 2 cm³, when one of the grafts becomes ulcerative or when another humane endpoint is reached. Tumors will be isolated for histological and molecular characterization.

Mice will be sacrificed by lethal bleeding under deep-anesthesia followed by cervical dislocation.

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

Under this **Appendix#1** we are developing new xenograft mouse models.

We will proceed in a stepwise manner: Two animals will be engrafted with tumor tissue at a time and based on the tumor or tissue outgrowth the protocol will be adjusted in a subsequent step in which again 2 animals will be engrafted until reliable engraftment is achieved (both mice engrafted). We anticipate that it will take less than 5 rounds and thus 10 animals to achieve this goal.

An additional 10 mice will be used in one experiment to confirm and further evaluate the variability of the model. The data obtained here will be used to adjust the number of mice required in the subsequent procedures. Only models where >80% of the mice show tumor engraftment will be used in future experiments.

This procedure needs to be repeated for every combination of a particular cell or tissue type and mouse strain that will be required for antibody testing. We are planning to develop about 5 models per year.

This makes a total of maximum 20 mice x 5 models x 5 year = **500** mice.
 The models that we develop under **Appendix#1** will be used for experiments described in **Appendix#2**.

B. The animals

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

Immunodeficient mice

In order to allow the engraftment of tumor or human cells or tissue, mice with an impaired immune system (immunodeficient) are required. Many examples of such xenograft models are available in the literature. Mice younger than 8 months will be used.

Genetically modified mice

Certain tumors need specific human growth signals that cannot be provided by the mouse due to lack of cross-species reactivity. In this case, immune-compromised mice transgenic or knock out for specific proteins such as cytokines or MHC molecules will be used. Mice younger than 8 months will be used.

Human Immune System (HIS mice)

To provide the antibodies with hematopoietic effector cells experiments may be performed on a human immune system (HIS) mouse background. [REDACTED] has a long-standing experience in generating HIS mice [REDACTED]. In addition, the Academic Medical Center supports an in house facility from which these mice can be obtained. Alternatively, several companies (The Jackson Laboratory, Taconic, and Axenis) provide HIS mice. HIS mice are made by injecting human hematopoietic stem cells in mice younger than 6 weeks. Human Immune System (HIS) mice will be transplanted with tumor tissue or cells after a mature human immune system has developed. This means that at the time of tumor transplant, the mice will be between 12 and 18 weeks.

The table below represents a list of mouse models that may be used in this project. It is likely that this list will grow depending on the availability of new models that provide more favorable conditions for tumor xenograft experiments.

Immunodeficient mouse strains

NSG (NOD SCID IL2R γ -/-)	NOD-SCID
BRG (Balb/c Rag1/2-/- IL2R γ -/-)	Nude
SCID	

Transgenic mouse strains

BRG HLA-A2 HLA-DR2	MISTRG (hu M-CSF IL-3 huGM-CSF huSIRP α tg huTPO Rag2-/- IL2R γ -/-)
Bcl2 transgenic mice	Flt3 transgenic mice
Mice transgenic for human cytokine genes that promote development of tumors or the immune cells including, but not limited to IL-6 IL-15 G-CSF GM-CSF IL-3	NSG-w41(Kit)

Origin of the mice

The strain will be carefully selected for each combination of tumor type and therapeutic antibody. Many of those strains are available in our facility and will be bred in house. If a strain is not available in our facility, we will obtain it through an approved supplier or from a collaborator.

Sex of mice

For some tumor types, it is known that in vivo engraftment is more efficient in either one of the sexes. If this is the case, either males or female mice will be used. If tumor engraftment is equally efficient, both sexes could be used. However, we experienced more fighting incidences when commercially bred mice are used as compared to in house bred mice. Therefore, when mice are obtained from commercial vendors we propose to use female mice only. There will be a fictional prevention of surplus. To prevent institutional surplus males and because fighting might be less pronounced in institutional bred mice (less stress e.g. transport stress) we will use females and males.

Life stages

Some hematopoietic tumors (e.g. AML primary material) are known to be difficult to engraft in mice. For those tumors, engrafting newborns has been reported to give a better chance of success and will be used in this project. More generally, we will use mice after the age of 6 weeks. Younger mice, due to their small size, represent a challenge to safely and reliably engraft the tumor. When working with HIS mice, tumor cells will be engrafted between 12 and 18 weeks, this is after the human immune system has developed.

If we are not interested in the development of metastasis, mice will be monitored for a maximum of 6 months after tumor implantation. If the tumor reaches a critical size or another human endpoint before 6 months, the mice will be sacrificed early.

When we are interested in the development of metastasis, the primary tumor may be removed when it reaches a size of 1 cm³. The time required to reach this size will vary greatly depending on the tumor used, it can be as short as 1 week and as long as 3-4 months. Once the primary tumor has been resected, the mice will be followed for a maximum of 8 weeks.

In all cases, mice older than 8 months will be sacrificed to prevent age-related discomfort.

Number of mice

We estimate that for developing new xenograft models we will engraft the following numbers of mice:

		Mice / exp	Exp in 5 years	Total
Mice bearing tumors engrafted subcutaneously or intravenously	setup	5 x 2	15	150
	validation	10	15	150
Animals engrafted with human immune cells	setup	5 x 2	7	70
	validation	10	7	70
Animals engrafted orthotopically with tumor	setup	5 x 2	3	30
	validation	10	3	30
Total over 5 years				500

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.

It is known for a long time that due to (epi)genetic alteration, *in vitro* growing tumor cells only partially mimic the growth of tumor cells in patients. Moreover, metastasis, the spreading of tumor cells through the body and main cause for human cancer deaths, is a complex process that cannot be captured in an *in vitro* assay.

Thus in order to determine the efficacies of the antibodies against the tumor and to test the effect of antibodies on metastasis it is necessary to test the antibodies under more physiological conditions. For that purpose, xenografted immunocompromised mice are widely used by researchers in the field.

By a step wise improvement of tumor grafting we only need a limited number of mice to optimize a particular xenograft models. This is also possible because statistical analysis is not needed when establishing a tumor model. Statistical analysis is relevant only when we test the antibodies. Before establishing a model, we will carefully review the literature and establish collaborations with groups with long-standing experience in the generation of specific xenograft models that are not available in our lab. This will also allow us to avoid unnecessary experiments (“we do not intend to reinvent the wheel”) and to refine our procedures by using their experience. Our long-standing expertise in handling immune-compromised mice and developing new models for tumors ensure that we will optimally use the mice and restrict the number of mice to the minimum. Immuno-compromised mice are socially housed in individually ventilated cages with sterile food and water ad libitum and they are handled in a sterile biohazard laminar flow cabinet in order to prevent them from becoming infected by opportunistic pathogens. The mice will receive cage enrichment to reduce stress levels.

██████████ has organized a dedicated team of persons trained to perform all the in vivo experiments of ██████████. This team will ensure that the proper models, strategies and procedure are used making the results more reliable.

Note regarding the use of females only when mice need to be obtained from a commercial party: If no difference in the growth of tumor is expected from the literature between males and females, we will use females for the following reasons:

Aggression is the most common reason for long term individual housing of male mice in research. Ignoring this aggression in commercially purchased male mice is not a choice. Fighting of male mice does have severe effects and cannot be underestimated. Untimely separation of fighting males has resulted in severe wounds on the skin, testis and penis (we have even often seen completely bitten off penis). The animal welfare body estimated this as severe discomfort and this can be avoided by using female mice when scientifically possible.

Long-term solitary housing of mice causes a broad spectrum of behavioral, neurological, molecular, hormonal and physiological changes (isolation syndrome). Moreover, individual housing is a confounder for the experimental results. Individual housing will result a larger standard deviation in the experimental outcome, thus more animals have to be used to determine statistical relevant effects.

All animals have to **be housed individually as in one cage the male mice** start fighting to prevent the confounder effect of the isolation syndrome on the results

Isolation Syndrome is a symptom of psychosocial stress; the use of male mice means increased discomfort for the male mice in this project

The discomfort parameter: social behavior cannot be used anymore

Explain what measures will be taken to minimize 1) animal suffering, pain or fear and 2) adverse

effects on the environment.

1. Generally, engraftment of mice with tumor cells will result in the development of a tumor mass that will result in discomfort for the mouse. We will work only with mice carrying tumors under the reasonable endpoint set by the code of practice for oncology (2 cm³). The discomfort will be minimized by the use of appropriate analgesia and anesthesia before surgery. The experiments will be swiftly performed by skilled personnel. In order to prevent opportunistic infections, immunocompromised mice are handled in a sterile fashion (IVC, sterile food and water, handling in biohazard laminar flow cabinets). Cages are enriched with nesting and hiding material to minimize fear and stress for the mice. Some technical procedures may induce discomfort. The table below provides an overview of expected discomfort and the measures that will be taken to minimize them.

Technique	Potential side effect	Measures to be taken
Irradiation	Direct burn; long-term cardiac effect; growth delay	Use of non-lethal dose. The doses used have been extensively validated in our lab as safe and results only in growth delay
Chemotherapy	Acute toxicity	Use of non-lethal dose.
Clodronate treatment	Blindness if injected in newborns	Clodronate will be used only in adult mice.
Subcutaneous tumor engraftment	Development of tumor mass	Work with mice with tumors before HEP
Intravenous tumor engraftment	Metastasis development in the lung inducing shortness of breath and general pain.	Animal receiving IV tumor injection will be monitored closely and will be sacrificed at the first sign of discomfort. From our expertise using [REDACTED] we do not observe discomfort in the time frame used in our experiments.
Surgery (scaffold implantation or orthotopic tumor engraftment)	Pain due to the procedure	Surgery will be performed under anesthesia and appropriate analgesia will be used
Injection of effector cells	Graft versus Host if mature human T lymphocytes are injected.	Experiment involving T cells will be carried out in a limited time-frame where Graft vs Host is not expected (usually 2-3 weeks).

2. No adverse effects on the environment are expected in these experiments.

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.

Not applicable

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with

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.

Mice will be under anesthesia for
-subcutaneous tumor tissue/organoid transplantation
-subcutaneous scaffold implantation
-intravenous injections (when done in the retro-orbital plexus)
-whole body imaging procedure
-euthanasia

Mice under long anesthesia (e.g. during surgery or whole body imaging) will be maintained on a thermally-controlled surgical pad.

For subcutaneous transplantation of tumor tissue or scaffold the mice will receive postoperative pain relief.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

- Mice may experience some mild discomfort due to the size of the tumor grafts when engrafted orthotopically or metastasis develop.
- Symptoms of Graft vs Host Disease (GvHD) such as weight loss and overall cachexia (In mice with human immune system only).
- Mice may suffer from shortness of breath
- Opportunistic infections may arise.
- Pre-conditioning of the mice with sublethal irradiation or sublethal chemotherapy may result in moderate discomfort (cachexia) for a short period of time (<5 days).

Explain why these effects may emerge.

- Human immune cells (in case of human healthy cells xenograft or injection of human PBMCs) might recognize and attack mouse cells as foreign cells (Ali et al., 2012) .

- The first site of tumor metastasis is usually the lungs. Tumor formation in the lungs may cause shortness of breath.
- Immune-compromised mice, especially if they are pre-conditioned are at risk of opportunistic infections.

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

Graft versus host

The occurrence of GvHD cannot be properly controlled if human hematopoietic effector cells need to be injected. However, mice will be monitored closely and the experiment will be performed in a short timeframe that should be too short for the development of this adverse effect.

(Zie pag. 9 tabel onderste regel, over duur van experiment).

Additionally, in experiments performed in the past no adverse effects were observed after transplantation of healthy foetal tissues in immune-compromised mice.

Metastasis

Metastasis is one of the most important features of these xenograft models and cannot be controlled. Again, the assays are relatively short and the mice will be taken out of the experiment if the level of discomfort reaches a human endpoint.

Sterile conditions

To prevent opportunistic infection, mice will be housed and handled under sterile conditions.

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.

It can be decided that animals have to be sacrificed before the end of the study when high discomfort due to tumor growth is observed or severe graft versus host disease is observed.

- abnormal and sedentary behavior
- breathing difficulties
- weight loss (>20% compared to highest measured weight, or >15% in short period of time (1-2 days))
- uncoordinated or impaired movements
- subcutaneous lumps other than the implanted cells or tissue
- distended abdomen
- ulceration of the tumor
- the tumor reaching the maximum tumor size of 2 cm³

If a humane endpoint is reached, animal will be sacrificed as described in the experimental procedure. The data collected (e.g. tumor size) will be used to refine future procedures.

Indicate the likely incidence.

-Most tumor bearing mice will eventually develop tumors that exceed the maximum tumor size. When the tumor size reaches the humane endpoint, either the mice are euthanized or tumors are surgically removed for metastasis follow.

-Injection of human PBMCs is known to cause some degree of graft versus host responses. These experiments are short, GvHD is not expected in more than 5% of our (HIS) mice. If it this happens animals will be sacrificed before HEP is reached.

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').

Type of experiment	Freq. of the exp.	Mild	Moderate	Severe
Mice bearing tumors engrafted subcutaneously or intravenously	60 %	60 %	40 % (pre-conditioning, removal of the primary tumor)	
Animals engrafted with human immune cells	28 %		95 %	5% (in case of rapid GvHD)
Animals engrafted orthotopically with tumor	12 %		100 %	
Overall	100 %	36 %	62.6 %	1.4 %

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.

Animals will be killed in order to collect the tumors for subsequent 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

References:

Ali, N., Flutter, B., Sanchez Rodriguez, R., Sharif-Paghaleh, E., Barber, L.D., Lombardi, G., and Nestle, F.O. (2012). Xenogeneic graft-versus-host-disease in NOD-scid IL-2R γ null mice display a T-effector memory phenotype. *PLoS ONE* 7, e44219.

Doornebal, C.W., Klarenbeek, S., Braumuller, T.M., Klijjn, C.N., Ciampricotti, M., Hau, C.-S.S., Hollmann, M.W., Jonkers, J., and de Visser, K.E. (2013). A preclinical mouse model of invasive lobular breast cancer metastasis. *Cancer Res.* 73, 353–363.

Ellegast, J.M., Rauch, P.J., Kovtonyuk, L.V., Müller, R., Wagner, U., Saito, Y., Wildner-Verhey van Wijk, N., Fritz, C., Rafiei, A., Lysenko, V., et al. (2016). INV(16) and NPM1mut AML engraft human cytokine knock-in mice. *Blood*.

Huntington, N.D., Legrand, N., Alves, N.L., Jaron, B., Weijer, K., Plet, A., Corcuff, E., Mortier, E., Jacques, Y., Spits, H., et al. (2009). IL-15 trans-presentation promotes human NK cell development and

differentiation in vivo. *J. Exp. Med.* *206*, 25–34.

Legrand, N., Huntington, N.D., Nagasawa, M., Bakker, A.Q., Schotte, R., Strick-Marchand, H., de Geus, S.J., Pouw, S.M., Böhne, M., Voordouw, A., et al. (2011). Functional CD47/signal regulatory protein alpha (SIRP(alpha)) interaction is required for optimal human T- and natural killer- (NK) cell homeostasis in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *108*, 13224–13229.

Sukin, S.W., Chhikara, M., Zhu, X., Ayala, G., Aguilar, L.K., O'Brian Smith, E., Miles, B.J., Thompson, T.C., Kadmon, D., and Aguilar-Cordova, E. (2001). In vivo surgical resection plus adjuvant gene therapy in the treatment of mammary and prostate cancer. *Mol. Ther.* *3*, 500–506.

Traggiai, E., Chicha, L., Mazzucchelli, L., Bronz, L., Piffaretti, J.-C., Lanzavecchia, A., and Manz, M. (2004). Development of a Human Adaptive Immune System in Cord Blood Cell-Transplanted Mice. *Science* *304*, 104–107.

Weigelt, B., Peterse, J.L., and van 't Veer, L.J. (2005). Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat. Rev. Cancer* *5*, 591–602.



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'.	11800	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	AMC	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number 2	Type of animal procedure Antibody efficacy testing

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 goal of the project is to develop new cancer treatments. In this proposal we want to test new antibodies with therapeutic potential for their ability to inhibit tumor growth and spreading in an *in vivo* setting.

For this purpose, we will engraft mice with human tumor under the most optimal conditions as determined under **Appendix#1**. In the experiments described here in **Appendix#2**, we assess the *in vivo* efficacy of our tumor antibodies.

The objective is to show that the antibodies under investigation are able to eliminate the tumor altogether or slow down tumor growth or spreading of the disease. To assess the effect of our antibodies we will consider the following parameters depending whether we study a solid or hematopoietic cancer.

Solid cancers

1. Tumor size of the primary tumor.
2. The number and sizes of metastases.
3. Number of tumor cells circulating in the body.
4. Antibody and cytokine levels in the plasma.
5. FACS profiling and histology on organ and tumors.

Hematopoietic cancers

1. Number of tumor cells circulating in the body.
2. Number and sizes of chloroma (solid tumor composed of immature white blood cells).
3. Antibody and cytokine levels in the plasma.
4. FACS profiling and histology on organs and tumors.

Changes in any of these parameters should indicate that the particular antibody under investigation is able to interfere with establishment and/or progression of the cancer.

When the naked antibody has little to no effect we will test the antibody in different formats

- In combination with a known (FDA approved) therapeutic drug
for example, an anti PD1 checkpoint inhibitor antibody.
- Bispecific antibody
for example, our new antibody coupled to an antibody targeting CD3 to attract T cells.
- Antibody drug conjugate;
our new antibody coupled to a cytotoxic drug

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

Mice will be engrafted with tumor cells as described in **Appendix #1**. Tumor cells may be injected subcutaneous, intravenously or, orthotopic depending on the origin of the tumor cells and on the research question at hand.

Experimental setup

Setup testing new antibody alone

Two groups of mice will receive a tumor graft

Control group receives irrelevant control antibody for example an antibody binding an Influenza antigen

Experimental group receives the experiment anti-cancer antibody.

Setup testing new antibody in combination with a clinically approved drug

Four groups of mice will receive a tumor graft

Control group 1 receives irrelevant control antibody (e.g. anti Influenza antibody) + irrelevant control for the clinically approved drug (e.g. isotype matched control antibody)

Control group 2 receives irrelevant control antibody (e.g. anti Influenza antibody) + clinically approved drug

Experimental group 1 receives the experiment anti-cancer antibody + irrelevant control for the clinically approved drug (e.g. isotype matched control antibody)

Experimental group 2 receives the experiment anti-cancer antibody + clinically approved drug

A pilot experiment will be performed with 5 mice per group in order to assess the gross effect and assist in determining the number of animals required to obtain sufficient power.

Antibody dosing and frequency

The mice will receive antibody by IV 5 μ l/g or IP 20 μ l/g injection. In most situations 3 injections per week will be performed. Some mAbs show rapid clearance of the body and might require daily injection. Start of the antibody treatment differs per experiment. Antibody injections start either before tumor graft, at the day of tumor graft or, after tumors have been established. Mice will be treated for a maximum of 8 weeks.

Alternatively, antibody can be delivered by an osmotic pump surgically implanted subcutaneously on the back of the mice.

Injection of effector cells

As described under **Appendix#1** some antibodies require effector cells to exert an anti-tumor response.

Therefore effector cells such as total PBMCs or enriched NK cells may be co-injected with the antibody (IV 5 μ l/g or IP 20 μ l/g. When possible, one injection comprising mAb and effector cells will be performed).

Monitoring disease progression

During the course of the experiment the mice will be weighed and tumor growth will be determined. Subcutaneous tumor growth will be measured through the skin using a calliper twice a week (when the tumor is palpable) and/or by *in vivo* imaging by fluorescence or bioluminescence imaging when applicable (up to two times per week).

Non-subcutaneous growing tumors and metastasis will be directly visualised by fluorescence or bioluminescence imaging. Indirectly the number of circulating tumor cells and levels of biomarkers in the blood and by analysis at the end of the treatment. These mice will be subjected to regular bleeding (up to once a week for 8 consecutive weeks, maximum 7% of total circulating blood, 5 ml/kg) to assess the concentration of antibody and the number of circulating tumor cells. These analyses will be continued until the animals are sacrificed.

Experiment duration

Mice will be sacrificed before a humane endpoint is reached. The actual duration of the experiment will depend on the experimental setup and the mechanism of action of the antibody. Tumors in the mice will be allowed to grow for a maximum of 6 months.

As describe in Appendix #1, no mice older than 8 months will be used to prevent age-related discomfort.

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

Every tumor will have a different growth rate and standard deviation. We will therefore base our statistical analysis on the data obtained in a pilot experiment carried out with 5 mice per group.

We will use a power calculator to establish the number of mice required using $\alpha = 0.05$ and $\beta = 0.8$. We aim at finding tumor growth inhibition of more than 50%.

If possible repeated measurements will be used (for instance using luminescence imaging at several time).

For practical and reproducibility purposes, the experiment will be performed in "blocks". Not all the mice required to achieve significant power will be enrolled in one large experiment but rather in several smaller experiments carried out at different time. (for instance if 15 mice / group are required, 3 experiments with 5 mice / group will be carried out. The statistical analysis will take in account the different treatments as well as the different blocks.

B. The animals

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

Details on the strains and their origin used and how tumor bearing mice are generated is described in **Appendix#1**.

To test the anti-tumor response of an experimental antibody versus control, a pilot experiment with 5 mice per group will be performed. This experiment will be followed by a larger experiment to achieve sufficient power (including the data generated in the pilot experiment). From our experience, we have found that a number of mice between 10-15 per group is usually sufficient. Taking in account the 5 mice used in the pilot experiment, we will most likely use less than 10 mice in the follow-up experiment.

We plan to start a maximum of 2 experiments per month. All these estimations are based on the work we have been carrying out in the last year.

We estimate that we will perform 14 experiments testing a new antibody alone (2 groups) and 10 testing it in combination with an approved drug (4 groups).

	Experiment	Mice / exp	Exp / year	Groups	Mice / year
Antibody alone	Pilot	5	14	2	140
	Follow-up	10	14	2	280
Combination	Pilot	5	10	4	200
	Follow-up	10	10	4	400
Total mice/ year					1020

Of note, we have already shown that the antibodies currently in development are reactive against multiple types of cancer. Therefore, one particular antibody will be tested against more than one tumor line (included in this estimation).

For testing antibodies for their anti tumor response we request a maximum of **5 100** mice for 5 years.

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

For a long time, it is known that due to (epi)genetic alterations, *in vitro* cultured tumor cells only partially mimic the tumor cells present in patients. Moreover, spreading of tumor cells through the body (metastasis) which is the main cause for human cancer deaths, cannot be replicated faithfully *in vitro*. Tumor cells growing in immunodeficient mice (that do not reject the tumor because they lack a well-functioning immune system) are much more similar to the original tumor cells than *in vitro* cultured tumor cells. Immunodeficient mice grafted with human tumors are therefore widely used in the field to assess the efficacies and safeties of drugs including antibodies *in vivo* and extensively described in medical scientific literature.

Reduction

We identify and isolate tumor specific antibodies from cancer patients or immunised animals who show a durable remission of the tumor in response to a therapy. Only antibodies that bind to tumor only or show a much higher binding to tumor than to non-transformed healthy cells are selected for experiments to test their anti-tumor activity in mice.

As much as possible we will test several antibodies jointly in order to reduce the number of mice used as control.

Refinement

Before injecting the antibody in mice we will determine whether the antibodies that react specifically or preferentially with tumor cells, inhibit *in vitro* their proliferation or migration, or whether they kill the tumor cells either directly or indirectly by inducing Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity (ADCC),

Complement Dependent Cytotoxicity (CDC). These experiments are being done to understand the mechanisms by which the antibodies might affect tumor establishment and/or progression *in vivo*. The reactivity toward healthy mouse cells will be evaluated in order to prevent mouse-specific toxicity upon injection.

The model used to evaluate the efficacy of our antibody in this procedure will be refined in the **Appendix#1**. If possible, tumor cells will be modified to express a reporter allowing monitoring tumor growth and spreading in time by non-invasive imaging techniques.

AIMM therapeutics has dedicated of team to perform all in vivo experiments for the company. The team members are trained and will ensure that proper models and procedure are used to provide reliable data.

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

1) Engraftment of mice with tumor cells will result in the development of a tumor mass that will be a discomfort for the mouse. To reduce this discomfort, we will work only with mice carrying tumors of a limited size. The discomfort will be minimized by the application of appropriate human endpoints and use of appropriate analgesia and anaesthesia before surgery. The experimental procedures will be performed by technically skilled personnel. In order to prevent infections by opportunistic diseases, immunocompromised mice are handled in a sterile fashion (IVC, sterile food and water, handling in biohazard laminar flow cabinet). Cages are enriched with nesting and hiding material to prevent fear and stress of the mice.

2) Adverse effects on the environment are not expected.

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.

Not applicable.

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.

Anaesthesia and analgesia when tumors are surgically implanted in mice as described in Appendix #1.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

The adverse effects of growing xenografted tissue are described in **Appendix#1**. Due to their specificity toward tumor cells, additional adverse events of the antibody injections are not expected.

Explain why these effects may emerge.

In **Appendix#1** it is described how the adverse events of xenografted tissue may arise.

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

The tumor load will be determined by calliper and/or luciferase imaging. Animals will be closely monitored for signs of discomfort. When a humane endpoint is reached the animals will be euthanized and subjected to final analysis. However, from experience we know that even tumors reaching the size of the humane endpoint and metastasis are tolerated by the mice with little to no obvious signs of discomfort.

Human immune cells may cause graft versus host responses in mice but these responses are expected to remain mild for the planned duration of the experiment.

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.

- abnormal behaviour
- impaired breathing
- weight loss (>20% compared to highest measured weight or 15% in a short period (1-2 days))
- impaired mobility
- ulceration of the tumor
- tumor size larger than 2cm³

If a humane endpoint is reached, animal will be sacrificed as described in the experimental procedure. The data collected (e.g. tumor size) will be used to refine future procedures.

Indicate the likely incidence.

- Most tumor bearing mice will eventually develop tumors that exceed the maximum tumor size. When the tumor size reaches the humane endpoint, either the mice are euthanized or tumors are surgically removed to analyse formation and progression of metastases. The precise timeline of this experiment will be determined based on the observations obtained from the **Appendix#1**. Therefore, we do not expect to reach a humane endpoint in more than 10% of the mice.
- Injection of human PBMCs is known to cause some degree of graft versus host responses but given the short duration of the experiments severe effects are expected to occur in <5% of animals. In the rare cases that graft versus host response reach a humane endpoint, the mice will be euthanized before the end 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').

All the procedures associated with the monitoring of the tumor and the treatment (intravenous or intraperitoneal injection, weighing, measure tumor size by calliper, intraperitoneally luciferin injection: mild, whole body luciferase imaging procedure) are mild and will not increase the discomfort generated by the implanatation and the growth of the tumor. Estimated discomfort is therefore similar as the one idescribed in Appendix #1:

Type of experiment	Freq. of the exp.	Mild	Moderate	Severe
Mice bearing tumors engrafted subcutaneously or intravenously	60 %	60 %	40 % (pre-conditioning, removal of the primary tumor)	
Animals engrafted with human immune cells	28 %		95 %	5% (in case of rapid GvHD)
Animals engrafted orthotopically with tumor	12 %		100 %	
Overall	100 %	36 %	62.6 %	1.4 %

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.

The mice will be killed at the end of the experiment or when the humane endpoint is reached (maximum 6 months after tumor engraftment). At this point we will collect blood for serum analysis. Than we will examine the inner organs of the mouse to determine the sites of metastasis by luciferase imaging and to subsequently, collect organs 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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academisch Medisch Centrum

Meibergdreef 31
1105 AZ AMSTERDAM



**Centrale Commissie
Dierproeven**
Postbus 20401
2500 EK Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD118002016795
Bijlagen
2

Datum 20 december 2016
Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 19 december 2016. Het gaat om uw project "Preclinical testing of the efficacy of monoclonal antibodies against human cancer". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD118002016795. 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. U ontvangt binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. Als wij nog informatie van u 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 voldoen, 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).

Datum:

20 december 2016

Aanvraagnummer:

AVD118002016795

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
20 december 2016
Aanvraagnummer:
AVD118002016795

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 11800
Naam instelling of organisatie: Academisch Medisch Centrum
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 343362777
Straat en huisnummer: Meibergdreef 31
Postcode en plaats: 1105 AZ AMSTERDAM
IBAN: NL68RABO0136166741
Tenaamstelling van het rekeningnummer: Zie bijgesloten procedure voor betaling AMC

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: Senior Scientist
Afdeling: [REDACTED]
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Datum:
20 december 2016
Aanvraagnummer:
AVD118002016795

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: Scientist
Afdeling: [REDACTED]
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

Naam: [REDACTED]
Functie: Scientist
Afdeling: [REDACTED]
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 maart 2017
Geplande einddatum: 1 maart 2022
Titel project: Preclinical testing of the efficacy of monoclonal antibodies against human cancer
Titel niet-technische samenvatting: Testen antistoffen tegen kanker
Naam DEC: DEC AMC
Postadres DEC: Meibergdreef 31
E-mailadres DEC: dec@amc.nl

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1.187,-
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:

[REDACTED]

Functie:

[REDACTED]

Plaats:

Amsterdam

Datum:

19 december 2016

Datum:

20 december 2016

Aanvraagnummer:

AVD118002016795



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag


AMC Crediteurenadministratie
Postbus 400
1115 ZJ DUIVENDRECHT


**Centrale Commissie
Dierproeven**
Postbus 20401
2500 EK Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD118002016795
Bijlagen
2

Datum 20 december 2016
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 20 december 2016
Vervaldatum: 19 januari 2017
Factuurnummer: 16700795
Ordernummer: 8321 

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD118002016795	€ 1.187,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL29INGB 070.500.1512 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93144, 2509 AC te 's Gravenhage.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academisch Medisch Centrum

Meibergdreef 31
1105 AZ AMSTERDAM



8

**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD118002016795

Datum

Betreft Vervolg aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 19 december 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Preclinical testing of the efficacy of monoclonal antibodies against human cancer" met aanvraagnummer AVD118002016795. Uw aanvraag wordt in behandeling genomen. In deze brief leest u wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Wanneer een beslissing

Wij nemen uiterlijk 14 februari 2017 een beslissing. Omdat een DEC-advies is meegestuurd met de aanvraag, streven wij ernaar om de aanvraag binnen 20 werkdagen te beslissen. 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.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.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academisch Medisch Centrum

Meibergdreef 31
1105 AZ AMSTERDAM



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD118002016795

Datum 17 januari 2017
Betreft aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 19 december 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Preclinical testing of the efficacy of monoclonal antibodies against human cancer" met aanvraagnummer AVD118002016795. 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:

Niet technische samenvatting

In de NTS schrijft u onder 3.1 het opwekken van antilichamen in konijnen. Wij begrijpen dat dit niet de doelstelling van onderliggend project is, maar voor de leek kan dit verwarrend zijn omdat het kan overkomen alsof in dit project wel konijnen worden ingezet. Graag dit verhelderen in de NTS.

Leges

De leges die u verschuldigd bent zijn nog niet door ons ontvangen of de betaling is nog niet verwerkt. Uw aanvraag is niet compleet als de leges niet zijn ontvangen.

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.

Datum:

17 januari 2017

Aanvraagnummer:

AVD118002016795

Wanneer een beslissing

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

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

Bijlagen:

- Melding bijlagen
- Niet technische samenvatting



Melding bijlagen

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

Naam instelling: Academisch Medisch Centrum

Adres:

Postcode en plaats:

Aanvraagnummer: AVD118002016795

2 Bijlagen

Welke bijlagen stuurt u mee?

Vink de bijlagen aan of vul de naam of omschrijving in.

Projectvoorstel

Beschrijving Dierproeven

Niet-technische samenvatting

Melding Machtiging

Aanvraagformulier

.....

.....

.....

Datum:

17 januari 2017

Aanvraagnummer:

AVD118002016795

3 Ondertekening

Naam:

Datum: - -

Handtekening:



Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:
Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Format DEC-advies

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

A. Algemene gegevens over de procedure

Bij de punten 1 t/m 7 dienen altijd de gevraagde gegevens te worden ingevuld.

1. Aanvraagnummer
2. Titel van het project **Preclinical testing of the efficacy of monoclonal antibodies against human cancer**
3. Titel van de NTS **Het testen van antistoffen tegen kanker**
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning**
 - ~~wijziging van vergunning met nummer~~
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC **DEC-AMC**
 - telefoonnummer contactpersoon 
 - e-mailadres contactpersoon 
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken **24-11-2016**
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van / tot
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag
 - advies aan CCD
7. Afstemming IvD

De relevante onderdelen van de vergunningaanvraag (projectvoorstel en bijlagen) zijn in een traject voorafgaand aan de indiening ervan bij de DEC in overleg met de IvD tot stand gekomen.
8. Eventueel horen van aanvrager **n.v.t.**
 - Datum
 - Plaats
 - Aantal aanwezige DEC-leden
 - Aanwezige (namens) aanvrager
 - Gestelde vraag / vragen
 - Verstrekt(e) antwoord(en)
 - Het horen van de aanvrager heeft wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag
9. Correspondentie met de aanvrager **n.v.t.**
 - Datum
 - Gestelde vraag/vragen
 - Datum antwoord

- Verstrek(e) antwoord(en)
- De antwoorden hebben wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag

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

- Aard expertise
- Deskundigheid expert
- Datum verzoek
- Strekking van het verzoek
- Datum expert advies
- Advies expert

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Is het project vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)? Indien van toepassing, licht toe waarom het project niet vergunningplichtig is en of daar discussie over geweest is.

>Ja

Indien niet vergunningplichtig, ga verder met onderdeel E. Advies.

2. De aanvraag betreft

> een nieuwe aanvraag.

3. Is de DEC competent om hierover te adviseren?

> Ja

4. Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom.

> Nee

C. Beoordeling (inhoud)

1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft (*Zie handreiking 'Invulling definitie project'; zie bijlage I voor toelichting en voorbeeld*).

Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling ("to identify antibodies that impair tumor growth and/or spreading *in vivo*, or eliminate the tumor cells all together".) en kan getypeerd worden als een project met een hoofd- en één subdoel, waarvan het subdoel nodig is voor het behalen van het hoofddoel. Het hoofddoel zal voorafgegaan worden door het subdoel:

i) het ontwikkelen van een humane tumor transplantatie muismodel (tumor xenograft mouse model). Voor elke tumor zullen er tumorcellen (afkomstig uit celkweek, patiëntmateriaal of organoiden) in een muis gebracht worden om die specifieke tumor uit te laten groeien. In sommige gevallen hebben tumoren stromale cellen nodig om te kunnen groeien. In die gevallen zullen deze cellen ook toegediend worden.

ii) Het testen van de effectiviteit van antilichamen op hun therapeutische potentie. In het ontwikkelde tumormodel zal bepaald worden of de in-vitro geselecteerde antilichamen de groei en uitzaaiing van de tumor kunnen remmen of voorkomen. Eerst zullen alleen de antilichamen getest worden, maar later ook conjugaten van het antilichaam met bijvoorbeeld medicijnen of antilichamen voor andere immuuncellen (cytotoxische T of NK cellen). Het subdoel moet eerst behaald worden voordat het hoofddoel kan worden bereikt en zijn dus tijds- en uitkomstafhankelijk van elkaar. De twee doelen zijn volledig en duidelijk uitgewerkt. Dit maakt de aanvraag tot een navolgbaar geheel. Het project is haalbaar, afgaande op het voorwerk en de uitgebreide ervaring van deze onderzoekers, de omvang en de aangegeven tijdsspanne.

Het is helder welke handelingen en ongerief individuele dieren zullen ondergaan in de dierproeven die nodig zijn om de doelen te bereiken.
Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

2. Geef aan of er aspecten in deze aanvraag zijn die niet in overeenstemming zijn met wet- en regelgeving anders dan de Wod? Denk hierbij aan bijvoorbeeld de Flora en fauna wet en Wet dieren. Indien van toepassing, leg uit om welke aspecten het gaat en waarom hier sprake van is.
> Niet, voor zover kan worden opgemaakt uit de aanvraag.
3. Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Nevendoelstellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel.
> De aangekruiste doelcategorie "translationeel onderzoek" sluit aan bij de hoofddoelstelling. Er wordt gezocht naar antilichamen die therapeutisch potentie hebben voor het behandelen van tumoren.

Belangen en waarden

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een reële relatie is tussen beide doelstellingen (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C4; zie bijlage I voor voorbeeld*).
> Het directe doel van het project is het ontdekken van antilichamen die tumorgroei en uitzaaiing kunnen remmen of voorkomen. Het uiteindelijke doel is het bijdragen aan een behandeling tegen kanker met deze antilichamen.
Het betreft hier translationeel onderzoek. Het directe doel vormt een logisch en onmisbaar deel van de route naar het uiteindelijke doel.
5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 2.B en tabel 1; zie bijlage I voor voorbeeld*).
> De belangrijkste belanghebbenden in dit translationele project dat gericht is op het ontdekken van antilichamen die tumor groei en uitzaaiing kunnen voorkomen of remmen, zijn de proefdieren, de onderzoekers en, op termijn, kankerpatiënten.

Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: de dieren zullen stress en pijn ondervinden gedurende de proeven. Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: de onderzoekers zullen kennis verkrijgen. Ook zullen de carrièremogelijkheden van de onderzoekers verbeteren door publicaties en mogelijk patenten.

Waarden die voor kankerpatiënten en hun sociale netwerken bevorderd worden: het ontwikkelen van een nieuwe behandelingsmethode waardoor de genezingskansen zullen toenemen.

6. Geef aan of er sprake kan zijn van substantiële milieueffecten. Zo ja, benoem deze, leg uit waarom daar sprake van kan zijn en of geef aan of deze effecten afgedekt worden door specifieke wetgeving.
> Er is geen sprake van substantiële milieueffecten, voorzover de DEC dit kan overzien.

Proefopzet en haalbaarheid

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw antwoord toe. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C5*).

> De IvD ziet erop toe dat alle personen die bij dit onderzoek betrokken zullen zijn, zowel de analisten en onderzoekers die de experimenten gaan uitvoeren, als de onderzoekers die het project hebben vormgegeven en opgeschreven, voldoen aan de wettelijke eisen van deskundigheid en kennis.

De onderzoeksgroep heeft veel ervaring met de transplantatie van tumorweefsel in muizen. Hierdoor heeft de groep de expertise in huis om alle voorgestelde proeven uit te kunnen voeren en is er voldoende kunde in huis om aan de-3V beginselen te kunnen voldoen. Alle dierproeven worden door een vast en toegewijd team uitgevoerd. Het lab is gespecialiseerd in het isoleren en karakteriseren van nieuwe antilichamen tegen virale, bacteriële en tumor doelwitten. Sommige antilichamen tegen infectieuze ziektes worden reeds in een fase 2/3 studie getest.

8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw antwoord toe. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C6*).

> De opzet van het project en van de experimenten die worden ingezet voor elk van de doelen, is logisch en goed te begrijpen. Voor de start van de in-vivo proeven, wordt in-vitro eerst bepaald of de antilichamen reactiviteit laten zien tegen de tumoren en vrijwel geen reactiviteit tegen gezond weefsel. De uitkomstparameters van de in-vivo proeven zijn in het perspectief van het directe doel volstrekt logisch: al of geen groei van een bepaalde tumor in de muis (subdoel) en de mate van tumorremming door elk van de specifieke antilichamen die zullen worden getest (hoofddoel). Er is hier sprake van een project met heldere onderzoeksopzet, die aansluit bij de gestelde doelen. De DEC verwacht dan ook dat de doelstellingen bereikt kunnen worden.

Welzijn dieren

9. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. Beoordeel of de keuze hiervoor voldoende wetenschappelijk is onderbouwd en de aanvrager voldoet aan de in de Wod voor de desbetreffende categorie genoemde beperkende voorwaarden. Licht uw antwoord toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C1; zie bijlage I voor toelichting en voorbeelden*).

- Bedreigde diersoort(en) (10e, lid 4)
- Niet-menselijke primaten (10e)
- Dieren in/uit het wild (10f)
- Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn)
- Zwerfdieren (10h)
- Hergebruik (1e, lid 2)
- Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
- Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
- Dodingsmethode niet volgens bijlage IV richtlijn (13c, lid 3)

> Er is geen sprake van bijzondere dieren, omstandigheden of behandelingen.

10. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de richtlijn. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan omdat het om wetenschappelijke redenen noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht toe waarom wel/niet.

> Er is voldaan aan bijlage III

11. Beoordeel of het ongerief als gevolg van de dierproeven realistisch is ingeschat en geclassificeerd, waarbij uitgegaan wordt van de kans op angst, pijn, stress en/of ziekte bij individuele dieren (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*).

> Ongeriefinschatting is in overleg met de IvD tot stand gekomen, met gebruikmaking van de Toelichting Codering Ongerief. De DEC acht de inschatting realistisch.

12. Geef aan op welke wijze de integriteit van de dieren wordt aangetast (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*). (*zie bijlage I voor voorbeeld*).

> De "heelheid" van het dier wordt niet zodanig aangetast dat sprake is van vermindering of ontneming van soortspecifieke eigenschappen of van ernstige pijn. Het dier blijft in staat om binnen de context van huisvesting en experiment zelfstandig te functioneren.

13. Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. Licht uw antwoord toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

> De humane eindpunten zijn helder gedefinieerd, en de inschatting van het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken (door tumor groei of "graft vs host" ziekte) is, op basis van ervaring van de onderzoeksgroep, realistisch ingeschat. Tumoren die te groot zijn, worden verwijderd en minder dan 5% van de dieren ontwikkelt "graft vs host" ziekte.

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

> De aanvrager geeft aan dat tumorcellen in-vitro veranderen en geen goede afspie-

geling geven van het tumor gedrag in patiënten. Daarnaast valt uitzaaiing niet te bestuderen in vitro. Vervanging van de dierproeven is hierdoor niet mogelijk, maar waar mogelijk maken de onderzoekers gebruik van in vitro experimenten om de meest veelbelovende antilichamen te selecteren en zo het aantal proefdieren te verminderen. De DEC vindt dat de aanvrager het voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen vervangingsalternatieven mogelijk zijn voor deze vraagstellingen.

15. Beoordeel of het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en of er een heldere strategie is om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Onderbouw uw antwoord (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

> De aantallen dieren voor het ontwikkelen van de tumor modellen zijn stapsgewijs ingeschat, zonder statistiek. En zijn gebaseerd op de aanwezige capaciteit om 5 modellen per jaar te kunnen testen. Er wordt eerst in twee dieren gekeken of een tumor gaat groeien. Op basis van deze resultaten wordt het protocol aangepast en worden twee nieuwe muizen getransplanteerd met tumor weefsel. Er wordt verwacht dat er minder dan 5 rondes nodig zijn om een model te verkrijgen. Dan worden er nog 10 extra muizen gebruikt ter validatie van het model. Alleen als er meer dan 80% van de dieren een tumor ontwikkelen zal het model gebruikt worden voor de vervolproeven met antilichamen.

Het aantal dieren in deze vervolproeven is berekend op basis van een power van 80% en een tweezijdige alpha van 0.05. De remming van tumorgroei zou meer moeten zijn dan 50%. De standaarddeviatie is voor ieder tumor model verschillend en zal op basis van een pilot experiment met 5 muizen bepaald worden. Hierdoor wordt een realistische schatting gemaakt voor het aantal dieren dat nodig is om een statistisch significant verschil te behalen.

16. Beoordeel of het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project zodanig is opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd? Licht uw antwoord toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

> De antilichamen worden eerst in-vitro gekarakteriseerd waardoor alleen dierproeven gedaan worden met antilichamen met de hoogste potentie om in vivo tumor groei te remmen. Er worden immunodeficiente muizen, genetisch gemodificeerde muizen en Human Immune System muizen gebruikt om de tumorgroei zo goed mogelijk (gelijkend op de humane situatie) te bestuderen. Door gebruik van reporters in tumorcellen kan de groei en metastasering van tumoren worden gemeten met behulp van non-invasieve afbeeldingstechnieken. Dit draagt bij aan zowel de verfijning als aan vermindering van het aantal proefdieren. De humane eindpunten zijn duidelijk geformuleerd, waarmee de mate van verfijning verder is geborgd.

17. Beoordeel, indien het wettelijk vereist onderzoek betreft, of voldoende aannemelijk is gemaakt dat er geen duplicatie plaats zal vinden en of de aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om tijdens de uitvoering van het project te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt. Onderbouw uw antwoord.

> n.v.t.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd? Geef ook aan welke maatregelen verder zijn getroffen om bij fok of aankoop van dieren het aantal in voorraad gedood te beperken (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3; zie bijlage I voor voorbeeld*).

De aanvrager geeft aan dat van bepaalde tumoren bekend is dat ze in één van de geslachten minder goed aanslaan. In zulke gevallen wordt alleen het geslacht gebruikt waarin de tumoren goed groeien. Als bepaalde tumoren in beide geslachten even goed groeien, kunnen in principe beide geslachten in gelijke aantallen worden gebruikt. Bij muizen die binnen de eigen proefdierfaciliteit kunnen worden gefokt, zal dit ook worden gedaan. Als muizen bij een commerciële fokker moeten worden besteld, treedt er bij de mannelijke muizen veel vechten op, wat het gebruik in experimenten ernstig belemmert; in dat geval zullen alleen vrouwelijke muizen worden gebruikt.

De DEC acht deze overwegingen, argumenten en gemaakte keuzes correct. Het vechten van mannelijke muizen levert stress op die de uitkomst van de experimenten zal kunnen beïnvloeden. Het individueel huisvesten van mannelijke muizen is om twee redenen geen oplossing: a. individuele huisvesting voor langere tijd resulteert in een ernstig stress syndroom, dat eveneens de waarde van de experimenten zou ondergraven; b. als de mannelijke muizen individueel moeten worden gehuisvest, moeten ook alle vrouwelijke muizen individueel worden gehuisvest, omdat anders de resultaten uit mannelijke muizen niet vergelijkbaar zouden zijn met die uit vrouwelijke muizen. c. daarnaast is het praktisch onuitvoerbaar vanwege het grote ruimtebeslag (10x zo groot als bij groepshuisvesting).

19. Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef). Indien dieren gedood worden, geef aan of en waarom dit noodzakelijk is voor het behalen van de doelstellingen van het project. Indien dieren gedood worden, geef aan of er een voor de diersoort passende dodingsmethode gebruikt wordt die vermeld staat in bijlage IV van de richtlijn. Zo niet, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht dit toe. Indien van toepassing, geeft ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).
- > De dieren worden in het kader van de proef gedood volgens een methode van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Doden is noodzakelijk omdat in het kader van het experiment de weefsels uit het dier moeten worden gehaald voor analyse.
20. Indien niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren worden gedood om niet-wetenschappelijke redenen, is herplaatsing of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is.
- > n.v.t.

NTS

20. Is de niet-technische samenvatting een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd?
- > Ja, deze is in overleg met de afdeling communicatie van de vergunninghouder bewerkt met het oog op de begrijpelijkheid.

D. Ethische afweging

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

Rechtvaardigt het verkrijgen van antilichamen met een tumor remmende werking en/of uitzaaiing voorkomende antilichamen, het geringe tot ernstige ongerief dat de muizen als proefdieren in het onderzoek zullen ervaren?

2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn ten opzichte van elkaar af. Om dit proces te vergemakkelijken, kunt u de belangrijkste belanghebbenden en de belangrijkste waarden die in het geding zijn waarderen. U kunt dit verwoorden in termen van gering, matig of veel/ernstig voordeel of nadeel. Geef aan waarom de DEC bevordering van waarden (baten) voor de ene belanghebbende prevaleert boven de aantasting van waarden (kosten) voor de andere belanghebbende (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.B; zie bijlage I voor voorbeelden*).

De belangrijkste belanghebbenden in dit translationele project dat gericht is op *het verkrijgen van antilichamen met een remmende werking op tumorgroei of uitzaaiing*, zijn op korte termijn de proefdieren en de onderzoekers.

Op langere termijn bestaan de belanghebbenden uit de groepen patiënten die lijden aan verschillende soorten kanker.

De 5600 proefdieren worden door dit onderzoek geschaad omdat het pijn en stress veroorzaakt. De dieren zullen licht (36%), matig (62,6%) tot maximaal ernstig (1.4%) ongerief ondergaan.

De andere groep direct belanghebbenden, namelijk de onderzoekers, zullen kennis en inzichten krijgen over de werking van antilichamen in het remmen van tumor groei en uitzaaien door dit onderzoek, wat gedeeld wordt met het wetenschappelijke veld. Op die manier wordt bijgedragen aan de ontwikkeling van het vakgebied. Aanvullende belangen van onderzoekers zouden kunnen zijn dat meewerken aan dit onderzoek hun carrièremogelijkheden vergroot door publicaties en dat zij nieuwe vindingen mogelijk kunnen patenten.

De waarden en belangen van patiënten spelen ook een belangrijke rol in dit translationele onderzoek. De identificatie van deze antilichamen kan een belangrijke bijdrage leveren aan het ontwikkelen van een nieuwe therapie voor kanker. Deze techniek wordt al onderzocht in fase 2/3 studies gericht op het behandelen van infectieuze ziekten. De toepassing van deze kennis zou in de nabije toekomst een realistische optie kunnen zijn, maar behoort niet tot het directe onderzoeksdoel van deze studie.

Het ongerief dat de dieren zullen ondergaan acht de DEC gerechtvaardigd door de verwachte gunstige gevolgen van dit onderzoek. De DEC waardeert het identificeren van deze antilichamen, en daarmee het maatschappelijk belang in het ontwikkelen van nieuwe kankertherapieën, als het meest zwaarwegende gevolg dat tegenover het ongerief van de 5600 muizen staat.

3. Beantwoord de centrale morele vraag. Maak voor het beantwoorden van deze vraag gebruik van bovenstaande afweging van morele waarden. Maak daarnaast gebruik van de volgende moreel relevante feiten: belang onderzoek (C4), kennis en kunde van betrokkenen (C7), haalbaarheid doelstellingen (C8), categorieën en herkomst dieren (C9), 3V's (C14-C18), ongerief (C10-13 en C19) en relevante wet en regelgeving (C2). Onderbouw hoe al deze elementen zijn meegewogen bij de beantwoording van de centrale morele vraag, zodanig dat het navolgbaar is zonder gedetailleerde kennis te hebben van het projectvoorstel (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.C; zie bijlage I voor voorbeeld*).

Het testen van antistoffen tegen kanker

De DEC is van mening dat het belang van het identificeren van antilichamen die tumorgroei en/of uitzaaiing en de bijdrage aan therapeutische verbeteringen voor kanker (het maatschappelijke belang), het geringe (36%), matige (62.6%) tot ernstige (1.4%) ongerief dat de in totaal 5600 muizen als proefdieren in dit onderzoek zullen ervaren, rechtvaardigt.

De DEC acht het aannemelijk dat de doelstelling behaald zal worden. Om dit doel te bereiken worden immuundeficiëntie, transgene en Humaan immuunsysteem muizen als proefdieren gebruikt. De onderzoekers beperken het ongerief van de dieren door verschillende maatregelen per techniek (zie tabel in appendix 1 onder punt D, veel ervaring met de modellen, duidelijk geformuleerde humane eindpunten, er wordt anesthesie en analgesie toegepast tijdens de operaties, de kans op graft versus host ziekte wordt verlaagd door deze experimenten in een korte tijdspanne uit te voeren zodat de ziekte zich niet kan ontwikkelen).

De DEC is bovendien van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en dat de gekozen strategie en de experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van deze doelstellingen binnen de kaders van het project. De DEC is er verder van overtuigd dat de aanvrager voldoende kennis en kunde heeft om de doelstelling te behalen. De groep beschikt over veel ervaring met de HIS muis en met de verschillende tumormodellen. Een vast en toegewijd team zal de dierproeven uitvoeren, waardoor alle kennis en kunde in huis is. Tevens verwacht de DEC op basis van deze aanvraag dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om zowel het ongerief van de dieren alsmede het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken. De aanvrager heeft volgens de DEC overtuigend aangegeven dat gebruik van muizen voor het behalen van het directe doel noodzakelijk is en dat er geen geschikte proefdiervrije alternatieven mogelijk zijn.

Gezien het bovenstaande is de DEC van mening dat dit project het gebruik van proefdieren rechtvaardigt.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden

Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.

Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist

Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...

De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen

De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...

De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...

2. Het uitgebrachte advies kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt in de DEC. Indien gebaseerd op een meerderheidsstandpunt, specificeer het minderheidsstandpunt op het niveau van verschillende belanghebbenden en de waarden die in het geding zijn (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.A; zie bijlage I voor voorbeeld*).

Het advies is in de DEC vergadering unaniem tot stand gekomen.

3. Omschrijf de knelpunten/dilemma's die naar voren zijn gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies zowel binnen als buiten de context van het project (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.B*).

Dit is niet van toepassing, daar dit valt onder de vertrouwelijkheid binnen de DEC conform artikel 5 van haar reglement, maar voor zover relevant is deze verwerkt in de ethische afweging onder D. Daarenboven is de DEC niet gewoon projectaanvragen buiten de context c.q. haar verantwoordelijkheid en competentie te beoordelen.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academisch Medisch Centrum

Meibergdreef 31
1105 AZ AMSTERDAM



**Centrale Commissie
Dierproeven**
Postbus 20401
2500 EK Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD118002016795
Bijlagen
1

Datum 22 februari 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 19 december 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Preclinical testing of the efficacy of monoclonal antibodies against human cancer" met aanvraagnummer AVD118002016795. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 20 februari 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Op ons verzoek heeft u een kleine tekstuele aanpassing in de NTS doorgevoerd.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning.

Met het oog op artikel 10a, lid 1, zijn er algemene voorwaarden gesteld.

U kunt met uw project "Preclinical testing of the efficacy of monoclonal antibodies against human cancer" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 maart 2017 tot en met 28 februari 2022. Deze termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat een project een looptijd van maximaal 5 jaar kan hebben.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Beoordeling achteraf

Na afloop van het project zal er een beoordeling plaatsvinden, zoals bedoeld in artikel 10a1, lid 1d en lid 3, in de wet. Meer informatie over de eisen bij een beoordeling achteraf vindt u in de bijlage.

Beoordeling achteraf dient plaats te vinden vanwege ernstig ongerief bij een deel van de dieren.

Datum:
22 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD118002016795

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC AMC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 19 december 2016. 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. Dit advies van de commissie nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

Bezwaar

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen.

Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

Bij het indienen van een bezwaarschrift vragen we u in ieder geval de datum van de beslissing waartegen u bezwaar maakt en het aanvraagnummer te vermelden. U vindt deze nummers in de rechter kantlijn in deze brief.

Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige 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).

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

Datum:
22 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD118002016795

[REDACTED]
ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

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: Academisch Medisch Centrum
Adres: Meibergdreef 31
Postcode en plaats: 1105 AZ AMSTERDAM
Deelnemersnummer: 11800

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 maart 2017 tot en met 28 februari 2022, voor het project "Preclinical testing of the efficacy of monoclonal antibodies against human cancer" met aanvraagnummer AVD118002016795, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC AMC. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Senior Scientist. Voor de uitvoering van het project is Scientist verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 19 december 2016
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 19 december 2016;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 20 februari 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 19 december 2016, ontvangen op 19 december 2016.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 20 februari 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Setup tumor xenograft models / Xenograft				
	Muizen (Mus musculus) / Immunodeficiente en transgene muizen	500	1% Ernstig 63% Matig 36% Licht	
3.4.4.2 Antibody efficacy testing				
	Muizen (Mus musculus) / zie appendix 3.4.4.1	5.100	1% Ernstig 63% Matig 36% Licht	

Aanvraagnummer:
AVD118002016795

Voorwaarden

Op grond van artikel 10a1 lid 2 van de Wet op de dierproeven zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet en wordt daarom voorzien van beoordeling achteraf. Deze beoordeling zal uiterlijk februari 2023 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 de dierproeven conform de vergunning waren.

De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat go/no go momenten worden afgestemd met de IvD.

In artikel 10, lid 1 sub a 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 afstemming met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarde wijzigen of intrekken.



Aanvraagnummer:

AVD118002016795

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 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

Aanvraagnummer:
AVD118002016795

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 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 13d 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 13c 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.

De Minister heeft vrijstelling ontheffing verleend volgens artikel 13c, die de afwijkende methode van doden op basis van wetenschappelijke motivering ten minste even humaan acht als de in de richtlijn opgenomen passende methoden.

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.



27 DEC 2016

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 10300 <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"> <tr> <td>Naam instelling of organisatie</td> <td>Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen</td> </tr> <tr> <td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td> <td>Instantie voor dierenwelzijn</td> </tr> <tr> <td>KvK-nummer</td> <td>4 1 0 5 5 6 2 9</td> </tr> </table>	Naam instelling of organisatie	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	Instantie voor dierenwelzijn	KvK-nummer	4 1 0 5 5 6 2 9									
Naam instelling of organisatie	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen																
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	Instantie voor dierenwelzijn																
KvK-nummer	4 1 0 5 5 6 2 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"> <tr> <td>Straat en huisnummer</td> <td>Geert Groteplein 10</td> </tr> <tr> <td>Postbus</td> <td>9101, t.a.v. [REDACTED]</td> </tr> <tr> <td>Postcode en plaats</td> <td>6500HB Nijmegen</td> </tr> <tr> <td>IBAN</td> <td>NL90ABNA0231209983</td> </tr> <tr> <td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td> <td>UMC St Radboud</td> </tr> </table>	Straat en huisnummer	Geert Groteplein 10	Postbus	9101, t.a.v. [REDACTED]	Postcode en plaats	6500HB Nijmegen	IBAN	NL90ABNA0231209983	Tenaamstelling van het rekeningnummer	UMC St Radboud					
Straat en huisnummer	Geert Groteplein 10																
Postbus	9101, t.a.v. [REDACTED]																
Postcode en plaats	6500HB Nijmegen																
IBAN	NL90ABNA0231209983																
Tenaamstelling van het rekeningnummer	UMC St Radboud																
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1"> <tr> <td>(Titel) Naam en voorletters</td> <td>[REDACTED]</td> <td><input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td>[REDACTED]</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 type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.	Functie	[REDACTED]		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]	
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" 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"> <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>[REDACTED]</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	[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 type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
| Functie | Instantievoor Dierenwelzijn | |
| 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 | 22 . 01 . 2017 |
| Einddatum | 22 . 01 . 2022 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Development of a cell therapy against the muscular phenotype of Myotonic Dystrophy
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Ontwikkeling van een celtherapie voor Myotone Dystrofie type 1
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|---|
| Naam DEC | RU DEC |
| Postadres | Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen [REDACTED] |
| E-mailadres | [REDACTED] |

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1.441,00 Leges
- Wijziging € Leges
- 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
- DEC-advies en factuurinformatie

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	Instantie voor dierenwelzijn
Plaats	Nijmegen
Datum	22 - 12 - 2016
Handtekening	[REDACTED]

Form Project proposal

- This form should be used to write the project proposal of 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'.	10300
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
1.3	Provide the title of the project.	Development of a cell therapy against the muscular phenotype of Myotonic Dystrophy type 1

2 Categories

2.1	Please tick each of the following boxes that applies to your project.	<input checked="" type="checkbox"/> Basic Research <input checked="" type="checkbox"/> Translational or applied research <input type="checkbox"/> Regulatory use of routine production <input type="checkbox"/> Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare dier <input type="checkbox"/> 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.

Myotonic dystrophy (dystrophia myotonica, DM1 in short) is the most common adult form of muscular dystrophy, with a prevalence of approximately 10 per 100,000 people. This chronic progressive multisystemic disorder is characterized by cognitive problems, myotonia and muscular dystrophy with progressive muscle wasting leading to increased limitations in motor capacity. The progressive skeletal muscle phenotype represents one of the most disabling aspects of DM1. Muscle degeneration is followed by myofiber regeneration as the body has self renewal potency. The process of self renewal is initiated by resident [REDACTED] in the skeletal muscle. However, this is a limited system that is rapidly exhausted. Simulating the process of self renewal [REDACTED] complementing the defective muscle cells and fibers, is a highly promising approach to combat the muscular characteristics of DM1. We wish to study this approach, summarized in the figure below.

When using [REDACTED] we need to consider the [REDACTED] of DM1 present in [REDACTED]. The [REDACTED]

[REDACTED] As a consequence, cell metabolism is disturbed [REDACTED]

This disease causing process can be modeled in transgenic mice. We will use two mouse models ([REDACTED] from the [REDACTED] line. In the [REDACTED] mouse the [REDACTED]. In the [REDACTED] mouse model the [REDACTED], as a result of [REDACTED] [REDACTED] transgenic mice carrying [REDACTED] with the [REDACTED] locus [REDACTED] [REDACTED] show that muscle atrophy is already present at [REDACTED]. Maximal force generation is reduced with 35% in the skeletal muscles of [REDACTED]. This progressive weakness observed in these mice is directly related to the reduced muscle mass and muscle fiber size. No symptoms are found in the mouse model with a [REDACTED]

Research so far has been directed against the molecular effects of [REDACTED]. For example the degradation of [REDACTED] by [REDACTED] or inhibition of protein binding. However, these approaches do not eliminate the causative [REDACTED]. [REDACTED] can be used to remove the [REDACTED], thereby eliminating the presence of the [REDACTED]. Via this process healthy [REDACTED] with therapeutic value can be generated.

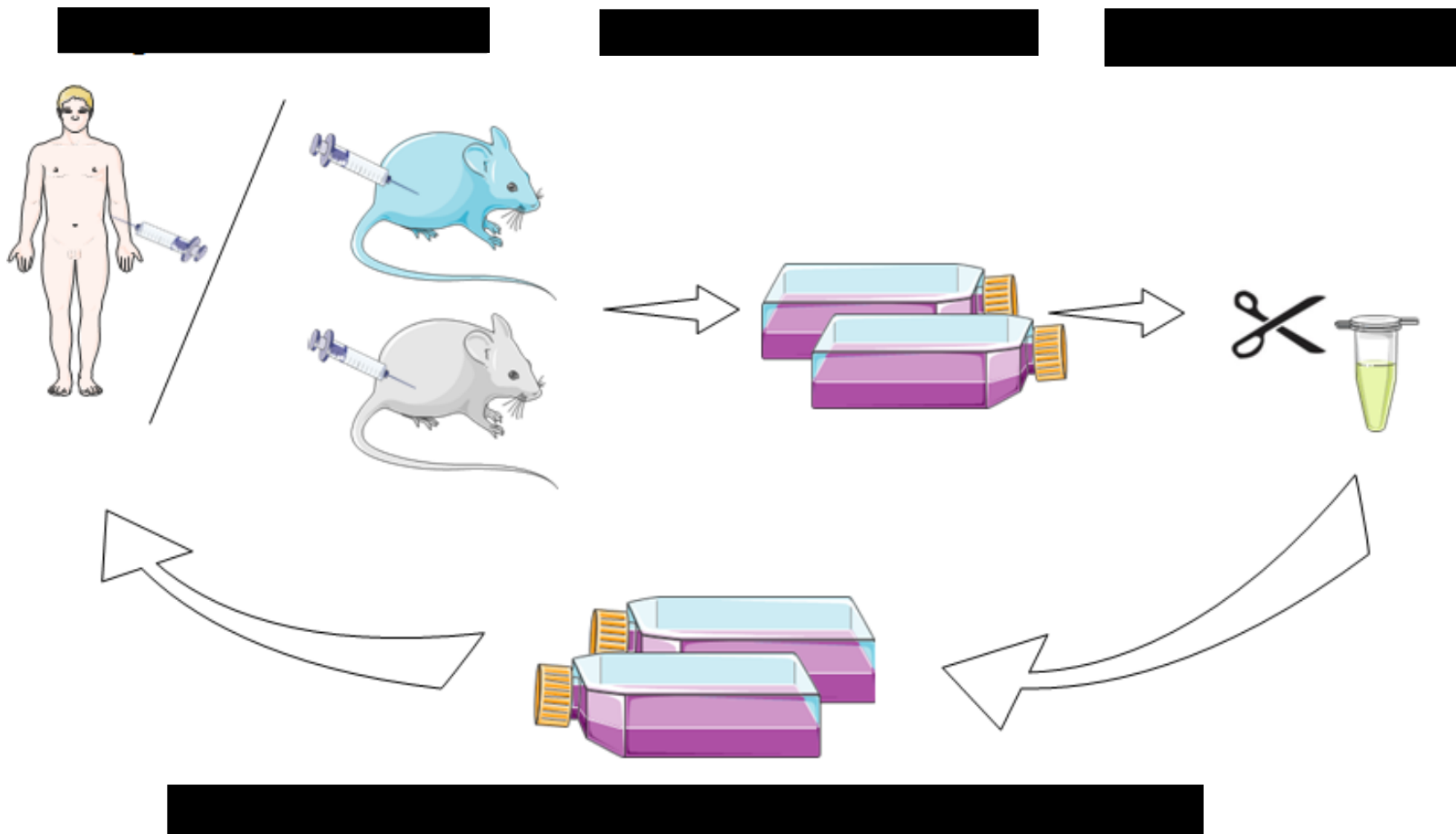
We will use two parallel approaches to [REDACTED]: (1) [REDACTED] tissue will be taken from the DM1 mouse model and healthy control mice to [REDACTED] and (2) patient and control [REDACTED] will serve to [REDACTED]. These [REDACTED] can be [REDACTED] by the [REDACTED] technique. Delivery of [REDACTED] coupled with [REDACTED], already resulted in [REDACTED] in cells from a DM1 patient and in cells from DM1 mice ([REDACTED]). In the next step, we would like to investigate whether [REDACTED] can be [REDACTED] in mice and contribute to muscle regeneration *in vivo*. We intend to use both [REDACTED] and [REDACTED] as well as [REDACTED] (and possibly [REDACTED] cells, see below) for their potential to participate to muscle tissue and muscle function *in vivo*. We have chosen for the parallel [REDACTED] cell approach since experiments in DM1 mouse models will provide a functional read-out where the effectiveness of the therapy can be measured, while [REDACTED] of [REDACTED] for the [REDACTED] will provide information on feasibility later on in humans. Answers to both the functional and the species aspect are in our view crucial to reach the goal of our project. A CMO (Commissie Mensgebonden Onderzoek) application has recently been approved by the [REDACTED]. We aim to collect [REDACTED] biopsies of nine DM1 patients and two healthy individuals to [REDACTED] and [REDACTED] which can be tested in [REDACTED] as shown in the illustration.

[REDACTED] are [REDACTED] that form [REDACTED] (also known as a [REDACTED]). These [REDACTED] form [REDACTED] by the process of [REDACTED] are [REDACTED] that can become [REDACTED] and have the potential to contribute to [REDACTED]. The potential of both [REDACTED] and [REDACTED] has already been studied in the treatment of [REDACTED]. [REDACTED] meet all criteria to be used as [REDACTED]. They exhibit high [REDACTED] capacity, good *ex vivo* proliferation capacity and they have the capability to [REDACTED] thereby [REDACTED]. These properties have also prompted investigations towards the use of [REDACTED] in the treatment of [REDACTED]. Moreover, very recently a phase I/II clinical study started treatment with delivery of [REDACTED] boys. Transplantation of [REDACTED] in humans proved to be feasible and relatively safe ([REDACTED]).

When we translate this approach to the clinic, [REDACTED] biopsy can be [REDACTED] and used as [REDACTED] therapy for muscle regeneration. This would be a preferred approach as we can easily obtain [REDACTED] and there is no immune reaction to the [REDACTED]. However, we need to be able to generate enough [REDACTED] for therapy purposes. There are a few variables to take into account: i) the number of [REDACTED]; ii) the number of [REDACTED] that can be [REDACTED]; and iii) the amount of [REDACTED] for [REDACTED] depending on the number of [REDACTED] that home to the [REDACTED] place and contribute to myogenesis. If we need more [REDACTED] than we can generate via [REDACTED] in [REDACTED] we will use [REDACTED] from DM1 patients. This approach has been used

before in research to [REDACTED] are generated from somatic cells of DM1 patients. The [REDACTED] represent an [REDACTED] of cells that can be differentiated towards [REDACTED] lineages such as [REDACTED] and [REDACTED]. By injecting [REDACTED]-derived [REDACTED] into an [REDACTED] mouse model ([REDACTED]) we can investigate the contribution to regeneration of skeletal muscle.

In sum, in this project we aim to [REDACTED] from DM1 mouse models and patients (i.e., [REDACTED] or [REDACTED] in which the [REDACTED]). These [REDACTED] will be tested on their therapeutic value after administration into mice.



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?

In this project, we propose a preclinical study aimed to develop a new strategy for therapeutic intervention against the [redacted] phenotype in DM1. [redacted] and [redacted] have the potential to functionally integrate in [redacted] and contribute to [redacted]. Therefore, we aim to investigate whether [redacted] and [redacted] [redacted] or [redacted] can be used for regenerative [redacted] therapy. These objectives are within reach as:

a.) [redacted] of [redacted] from mouse [redacted] has been achieved before ([redacted]). During a stay of 1 month in the lab of [redacted] gained experience in [redacted] of [redacted]. The group of [redacted] published on [redacted] and therapeutic approaches for DMD and is considered to be the leading research group in the field ([redacted]). We are now in the process of setting up the pericyte isolation techniques in our own lab, here in Nijmegen.

b.) the technique to [redacted] the [redacted] is present in our lab and is succesful in [redacted] and [redacted] cells ([redacted])

c.) delivery of [redacted] has been performed previously for treatment of [redacted]

d.) [redacted] was shown to be a promising therapeutic approach in patients with [redacted]. The group has ample experience working with [redacted] and [redacted]. In addition, a collaboration exists with [redacted] and very experienced with [redacted] in [redacted] (also called [redacted]).

3.3 Relevance

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

DM1 is a complex, [redacted] and [redacted] disorder with one of the most [redacted] clinical pictures. Despite the huge impact of DM1 on daily life of both patients and their family members, DM1 patients fail to receive the quality of healthcare that is, or should be, available. Often they are not assertive users of the health care system. Several treatments are focused on reducing limitations and supporting participation in everyday activities. Large efforts are recently set up to improve quality of life of DM1 patients by internationally improving clinical practice and standards of care. For example, the [redacted] aims to use exercise therapy and Cognitive Behavioural Therapy (CBT)

to improve functional capacity, improve muscle function, stimulate an active lifestyle, reduce fatigue sensation and increase quality of life [REDACTED]

There is currently no cure nor treatment available for the [REDACTED] of DM1. In this project, we will contribute to better care for patients by testing the feasibility of a [REDACTED] in mice by using [REDACTED] s. We will a) determine the optimal conditions for [REDACTED] b) establish an efficient protocol for [REDACTED] of the [REDACTED] and c) determine the most optimal conditions for [REDACTED]. Finally, we will examine the contribution of [REDACTED] to [REDACTED] by investigating how [REDACTED] by investigating how [REDACTED]. Taken together, this project will result in valuable novel knowledge that contributes to a better understanding of the important and therapeutic role [REDACTED] play in patients with [REDACTED] disorders.

3.4 Research Strategy

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

Aim 1: [REDACTED]
Aim 2: [REDACTED]

Approach:

- Obtain [REDACTED]
- mouse [REDACTED]
 - mouse [REDACTED]
 - [REDACTED]
 - human [REDACTED]
 - human [REDACTED]

To [REDACTED], mice will be sacrificed by cervical dislocation or CO2 euthanization and [REDACTED] (usually from the hind leg) are dissected. Human [REDACTED] are isolated from a skeletal muscle biopsy of participants (CMO application; approved), human DM1 patient or control [REDACTED] [REDACTED] are already available in our lab. [REDACTED] will be purchased. [REDACTED] methodology has already been applied in our lab on [REDACTED] from DM1 mice and on [REDACTED] from a DM1 patient [REDACTED]. In short, the procedure is as follows: cells are [REDACTED] expressing [REDACTED] and [REDACTED]. The [REDACTED] with a [REDACTED] allows us to study the effectiveness of transduction. We will optimize this entire process to obtain:

- a) the most [REDACTED] protocol (number of [REDACTED] obtained [REDACTED]),
- b) highest percentage of [REDACTED] [REDACTED] with [REDACTED],
- c) the maximum number of [REDACTED] by the maximum amount of amplification/passages.

We want to investigate the ability of the [redacted] mouse [redacted] to contribute to functional [redacted]. To assess *in vivo* [redacted] of [redacted] and wild-type healthy mouse [redacted] we will [redacted] in DM1 mice or [redacted] litter mates, preferably in the hind leg muscle. For the experiments we will [redacted] (either by [redacted] or placebo (salt solution)). To investigate the feasibility of this therapeutic approach in [redacted] (obligatory preclinical research), [redacted] are [redacted] and [redacted] into [redacted]. These [redacted] show no [redacted] phenotype, therefore a functional read-out is not possible but the feasibility question will be answered. [redacted] represent an infinite source of cells that can be differentiated towards [redacted] lineages such as [redacted] and [redacted]. Because of the unlimited number, these cells are valuable for additional experiments e.g. [redacted] can provide information of the effect of the [redacted], proliferation, differentiation, homing and myogenic capacity. They can be used to optimize [redacted] and if the number of [redacted] and/or genetically corrected from patients/mouse models is too low or the amount of cells needed for functional recovery is too high, we plan to use unlimited hiPSC.

After [redacted] mice will be sacrificed and [redacted] will be collected for molecular or immunohistochemical analysis or for functional analysis of [redacted] *in vitro*. The number of [redacted] that have successfully engrafted and survived are analyzed. This way we can analyze the competition between [redacted] and [redacted] and investigate the differences in differentiation or contribution to [redacted]. In addition, we can trace the localization and see whether [redacted] have homed to other tissues, e.g. the vascular system and fat bodies. The similar identity in [redacted] and the immune-privileged properties of the [redacted] will preclude immune responses against the [redacted]. To enhance [redacted] uptake of the cells we may [redacted]. Based on the outcome of these initial experiments we will vary [redacted] conditions [redacted]. The starting [redacted] conditions are based on experiences from the lab of M. Sampaolesi. *In vitro* analysis of muscle (fiber) function in a tissue bath can be done as described by for example Park et al (J. Vis Exp. 2012).

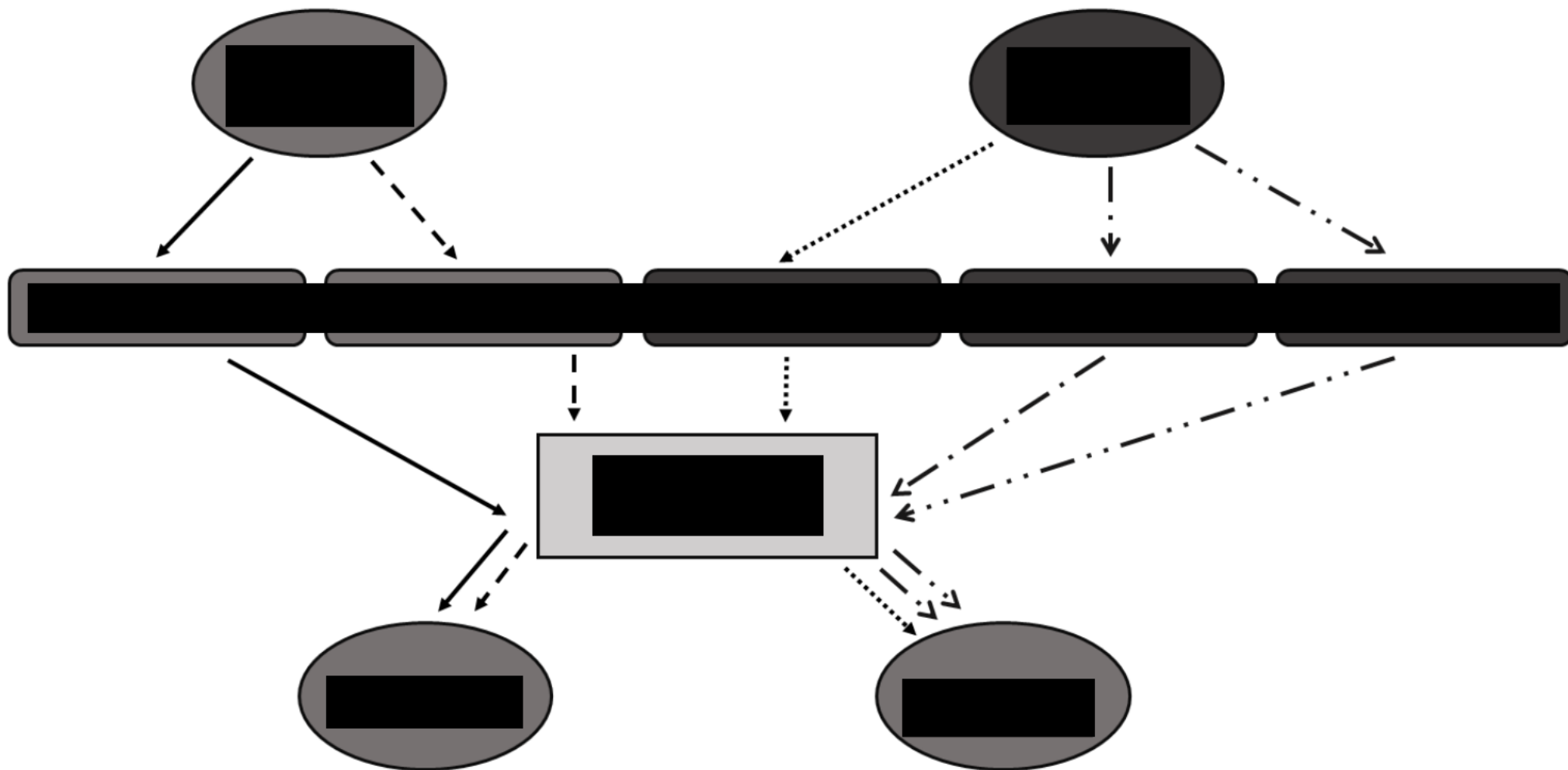
The final experiments in DM1 mouse models are focused on assessing the functional incorporation of the [redacted] in [redacted] tissue after [redacted]. We will compare [redacted] with placebo-treated animals. Functional measurements will be performed to [redacted]. These parameters can be assessed by a [redacted].

In conclusion, we want to show that:

1. We can [redacted].
2. [redacted].
3. [redacted].

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.

The general outline is presented in the figure below. From DM1 mice, [redacted] or [redacted] will be [redacted] which will be [redacted]. After removal of the [redacted] the functional potential of the [redacted] is established by administration of the [redacted] into [redacted] mice. Moreover, in parallel, [redacted] and [redacted]. Administration of these cells into immunocompromised ([redacted] mice enables us to study their therapeutic potential. An important benefit of [redacted] is the unlimited source. Many [redacted] can be generated from patient and control somatic cells.



Generation of [redacted] models

- General: weigh animals, 2x a week for [redacted] mice or [redacted] mice.
- Two DM1 mouse models are bred from the [redacted]-[redacted] line, the [redacted] and [redacted] models, which differ in the length of the [redacted] in the [redacted] mice show a relatively high [redacted] and will only be born from [redacted] crossings (bred with discomfort).

- [redacted] and [redacted] of DM1 and [redacted] mouse cells
- Sacrifice [redacted] day old DM1 and [redacted] mice
- Dissection [redacted]
- [redacted] of [redacted] or [redacted] from [redacted]
- [redacted] of [redacted] with [redacted]
- Amplification [redacted]

- Purchase [redacted] and differentiation towards [redacted] lineage
- Purchase and validate [redacted] from DM1 patients
- Set up [redacted] differentiation protocols towards [redacted] and [redacted]

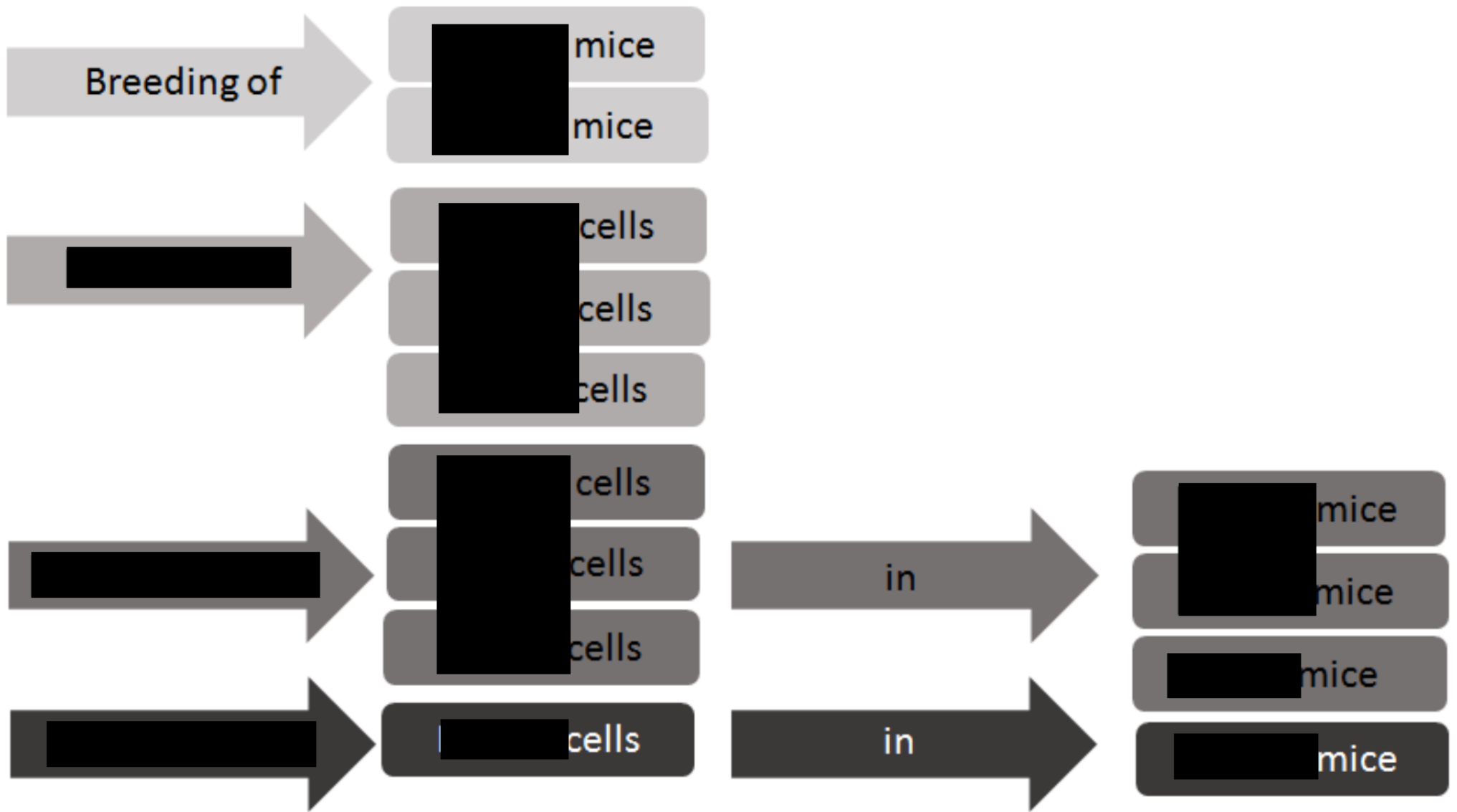
- [redacted] and [redacted] of human [redacted] and [redacted] (CMO application; approved)
- [redacted] is performed from upper leg of patients/controls
- [redacted] of [redacted] or [redacted] from dissected muscle
- [redacted] of [redacted] with [redacted]
- Amplification isolated progenitor cells

- [redacted] application cells ([redacted] vs. saline solution)
- [redacted] with [redacted] cells/vehicle in mice (DM1 mice for mice [redacted] for human [redacted])
- One leg is treated with a [redacted], the [redacted], while the other leg receives a saline solution. We will start with 1 [redacted] per leg per day per mouse up to max. 5 [redacted]. Max. 5 [redacted] days per week. Max. 20 [redacted] per mouse. The [redacted] of the other leg serves as a control. The exact final protocol of treatment will be based on the outcome of a small pilot study. All experiments will be conducted by art. 9/12 researchers who will minimize discomfort as much as possible. For example, to counteract suffering early enough, animals will be regularly observed and weighed. The animal model has been used extensively by [redacted]. Animal handling and the planned procedures have been [redacted].
- *In vitro* analysis of [redacted] function in a tissue bath can be done as described by for example Park et al (J. Vis Exp. 2012).
- Functional analysis ([redacted]).
- Molecular and histological analysis (staining muscular proteins, PCR etc.).

- [redacted] application of [redacted]
- Mice are exposed to exercise to [redacted]. A single round of eccentric exercise a few hours prior to [redacted] damaged and inflamed muscle tissue (among others; increase IL, integrins, NF-kB signaling). Increase in inflammation markers can be measured in a blood sample taken before and after exercise.

- Starting with 1 injection per mouse up to max 5 injections. The exact final protocol of treatment will be based on the outcome of a small pilot study. Mock-injected mice will serve as control.
- Investigate functional effects of [REDACTED] e.g. by [REDACTED].
- Transcardial perfusion under anesthesia and isolation organs or euthanasia and isolation of organs for histological and functional analyses.
- Investigate homing to [REDACTED] and other tissues by microscopy

* For all approaches/protocols the exact final treatment will be based on the outcome of ongoing pilot studies. Choosing the most effective approach with minimal discomfort.



The figure represents a flowchart of the [redacted] in different models. [redacted] and [redacted] mice are bred. [redacted] from these models or from [redacted] from the [redacted] and [redacted] mice or human [redacted] will take place into [redacted] [redacted] and [redacted]. [redacted] is only performed with [redacted] into [redacted]

The rescue experiments with the [REDACTED] in the DM1 mouse models are the first experiments we will start with. When we are able to [REDACTED] and [REDACTED], they are expected to still have a high [REDACTED] and contribute to [REDACTED] regeneration. However, we are aware that this is a limited [REDACTED]. Moreover, that these are mouse [REDACTED]. For completion of the project including human DM1 patient or control [REDACTED] (already available in our lab) and [REDACTED] from DM1 patients and control somatic cells is necessary. As mentioned in 3.4.1.; if the number of [REDACTED] that can be [REDACTED] is too low or the amount of cells needed for functional recovery is too high, we plan to use [REDACTED]. The benefit of these [REDACTED] is that [REDACTED] a.) represent an infinite source of cells, b.) can be differentiated towards [REDACTED], c.) these cells have a [REDACTED]. Moreover, because of the unlimited number these [REDACTED] are valuable for additional experiments e.g. validating [REDACTED], optimizing [REDACTED]. DM1 patient [REDACTED] or [REDACTED] [REDACTED] are then used to stimulate regeneration of [REDACTED]. Similar outcome measures are performed to determine therapeutic potential (molecular and histological analysis such as staining muscular proteins, PCR etc.).

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

Inclusion of [REDACTED] and [REDACTED] mice models:

[REDACTED] mice and [REDACTED] mice both display an increased [REDACTED] of respectively [REDACTED] mice display a longer [REDACTED] than [REDACTED] mice, and reproduce patient symptoms such as [REDACTED] weakness. The variability in [REDACTED] and variability in symptoms is also present in DM1 patients. To most optimally represent the DM1 patient population we want to include both [REDACTED] and [REDACTED] mice for [REDACTED] and [REDACTED] mice for [REDACTED]. This will provide valuable information as it will confirm that the therapeutic approach is applicable on a range of [REDACTED] and therefore a broad patient spectrum.

In addition, we expect differences between the [REDACTED] and [REDACTED] mice. Since the [REDACTED] mice represent a more [REDACTED] the presence of [REDACTED] and therefore the amount of [REDACTED]) might differ from the [REDACTED] mice. It has been communicated ([REDACTED] that dystrophic mice early in life present a higher percentage of [REDACTED]. Differences in functional recovery after [REDACTED] might also occur. We hypothesize that homing of [REDACTED] is better in [REDACTED] mice due to the signaling of the more [REDACTED] tissue, but that survival or contribution to [REDACTED] might be worse in this mice model due to the negative environment. These are all important aspects to consider in the context of the [REDACTED] observed in DM1. Including two DM1 mouse models therefore provides valuable information that cannot be collected with the inclusion of only one DM1 mouse model.

Coherence/ milestones:

Successful completion of each separate step/protocol as described in chapter "3.4.2 Outline" will provide the required information for the next research objective. When we are able to [REDACTED], we hypothesize that after [REDACTED], [REDACTED] are able to contribute to [REDACTED] in [REDACTED] muscles. These promising results will take us to the next step of [REDACTED]. We aim to stimulate [REDACTED] by excessive exercise and start the trial with [REDACTED] to ameliorate myopathy.

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	3.4.4.1 [redacted] from [redacted]
2	3.4.4.2 application of [redacted] or saline solution
3	3.4.4.3 application of [redacted]

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'.	10300				
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen				
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	<table border="1"> <thead> <tr> <th data-bbox="622 804 1341 825">Serial number</th> <th data-bbox="1352 804 2074 825">Type of animal procedure</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="622 833 636 853">1</td> <td data-bbox="1352 833 2007 853">3.4.4.1 [redacted] of [redacted] from [redacted]</td> </tr> </tbody> </table>	Serial number	Type of animal procedure	1	3.4.4.1 [redacted] of [redacted] from [redacted]
Serial number	Type of animal procedure					
1	3.4.4.1 [redacted] of [redacted] from [redacted]					

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 overall aim is to investigate whether [REDACTED] ([REDACTED] and [REDACTED] can contribute to [REDACTED] [REDACTED]. Therefore DM1 mice are bred to 1.) [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] and 2.) to administer [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] and monitor improvements in [REDACTED] histology and phenotype.

Mice [REDACTED] of age will be sacrificed. We will dissect [REDACTED]. This will be done on the DM1 mouse model, a myotonic dystrophy mouse model, and wild-type littermates. The department [REDACTED] has experience with breeding of [REDACTED] and [REDACTED] mice [REDACTED]. We need to optimize the process of [REDACTED] to obtain a.) the most efficient generation protocol (number of [REDACTED]), b.) highest percentage of [REDACTED] with complete 'clean' [REDACTED] by [REDACTED], c.) the maximum number of [REDACTED] by the maximum amount of amplification/passages. Optimization of these steps will give valuable and useable information about the feasibility to translate the research into clinical practice.

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

The DM1 mouse models with [REDACTED] are from the [REDACTED] line. To obtain [REDACTED] [REDACTED] DM1 mice are sacrificed. Optimization of the procedure is established with [REDACTED] and [REDACTED] littermates born from [REDACTED] breeding. We will use CO2 euthanasia to sacrifice the animals as suggested by the protocol of [REDACTED]. We can then easily perform [REDACTED] [REDACTED] dissection. [REDACTED] tissue is cleaned from fat and tendon. Cells of interest are [REDACTED] characterized and [REDACTED] is applied for [REDACTED] [REDACTED]. This technique has already been applied in our lab for [REDACTED] from this DM1 mice model. In short, the procedure is as follows: cells are [REDACTED] with [REDACTED] [REDACTED] and [REDACTED] by [REDACTED]. The [REDACTED] with a [REDACTED] allows us to study the [REDACTED].

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

With respect to the animal procedures; the [redacted] and [redacted] mice will be bred as previously described by our lab in [redacted]. Keeping the [redacted] line will only be done with [redacted] breeding, eliminating the birth of [redacted] mice with [redacted]. Only when experiments are planned breeding with [redacted] will start, resulting in [redacted] mice. Mice will be identified via genotyping as soon as possible. However, it is impossible to identify and euthanize [redacted] pups that will [redacted]. The size of the mice or nest size do not influence chance of survival. The [redacted] is shortly after birth, a time window where we cannot interrupt the nest as this can cause stress and might lead the mother to eat the pups, including the [redacted] that do have a [redacted]. The cause of [redacted] in the [redacted] mice is [redacted] and never seen in [redacted] or [redacted] pups. Children with [redacted] DM1 suffer from [redacted] during birth. Whether this [redacted] is involved in the breeding of [redacted] mice remains undefined. The symptoms reported from adult [redacted] mice resemble the classic [redacted] phenotype instead of [redacted].

We will start [redacted] procedures with small pilot experiments (n=3) based on published/communicated results from other [redacted] models to test the feasibility and further optimize the procedure before starting the preclinical study with statistical significance. By optimizing the process of [redacted] and amplification we aim to generate the maximum number of [redacted] usable as [redacted] (from one [redacted] dissection. Thereby we minimize the number of mice needed for follow up [redacted] experiments. These optimization experiments are performed on [redacted] mice and wild type littermates born from [redacted] breeding. With these approaches the number of mice is reduced.

B. The animals

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

It is established that the [redacted] mouse line is a good animal model for preclinical studies on [redacted] phenotype [redacted]. Moreover, the model is well known in the [redacted] research area [redacted] and already in house and used in [redacted] studies before at the department of [redacted]. The [redacted] mice show [redacted] and increased [redacted]. No muscle pain or discomfort has been reported in literature. From previous experience we know that [redacted] mice show normal cage behaviour in standard environment. Only when challenged differences appear between [redacted] mice and wild-type littermates. [redacted] mice reproduce slight [redacted] weakness and [redacted] from [redacted] of age, when in a challenging environment. With the use of the [redacted] model we can perform functional read-outs. [redacted] mice and [redacted] both display an increased, but different [redacted]. The variability in [redacted] in the [redacted] and [redacted] mice is also present in DM1 patients. To most optimally represent the DM1 patient population we want to include both [redacted] and [redacted] mice for [redacted] and [redacted] of [redacted]. This will provide valuable information as it will confirm that the therapeutic approach is applicable on a broad patient spectrum.

DM1 mice from [redacted] of age are used for dissection of [redacted] [redacted] [redacted] [redacted] showed that efficient [redacted] [redacted] [redacted] can be performed after the first week of birth ([redacted]). Before this age [redacted] of [redacted] [redacted] is possible. Older mice are expected to yield fewer [redacted] [redacted]. For [redacted] [redacted] protocols, mice will be kept to a maximum age of [redacted]. After this age, [redacted] of [redacted] [redacted] becomes difficult (personal communication with [redacted] [redacted]). [redacted] from [redacted] tissue are characterized and [redacted]. We prefer including DM1 models over using control/non-DM1 mice models since this approach represents the clinical situation. We aim to set up an [redacted] therapy using a patients [redacted] cells to stimulate [redacted].

We want to perform 25 [redacted] experiments on [redacted] mice. Research on different [redacted] mice models shows that [redacted] of [redacted] is most efficient by using [redacted] (pers. communication [redacted] lab). Unfortunately, [redacted] mice exhibit [redacted]. [redacted] Mouse weight monitoring showed that during the first month of life, [redacted] mice were [redacted] than their [redacted] littermates ([redacted]). We might be forced to start [redacted] experiments by pulling four [redacted] mice. For 25 [redacted] experiments on [redacted] mice, we would need 100 (25X4) [redacted] mice. 1000 [redacted] mice are used for breeding, 25% is [redacted] and ~ 40% survives, generating 100 [redacted] [redacted] mice. To be able to perform [redacted] experiments on [redacted] mice, 400 animals are bred, 25% is [redacted] (n = 100).

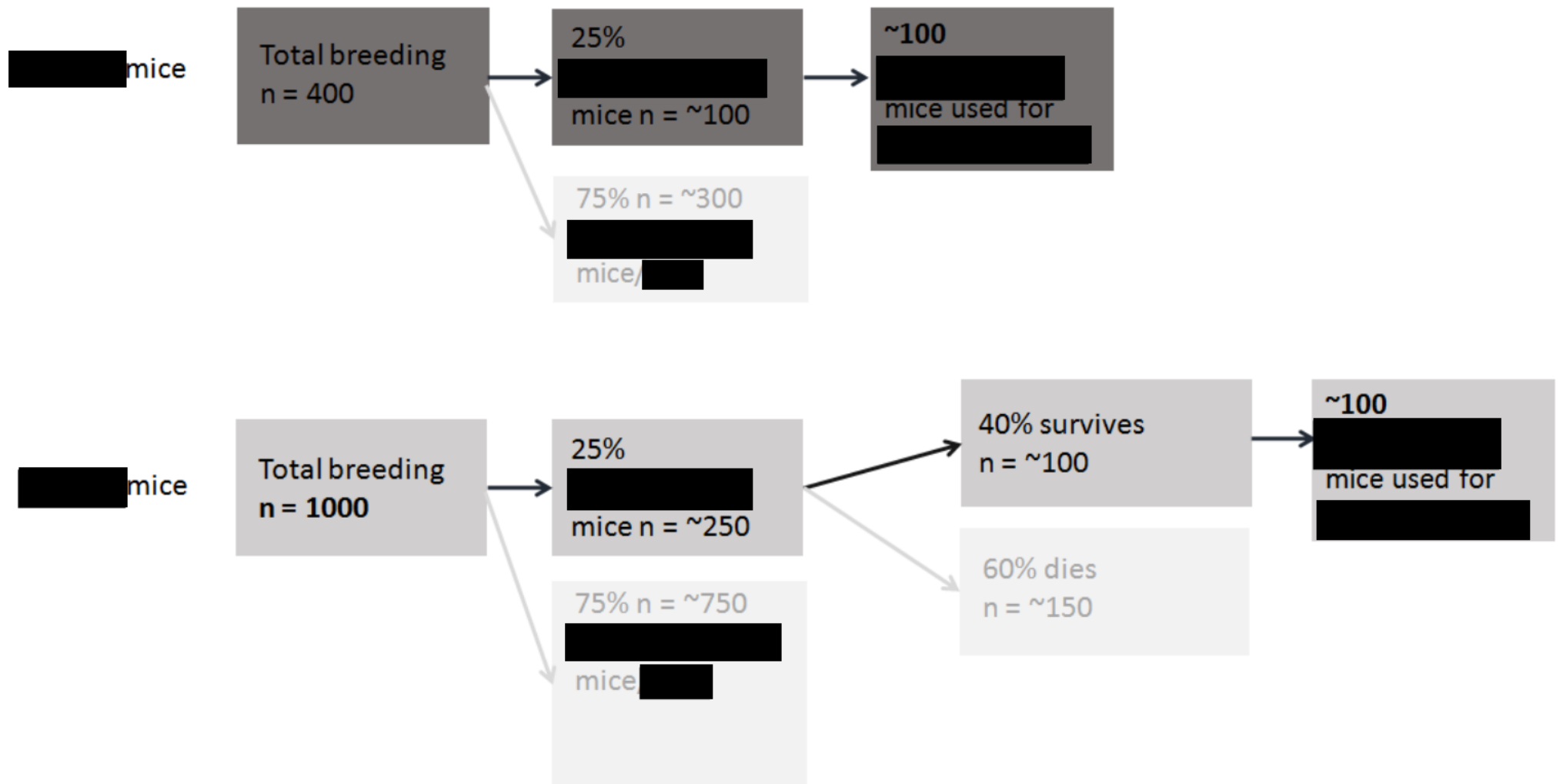


Figure 1: [redacted] and [redacted] mice included in [redacted] experiments.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
[redacted]	[redacted] line	100	From > [redacted]
[redacted]	[redacted] line	250	From > [redacted]

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.

Keeping the [redacted] line will only be done with [redacted] breeding, eliminating the birth of [redacted] mice with [redacted] [redacted]. Only when experiments are planned breeding with [redacted] will start, resulting in 25% [redacted] mice. Mice will be identified via genotyping as soon as possible. [redacted] and [redacted] littermates are used to set up the protocol and optimize the [redacted] procedure. No extra mice are bred for these purposes. The DM1 model is carefully considered. We build on expertise gathered from published data and experiments performed previously in our own research group and by collaborators. By optimizing the process of [redacted], [redacted] and amplification we aim to generate the maximum number of [redacted] usable as [redacted] from one [redacted]. Thereby we minimize the number of mice needed for [redacted] experiments.

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

All measures are taken to minimise suffering, pain, fear and other adverse effects. Disturbances in welfare are kept to a minimum. To detect unexpected discomfort in an early stage animals are watched closely and will be weighed regularly. Especially the [redacted] mice are monitored carefully on a daily basis during the [redacted]. It is important to monitor weight and food intake. If [redacted] mice

start to develop [REDACTED], however this is stressful for the animals. When mice will only be in experiments for another foreseeable/short time period, they are fed water soaked soft food. This to allow the mice to eat while preventing the stressful procedure of teeth clipping. Mice do not experience fear, pain or suffering related to the [REDACTED].

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 study has not been performed before. [REDACTED] of [REDACTED] and [REDACTED] from mouse [REDACTED] has been performed previously on [REDACTED] mice and on [REDACTED] tissue of [REDACTED] mice. However [REDACTED] of [REDACTED] has never been performed on DM1 mice models. We are the first group that started a pilot on two [REDACTED] mice showing that [REDACTED] is possible from this [REDACTED] tissue. Online databases show no articles on [REDACTED] from DM1 patients/ animal models. In addition, no groups in the [REDACTED] field are working on this. [REDACTED] the [REDACTED] cells by [REDACTED] and applying them as [REDACTED] against the [REDACTED] phenotype in DM1 is an innovative promising new research never attempted before.

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.

G. Location where the animals procedures are performed

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?

The DM1 mice have an [REDACTED] [REDACTED]. This genetic alteration leads to the [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] in [REDACTED] [REDACTED] mice. [REDACTED] [REDACTED] exhibit [REDACTED]. Mouse weight monitoring showed that during the first month of life, [REDACTED] [REDACTED] mice were much [REDACTED] than their [REDACTED] littermates (about 50%). After 2 months of age, [REDACTED] females and males caught up in [REDACTED] (70–80% for females, and 60–70% for males) ([REDACTED]). There is a [REDACTED] before weaning for [REDACTED] [REDACTED] mice. We estimated the [REDACTED]. Mice might start to develop long [REDACTED] [REDACTED]

It is very important to realize that only [redacted] mice can show [redacted] animals with the DM1 [redacted] are bred before. From previous experience we know that DM1 mice show normal cage behaviour in standard environment. Only when challenged differences appear between [redacted] mice and wild-type littermates. No [redacted] pain or discomfort has been reported in literature. The [redacted] mice can only display the DM1 related phenotype after the age of [redacted] and when in a challenging environment. However, most mice are sacrificed at [redacted] and all animals are sacrificed at [redacted]. We can exclude any [redacted] pain, discomfort or changes in cage behaviour to be present.

Explain why these effects may emerge.

Cause of the adverse effects is the [redacted].

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

If mice start to develop [redacted], however this is stressful for the animals. When mice will only be in experiments for another foreseeable/short time period, they will be fed water soaked soft food. This to allow the mice to eat while preventing the stressful procedure of teeth clipping. The [redacted] mice experience no discomfort. They show normal cage behavior, no growth retardation and [redacted] or other abnormalities.

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).

Breeding of [redacted] will result in [redacted], [redacted] and [redacted] (total 100%). The breeding of [redacted] mice is classified before as moderate in [redacted]. From the [redacted] mice born, [redacted] dies. [redacted] of the [redacted] mice that live, are expected to develop [redacted]. Clipping of [redacted] in [redacted] mice is classified as mild. The animals experience short-term mild distress. The cumulative discomfort for [redacted] mice is moderate. [redacted] mice do not show neonatal death, growth retardation, muscle pain or elephant teeth.

All mice (100%) included in this DAP are sacrificed for [redacted]. There are no treatments, mice are directly sacrificed. This is mild discomfort.

Summary cumulative discomfort:

- 100 [redacted] mice in experiment; mild discomfort (28,5% of the mice).
- 250 [redacted] :
 - 150 [redacted] mice neonatal death; moderate discomfort (43% of the mice).
 - 100 [redacted] mice in experiment; moderate discomfort (28,5% of the mice).
- Total 350 [redacted] mice (100% of all the mice).

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 are sacrificed since we need to [redacted] from dissected [redacted]

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'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 2	Type of animal procedure 3.4.4.2 [redacted] application of [redacted] or saline solution

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.

With this protocol we aim to identify both functional and histological effects of [REDACTED] [REDACTED] with [REDACTED] and [REDACTED] [REDACTED]. By implementing both [REDACTED] and [REDACTED] we are able to investigate the therapeutical value. Two different questions are answered by the approaches:

1. [REDACTED] [REDACTED] will enable us to [REDACTED] model. This will provide information about [REDACTED]
2. [REDACTED] [REDACTED] allows us to study the [REDACTED]. This will provide information about [REDACTED].

The [REDACTED] have an inhibited immune system. Consequently, these mice can receive cells [REDACTED] tissues without presenting a rejection response. This will provide information about feasibility of the [REDACTED]. The [REDACTED] will be bought. [REDACTED] of enough [REDACTED] from [REDACTED] biopsy material will be a challenge. With the [REDACTED] technique an unlimited number of [REDACTED] [REDACTED] can be generated from [REDACTED] cells of DM1 patients. [REDACTED] of [REDACTED] derived [REDACTED] into [REDACTED] can then show the potential of human [REDACTED].

For all approaches, we will determine the contribution of [REDACTED] to [REDACTED]. For immunohistochemistry, [REDACTED] will be collected and stained using antibodies against [REDACTED] proteins such as dystrophin, laminin and myosin heavy chain. In vitro analysis of [REDACTED] function in a tissue bath is done as described by Park et al (J. Vis Exp. 2012). Functional measurements will be performed to compare motor capacity (e.g. treadmill running) and muscle [REDACTED] in [REDACTED] and [REDACTED] in [REDACTED] muscle as previously done for [REDACTED] research.

In the end, we expect to reduce [REDACTED]-related [REDACTED] symptoms by [REDACTED] and witness: [REDACTED], [REDACTED] strength, reduced [REDACTED] and increased [REDACTED] [REDACTED].

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

We want to investigate the ability of [redacted] to contribute to functional [redacted]. To assess the *in vivo* [redacted] we will inject [redacted] in the [redacted] mice. Functional measurements to compare [redacted] will include an [redacted] on a [redacted]. The mice will be allowed to settle for 2 minutes with the treadmill belt stationary. After acclimatization with gentle walking for two minutes (speed of 4m/min) and a warm up (8m/min) the main exercise session starts (30 min at 12m/min). [redacted] measurements can be performed by placing the mice on a grid while gently pulling their tails in the opposite direction. The maximal strength exerted by the mouse before releasing should be recorded multiple times with a short recovery in between. The mean of the recorded measurements is the [redacted]. Mice will be tested before (baseline measurement) and several times after cell treatment. With a maximum of twice a week. A decrease in [redacted] strength can be measured around 10 months of age therefore animals are kept up to a maximum of 12 months after [redacted]. As a starting point we will analyze [redacted] after [redacted].

[redacted]. After the last functional test mice will be sacrificed and [redacted] will be collected for immunohistochemistry. The numbers of [redacted] that have successfully [redacted] are counted. In this manner, we can analyze the contribution of [redacted].

Based on the outcome of these initial experiments we will vary the [redacted]. We aim to start the [redacted] with 5×10^5 [redacted] with a maximum of 20 [redacted] (max 1×10^7 [redacted] total). One [redacted] will induce temporary mild stress and a short-term painful sensation of the [redacted].

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

We will gather experience from the group of [redacted] and the group of [redacted]. The first group is working in the DM1 field and experienced with [redacted] while the latter group set up the [redacted] protocol and is working with other [redacted] animal models. They can provide the first guidelines on [redacted], time points and doses. [redacted] treatment is given to one limb, with the other limb [redacted] serving as a control and receiving saline solution. This approach provides us with a valid control for treatment group and minimizes the number of animals needed.

Optimization in the form of pilot experiments (n=3) will still be necessary. After this, reliable statistics for precise group size can be performed. The first trials and following optimization will be done with de [redacted] mice. These mice are easier to breed and experience less discomfort. Therefore the number of [redacted] mice included in [redacted] is higher (n=50) than the number of [redacted] mice included in DAP3 (n=36). [redacted] mice (n=12) are included to study the behaviour of human cells *in vivo*. These mice are bought.

B. The animals

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

As mentioned before we aim to identify both functional and histological effects of [redacted] with control and [redacted]

██████████. By implementing both ██████████ cells we are able to investigate the total therapeutical value. Two different questions are answered by the approaches:

1. ██████████ will enable us to ██████████ model. This will provide information about ██████████.
2. ██████████ allows us to study the ██████████. This will provide information about ██████████.

The ██████████ have an inhibited immune response. Therefore we can ██████████ without a rejection response. This will provide information about feasibility of the ██████████ Whilst ██████████ has ample experience with breeding of DM1 mice, the 12 ██████████ mice will be bought.

It is important to consider that only ██████████ mice are able to express a ██████████ when in a challenging environment. These ██████████ DM1 mice are important models to investigate the functional effects of ██████████. In addition, the protocol deals with many variables such as ██████████ doses, ██████████ sites etc. For ██████████ the variables time points, ██████████ number and location need to be considered. For these three variables our experiences teaches us that we need 12 animals per group (n=36). We will start with a small pilot study (n=3) with ██████████ into ██████████ old mice. The optimization will be done with de ██████████ mice. These mice are easier to breed and experience less discomfort. Therefore the number of ██████████ mice included in ██████████ is higher (n=50) than the number of ██████████ mice included (n=36). We will pay attention to cell survival and contribution to ██████████ Depending on the outcome we will change ██████████ time, dosis and frequency.

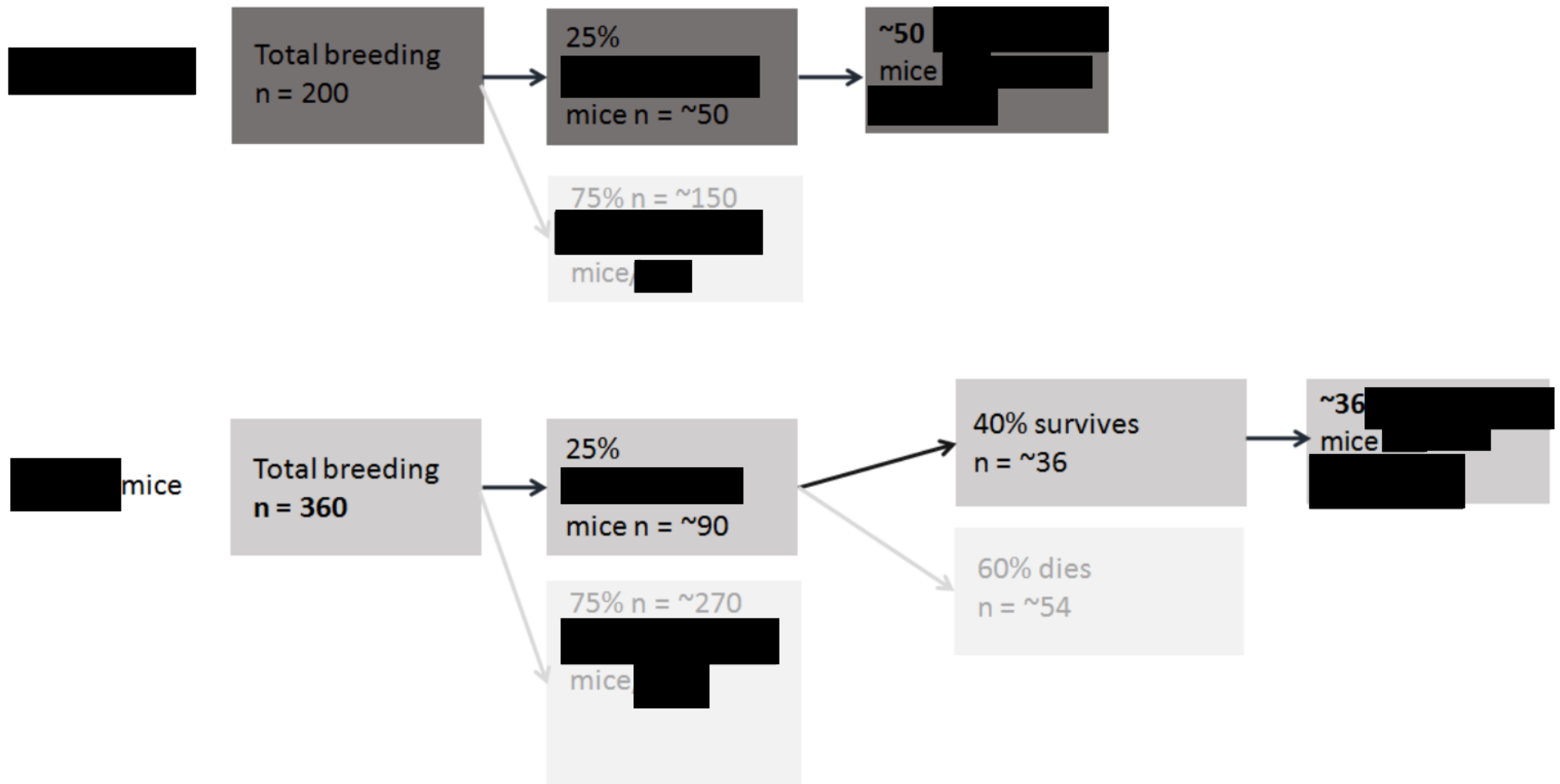


Figure 2: [redacted] into [redacted] and [redacted] mice.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
[redacted]	[redacted]	50	[redacted]
[redacted]	[redacted]	90	[redacted]
[redacted]	[redacted]	12	[redacted]

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.

██████████ mice of the ██████████ line are the only suitable mice to test the ██████████. The ██████████ mouse model is the only ██████████ model with a functional phenotype in a challenging environment. Testing the effect of ██████████ can only be done in ██████████ mice. To optimally design the protocol we aim to use as few animals as possible while still obtaining as statistically valid results. We build on expertise gathered from other groups (██████████), published data and experiments performed previously in our own research group. ██████████ treatment is given to one limb, with the other limb muscle serving as a control and receiving saline solution. This approach minimizes the number of mice needed.

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

We aim for the most optimal treatment as minimal invasive as possible. Meaning that we aim to reduce the numbers of ██████████ to an absolute minimum to reduce animal suffering.

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.

Administration of muscle [REDACTED] is a up-and-coming approach for the treatment of [REDACTED]. In models of [REDACTED] [REDACTED] of [REDACTED] is being explored ([REDACTED]). However, research only just started. Our approach against DM1 is even more promising as it is [REDACTED] and applicable to a broad patient spectrum. Online databases show no articles on [REDACTED] from DM1 patients/models. [REDACTED] the [REDACTED] [REDACTED] and applying them as [REDACTED] against the [REDACTED] phenotype in DM1 is innovative promising new research never attempted before.

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.

No anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods are used. Pain experienced is due to the [REDACTED] ([REDACTED]). Only short term mild pain and distress are induced. There is no use in giving pain relief as this will be an injection itself.

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?

[REDACTED] mice will display an [REDACTED] phenotype in a challenging environment. From previous experience we know that [REDACTED] mice show normal cage behaviour in standard environment. Only when challenged differences appear between [REDACTED] mice and wild-type littermates. No muscle pain or discomfort has been reported in literature. We expect a decrease in [REDACTED] from 4 months of age and decrease in [REDACTED] around 10 months of age. [REDACTED] exhibit [REDACTED]. Mouse weight monitoring showed that during the [REDACTED], [REDACTED] mice were smaller than their [REDACTED] littermates (about 50%). After 2 months of age, [REDACTED] females and males [REDACTED] in [REDACTED] (70–80% for females, and 60–70% for males) [REDACTED]. Mice might start to develop [REDACTED] [REDACTED] (in [REDACTED] and [REDACTED] with [REDACTED] are administered with a starting point of 5×10^5 [REDACTED] with a maximum of 20 [REDACTED] (max 1×10^7 [REDACTED] total). One [REDACTED] will induce temporary mild stress and a short-term painful sensation of the [REDACTED]

Explain why these effects may emerge.

Cause of the adverse effects are 1) the [REDACTED], 2) the [REDACTED].

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

We aim to reduce the numbers of [REDACTED] to an absolute minimum to reduce animal suffering. Possible infections or wounds as a consequence of [REDACTED] will be monitored closely. We do not expect to see any adverse events as a consequence of [REDACTED].

If mice start to develop [REDACTED], however this is stressful for the animals. When mice will only be in experiments for another foreseeable/short time period, they are fed water soaked soft food. This to allow the mice to eat while preventing the stressful procedure of [REDACTED].

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.

We will euthanize a mouse if any of the following signs of discomfort arise between [REDACTED] and programmed sacrifice and the symptoms do not diminish/disappear in a few days:

- Self-mutilation: excessive licking of the area, biting, scratching.
 - Isolation: stays in the corner of the cage, does not interact with cage mates.
 - Change in posture: hunching, huddling, stiff movement, head down.
-

Indicate the likely incidence.

We expect the incidence of humane endpoints to be zero or very low.

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).

Immunodeficient, [REDACTED] and [REDACTED] mice are included in this DAP. All mice (100%) included will experience short term mild pain as a consequence of [REDACTED]. We expect no complications as the [REDACTED] fluid is composed of sterile [REDACTED] cells. The functional measurements

performed on all mice (100%) included can be slightly stressful the first time around however, they will not cause pain and are therefore classified as mild discomfort. The [redacted] and [redacted] mice do not develop [redacted]. Breeding of [redacted] mice is classified as moderate and the [redacted] mice develop [redacted]. We expect this to occur in ~45% of [redacted] mice. The discomfort is mild.

Summary cumulative discomfort:

- 50 [redacted] + 12 [redacted] in experiment; 62 mice, mild discomfort (40% of the mice).

- 90 [redacted] :
54 [redacted] mice [redacted]; moderate discomfort (36 % of the mice).

36 [redacted] mice in experiment; moderate discomfort (24 % of the mice).

Total 152 mice (100% of all mice).

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 are sacrificed. We aim to investigate the therapeutic potential of [redacted]. To analyze the histological effects of the [redacted] we need to examine skeletal muscles.

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'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 3	Type of animal procedure 3.4.4.3 [redacted] application of [redacted]

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.

If we succeed to obtain positive results with [redacted] of [redacted], our next aim is to assess the functional incorporation of the [redacted] in [redacted] tissue after [redacted] application. This is a very important research step, since we intent to translate the therapeutic approach to the clinic. After [redacted].

[redacted] administration will be applied to the [redacted] mice. The [redacted] mice show progressive [redacted] from 4 months of age. This is due to [redacted] present at 3 months of age. Mild phenotypic [redacted] is also observed in 4 to 18 months old [redacted] mice ([redacted]). As suggested by [redacted] et al. we will set up a therapeutic pilot trial with [redacted] old [redacted] mice ([redacted]). The [redacted] old [redacted] remains constant between [redacted] of age, improvements not disease stabilization by a therapy could therefor be demonstrated. [redacted] are the only [redacted] that will be [redacted]. These are the only [redacted]; thereby allowing [redacted] delivery towards the [redacted]. These properties have also prompted investigations towards the use of [redacted] in the treatment [redacted]. Moreover, very recently a phase I/II clinical study started treatment with [redacted] transplantation of donor [redacted] in human proved to be feasible and safe ([redacted]).

To minimize the use of animals and obtain the most effective approach we will start with a small pilot study of 3 mice. We expect [redacted] to home to [redacted], not to other tissues. To enhance this principle mice are subjected to [redacted] of the [redacted]. This is classified as short term moderate impairment of general well being. Mice are anesthetized, shaved and disinfected. An incision in the inguinal region is performed, the [redacted], [redacted] are [redacted] into the [redacted]. The wound is then disinfected, closed with sutures and antibiotics and analgesics are administered. This approach has already succesfully been applied in a mouse model of [redacted].

[redacted] The technique is applied in the lab of Prof. Sampaolesi were I am currently learning the procedures needed to start this project.

[redacted] is preferred over [redacted] as the first is the only efficient way of [redacted]. [redacted] of [redacted] into the [redacted] showed that $30 \pm 7\%$ of the [redacted] were detected in the [redacted] of the [redacted]. Only $<3\%$ of [redacted] had occurred through the [redacted]. [redacted] delivered [redacted] towards all downstream [redacted], especially in areas where degeneration and regeneration was occurring ([redacted]).

We will analyze the effect of [redacted] treatment in [redacted] mice with functional measurements. There is mild impairment in general well being due to the training for functional motor measurements comparing [redacted], muscle force etc. These parameters can be assessed by a [redacted] test, time-to-exhaustion assay [redacted]) and measurement of [redacted] properties. Of course, histological incorporation of [redacted] is investigated. When [redacted] home to [redacted] and contribute to [redacted] we will plan a follow up study adjusting and further optimizing the [redacted] application (eg [redacted] time point, [redacted] dosis).

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

First, mice are trained for functional [redacted] measurements. [redacted] function in mice can be assessed by measuring locomotion, strength, balance/coordination, and endurance capacity. For example, mice [redacted] strength can be evaluated on a weekly basis by a [redacted] test. Mice are placed on a [redacted] and gently [redacted] in the opposite direction. The maximal strength exerted by the mouse before releasing their grip is recorded. The mean of around five measurements is taken as the index of [redacted] strength [redacted] et al., Neuromuscul Disord., 2010).

Secondly, the animals are exposed to [redacted]. A single [redacted] will be applied a [redacted] prior to [redacted] to [redacted], a [redacted] for [redacted]. We expect to measure a >2 fold increase in IL, integrins and NF-kB in a small blood sample taken from the tail vein. Efficient engraftment of bone marrow derived stem cells (BMDC's) has previously been accomplished by forced [redacted]. Mice remained at basal conditions or [redacted]

[redacted] This will be our starting point [redacted]). To gain experience in functional measurements we will seek collaboration with other research groups in the [redacted] field already using functional read-outs (e.g. [redacted]). Finally, [redacted] are [redacted] into the [redacted] mice. As suggested by [redacted] et al. we will use [redacted] old [redacted] mice ([redacted]). The [redacted] old [redacted] remains constant between [redacted], improvements not disease stabilization by a therapy could therefor be demonstrated. A control group receiving placebo (saline solution) is included. Functional measurements are performed until a few weeks after [redacted]. Mice are sacrificed and tissues analysed. We expect histological analysis to show homing of [redacted] into [redacted] tissue and involvement of [redacted].

The absence of adverse effects and contribution of [redacted] to [redacted] will allow the design of a larger optimized follow-up trial.

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

We will investigate the feasibility of the [redacted] approach before starting a follow up study to prove the effectiveness of the treatment. It is important to consider that only [redacted] mice ([redacted] of the pups born) exhibit a [redacted] phenotype, of which only [redacted] survives. Only these [redacted] mice are used to investigate the [redacted]. In addition, this protocol deals with many variables such as [redacted] time points, injection dosis, [redacted] sites etc. We will gather experience from the group of [redacted] and the group of [redacted]. The first group is working in the [redacted] field and experienced with the mouse model while the latter group set up the [redacted]

██████████ protocol and is working with other ██████████ animal models. Optimization in the form of small pilot experiments (n=3) will still be necessary. Most animals will be used to test ██████████ application. Only a few mice will undergo ██████████ application of the ██████████. The exact numbers depend on the outcome of ██████████ administration (protocol 3.4.4.2). We aim for two trials of n=7 (total n=14).

B. The animals

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

We will start with a feasibility study injecting three ██████████-old ██████████ mice with ██████████). When ██████████ home to ██████████ and ██████████ ██████████ 4 and 12 months of age, improvements not disease stabilization by a therapy could therefore be demonstrated. After proving the feasibility we can optimize the effectiveness of the treatment.

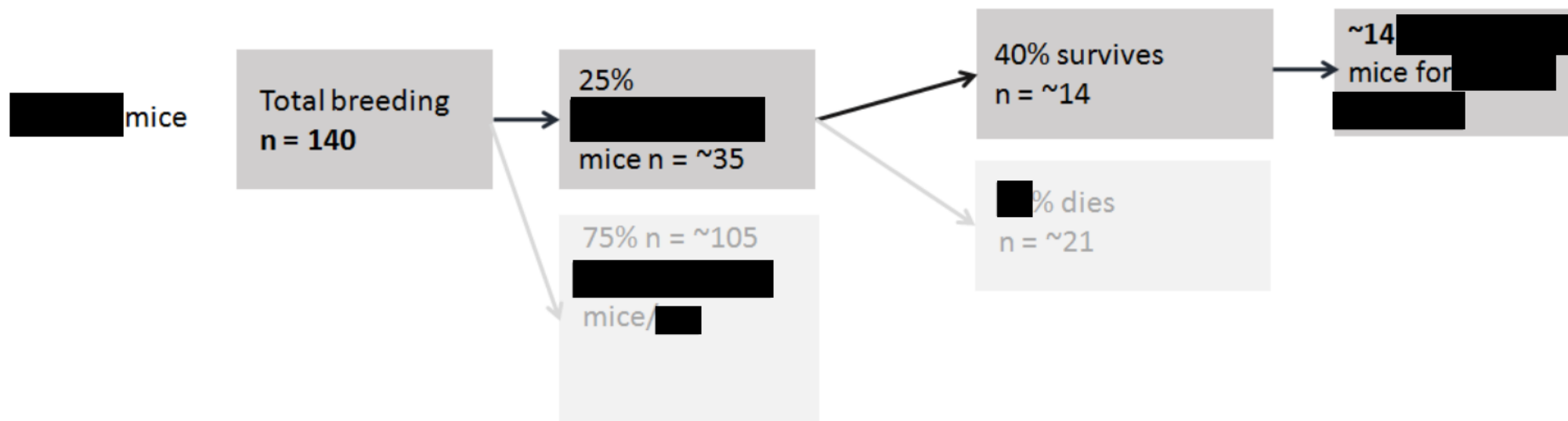


Figure 3: ██████████ into ██████████ mice.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
██████████	██████████ line	35	Mature adults ~ ██████████

C. Re-use

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.

To study the effectiveness of ██████████, the ██████████ mouse is a good fit; it shows ██████████ and ██████████ important disease characteristics seen in patients. To optimally design the protocol we aim to use as few animals as possible while still obtaining statistically valid results. By performing a small pilot study we are able to further refine and reduce animal experiments. We build on expertise gathered from collaborations, published data, statistics and experiments performed previously in our own research group.

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

Animals will be watched closely and will be weighed regularly consequently, discomfort can be established in an early stage. Moreover, humane endpoints are established to minimize suffering.

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.

E. Repetition

The proposed study has not been performed before. The [REDACTED] is a leading institute in the field of [REDACTED] research. Investigations to the role of [REDACTED] in [REDACTED] are promising and widely studied, however the potential of these cells has never been studied with regards to [REDACTED]. This is confirmed by a literature search.

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?

H. Pain and pain relief

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.

Mice are anesthetized with an intra-peritoneal injection. An incision in the inguinal region is performed and the [REDACTED] is [REDACTED] for [REDACTED]. The wound is then disinfected, closed with sutures and antibiotics and analgesics are administered. This approach has already successfully been applied in a mouse model of [REDACTED], the [REDACTED], and the [REDACTED]; [REDACTED], [REDACTED].

Moreover, on all [REDACTED] treated animals transcardial perfusion is applied to a.) investigate the contribution of cells to myogenesis and b.) explore [REDACTED] of [REDACTED] cells to other tissues. In this case, animals will be euthanized by the fixative under anesthesia.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

From previous experience and literature we know that DM1 mice show normal cage behaviour in standard environment. Only when challenged differences appear between [REDACTED] mice and wild-type littermates. [REDACTED] mice might start to develop [REDACTED]. [REDACTED] mice are exposed to [REDACTED]. To measure increase in inflammation, a small blood sample is taken from the tail vein before and after [REDACTED]. Moreover, locomotion is measured by investigating strength, balance/coordination, and endurance capacity which cause mild impairments in general well being.

Explain why these effects may emerge.

Cause of the adverse effects are 1) the [REDACTED], 2) the [REDACTED] and 3) the [REDACTED].

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

If mice start to develop [REDACTED], however this is stressful for the animals. When mice will only be in experiments for another foreseeable/short time period, they are fed water soaked soft food. This to allow the mice to eat while preventing the stressful procedure of [REDACTED]. Possible inflammation or infection as a consequence of the [REDACTED] is monitored carefully. When those unexpected circumstances arise, do not disappear after a few days and visibly affect the mouse, the animal will be sacrificed (see Human endpoints).

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.

We will euthanize a mouse if any of the following signs of discomfort continue to be present after [REDACTED]:

- Self-mutilation: excessive licking of the area, biting, scratching.
 - Isolation: stays in the corner of the cage, does not interact with cage mates.
 - Change in posture: hunching, huddling, stiff movement, head down.
-

Indicate the likely incidence.

We expect the incidence of humane endpoints to be zero or very low.

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).

Breeding of [REDACTED] mice is classified as moderate. Locomotion in all (100%) [REDACTED] [REDACTED] mice included is measured by investigating strength, balance/coordination, and endurance capacity which will cause mild impairments in general well being. In addition, the DM1 mice are exposed to [REDACTED] causing mild impairment. A blood sample is taken and cellular treatment is applied by systemic injections causing short-term moderate discomfort. [REDACTED] is expected to occur in 45% of [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] mice. These animals experience mild discomfort. Due to the breeding (moderate discomfort), multiple treatments causing mild discomfort and the [REDACTED] [REDACTED] causing moderate discomfort the cumulative discomfort level for all mice included is moderate.

Summary cumulative discomfort:

- [redacted]
14 [redacted] mice in experiment; moderate discomfort (40% of the mice).
21 [redacted] mice [redacted] moderate discomfort (60% of the mice).
Total 35 mice (100% of all the mice).

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 are sacrificed. We aim to examine the therapeutic potential of [redacted]. To analyze the histological effects of the [redacted] we need to dissect [redacted].

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'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 1	Type of animal procedure 3.4.4.1 [redacted] of [redacted] cells from [redacted] [redacted]

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 overall aim is to investigate whether [REDACTED] can contribute to [REDACTED]. Therefore DM1 mice are bred to 1.) [REDACTED] and 2.) to administer [REDACTED] and monitor improvements in [REDACTED] histology and phenotype.

Mice > [REDACTED] of age will be sacrificed. We will dissect [REDACTED] to [REDACTED] cells. This will be done on the DM1 mouse model, a [REDACTED] mouse model, and wild-type littermates. The department of [REDACTED] has experience with breeding of [REDACTED] and [REDACTED] mice [REDACTED]. We need to optimize the process of [REDACTED] and [REDACTED] to obtain a.) the most efficient generation protocol ([REDACTED] of [REDACTED]), b.) highest percentage of [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] with complete [REDACTED] by [REDACTED], c.) the maximum number of [REDACTED] by the maximum amount of amplification/passages. Optimization of these steps will give valuable and useable information about the feasibility to translate the research into clinical practice.

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

The DM1 mouse models with [REDACTED] are from the [REDACTED] line. To obtain [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] mice are sacrificed. Optimization of the procedure is established with [REDACTED] and [REDACTED] littermates born from [REDACTED] breeding. We will use CO2 euthanasia to sacrifice the animals as suggested by the protocol of [REDACTED]). We can then easily perform [REDACTED] tissue is cleaned from fat and tendon. Cells of interest are [REDACTED] characterized and [REDACTED] is applied for [REDACTED] [REDACTED]. This technique has already been applied in our lab for [REDACTED] from this DM1 mice model. In short, the procedure is as follows: cells are [REDACTED] with [REDACTED] [REDACTED] and [REDACTED] by a [REDACTED]. The [REDACTED] with a [REDACTED] allows us to study the [REDACTED].

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

With respect to the animal procedures; the [redacted] and [redacted] mice will be bred as previously described by our lab in [redacted]. Keeping the [redacted] line will only be done with [redacted] breeding, eliminating the birth of [redacted] mice with [redacted]. Only when experiments are planned breeding with [redacted] will start, resulting in 25% [redacted] mice. Mice will be identified via genotyping as soon as possible. However, it is impossible to identify and euthanize [redacted] pups that will die in the nest. The size of the mice or nest size do not influence chance of survival. The death is [redacted], a time window where we cannot interrupt the nest as this can cause stress and might lead the mother to eat the pups, including the [redacted] pups that do have a survival chance. The cause of [redacted] in the [redacted] [redacted] mice is unknown and never seen in [redacted] or wild-type pups. Children with [redacted] suffer from hypotony and breathing difficulties during birth. Whether this [redacted] is involved in the breeding of [redacted] mice remains undefined. The symptoms reported from adult [redacted] mice resemble the classic [redacted] phenotype instead of [redacted].

We will start [redacted] procedures with small pilot experiments (n=3) based on published/communicated results from other [redacted] models to test the feasibility and further optimize the procedure before starting the preclinical study with statistical significance. By optimizing the process of [redacted] and amplification we aim to generate the maximum number of [redacted] usable as [redacted] ([redacted]) from one [redacted] dissection. Thereby we minimize the number of mice needed for follow up [redacted] experiments. These optimization experiments are performed on 10% of surplus [redacted] mice and wild type littermates born from [redacted] breeding (n=30 for [redacted] and n=75 for [redacted] With these approaches the number of mice is reduced.

B. The animals

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

It is established that the [redacted] mouse line is a good animal model for preclinical studies on [redacted] phenotype ([redacted] [redacted]). Moreover, the model is well known in the [redacted] research area [redacted] [redacted] and already in house and used in [redacted] studies before at the department of [redacted]. The [redacted] mice show [redacted]. No muscle pain or discomfort has been reported in literature. From previous experience we know that DMSXL mice show normal cage behaviour in standard environment. Only when challenged differences appear between [redacted] mice and wild-type littermates. [redacted] mice reproduce slight [redacted] and slight [redacted] from 4 to 12 months of age, when in a challenging environment. With the use of the [redacted] model we can perform functional read-outs. [redacted] mice and [redacted] both display an increased, but different [redacted]. The variability in [redacted] in the [redacted] and [redacted] mice is also present in DM1 patients. To most optimally represent the DM1 patient population we want to include both [redacted] and [redacted] mice for [redacted] and [redacted] of [redacted]. This will provide valuable information as it will confirm that the therapeutic approach is applicable on a broad patient spectrum.

████ mice from █████ of age are used for dissection of █████ █████ showed that efficient █████ █████ can be performed after the first week of birth (████████████████████). Before this age █████ of █████ is possible. Older mice are expected to yield fewer █████ █████ For █████ protocols, mice will be kept to a maximum age of █████. After this age, █████ of █████ █████ becomes difficult (personal communication with █████ et al.).

Cells █████ from █████ are characterized and █████. We prefer including █████ models over using control/non-████ mice models since this approach represents the clinical situation. We aim to set up an █████ therapy using a patients █████ █████ to stimulate █████

We want to perform 25 █████ experiments on █████ mice. Research on different █████ models shows that █████ of these █████ is most efficient by using █████ (pers. communication █████ lab). Unfortunately, █████ mice exhibit █████ █████ Mouse weight monitoring showed that during the first month of life, █████ mice were ~50% smaller than their █████ littermates █████). We might be forced to start █████ experiments by pulling four █████ mice. For 25 █████ experiments on █████ mice, we would need 100 (25X4) █████ mice. 1000 █████ mice are used for breeding, 25% is █████ and ~ 40% survives, generating 100 █████ mice.

To be able to perform █████ experiments on █████ mice, 400 animals are bred, 25% is █████ (n = 100).

██████████

██████████ line
██████████ line

130
325

From > ██████████
From > ██████████

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:

- Our ultimate aim is to treat patients with ██████████. It is therefore important to use ██████████, since these ██████████ ██████████. To investigate the potential of this approach we need an animal model in which we can ██████████ ██████████ in a similar approach. The ██████████ mouse models are the only available models in the world to test the promising ██████████ technique. Therefore, replacement is not an option.

Reduction:

- Keeping the ██████████ line will only be done with ██████████ breeding, eliminating the birth of ██████████ mice with ██████████. Only when experiments including ██████████ animals are planned breeding with ██████████ will start, resulting in 25% ██████████ mice.
- Both males and females are included in our experiments.
- ██████████ and ██████████ littermates are surplus animals. These mice will be used to set up the protocol and optimize the ██████████ procedure. No extra mice will be bred for these purposes.

- The [REDACTED] model is carefully considered. We build on expertise gathered from published data and experiments performed previously in our own research group and by collaborators. By optimizing the process of [REDACTED] and amplification we aim to generate the maximum number of [REDACTED] usable as [REDACTED]) from one [REDACTED]. Thereby we minimize the number of mice needed for [REDACTED] experiments.

Refinement:

- Mice from [REDACTED] breeding will be identified via genotyping as soon as possible. Especially HOM mice will be closely monitored for abnormal teeth growth.

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

All measures are taken to minimize suffering, pain, fear and other adverse effects. Disturbances in welfare are kept to a minimum. To detect unexpected discomfort in an early stage animals are genotyped as soon as possible and especially [REDACTED] mice are watched closely and can be weighed regularly. Strict monitoring on a daily basis during the first few weeks after birth is important. During this time period, the number of pups in the nest might differ from day to day since [REDACTED] mice have a lower change of survival. It is impossible to detect which mice have reduced chances of survival. Therefore we cannot act on possible early death. After the first few weeks of birth, monitoring is important as [REDACTED] mice might [REDACTED]. [REDACTED] will have to be [REDACTED], even though this is stressful for the animals. When mice will only be in experiments for another foreseeable/short time period, they are fed water soaked soft food. This is to allow the mice to eat while preventing the stressful procedure of [REDACTED]. Mice do not experience fear, pain or suffering related to the [REDACTED] because they are dead.

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 study has not been performed before. [REDACTED] from mouse [REDACTED] has been performed previously on [REDACTED] mice and on [REDACTED]) mice. However [REDACTED] of [REDACTED] has never been performed on [REDACTED] mice models. We are the first group that started a pilot on [REDACTED] mice showing that [REDACTED] is possible from this [REDACTED] tissue. Online databases show no articles on [REDACTED] from [REDACTED] patients/ animal models. In addition, no groups in the neuromuscular field are working on this. [REDACTED] the [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] by [REDACTED] and applying them as [REDACTED] against the neuromuscular phenotype in [REDACTED] is an innovative promising new research never attempted before.

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?

The [redacted] mice have an [redacted] [redacted]. This genetic alteration leads to the [redacted] phenotype in [redacted] [redacted] mice. [redacted] [redacted] exhibit [redacted] [redacted] Mouse weight monitoring showed that during the first month of life, [redacted] [redacted] were much smaller than their [redacted] littermates (about 50%). After 2 months of age, [redacted] females and males caught up in weight (70–80% for females, and 60–70% for males) [redacted] There is a high frequency of death before weaning for [redacted] mice. We estimated the mortality about 60% before 1 month of age. Mice might start to develop [redacted] [redacted]

It is very important to realize that only [redacted] mice can show phenotypical characteristics. [redacted] animals with the [redacted] [redacted] are bred before. From previous experience we know that [redacted] mice show normal cage behaviour in standard environment. Only when challenged differences appear between [redacted] mice and wild-type littermates. No muscle pain or discomfort has been reported in literature. The [redacted] mice can only display the [redacted] related phenotype after the age of [redacted] and when in a challenging environment. However, most mice are sacrificed at [redacted] and all animals are sacrificed at [redacted]. We can exclude any muscle pain, discomfort or changes in cage behaviour to be present.

Explain why these effects may emerge.

Cause of the adverse effects is the [redacted] in both alleles consisting of the [redacted] in the [redacted] [redacted]

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

If mice start to develop [redacted], however this is stressful for the animals. When mice will only be in experiments for another foreseeable/short time period, they will be fed water soaked soft food. This to allow the mice to eat while preventing the stressful procedure of [redacted]. The [redacted] mice experience no discomfort. They show normal cage behavior, no growth retardation and no elephant teeth or other abnormalities.

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).

Breeding of [REDACTED] will result in 50% [REDACTED] mice, 25% wild-type mice and 25% [REDACTED] mice (total 100%). The breeding of [REDACTED] mice is classified before as moderate in [REDACTED]. From the 25% of [REDACTED] mice born, [REDACTED] dies. 45% of the 40% [REDACTED] mice that live, are expected to [REDACTED]). [REDACTED] mice is classified as mild. The animals experience short-term mild distress. The cumulative discomfort for [REDACTED] mice is moderate.

[REDACTED] mice do not show neonatal death, growth retardation, muscle pain or elephant teeth.

All mice (100%) included in this DAP are sacrificed for muscle tissue [REDACTED]. There are no treatments, mice are directly sacrificed. This is mild discomfort.

Summary cumulative discomfort:

- 30 [REDACTED] mice in experiment; mild discomfort (7% of the mice).
 - 100 [REDACTED] mice in experiment; mild discomfort (22% of the mice).
 - 75 [REDACTED] mice in experiment; moderate discomfort (16% of the mice).
 - 250 [REDACTED] :
 - 150 [REDACTED] mice neonatal death; moderate discomfort (33% of the mice).
 - 100 [REDACTED] mice in experiment; moderate discomfort (22% of the mice).
- Total 455 [REDACTED] mice (100% of all the mice).

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 are sacrificed since we need to [REDACTED] [REDACTED] from dissected [REDACTED] tissue.

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).

8

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300				
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen				
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	<table border="1"><thead><tr><th>Serial number</th><th>Type of animal procedure</th></tr></thead><tbody><tr><td>2</td><td>3.4.4.2 ■■■ application of ■■■ or saline solution</td></tr></tbody></table>	Serial number	Type of animal procedure	2	3.4.4.2 ■■■ application of ■■■ or saline solution
Serial number	Type of animal procedure					
2	3.4.4.2 ■■■ application of ■■■ or saline solution					

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.

With this protocol we aim to identify both functional and histological effects of [REDACTED] with control and [REDACTED]. By implementing both [REDACTED] we are able to investigate the therapeutical value. Two different questions are answered by the approaches:

1. [REDACTED] will enable us to [REDACTED] in a [REDACTED]. This will provide information about [REDACTED].

2. [REDACTED] allows us to study the [REDACTED]. This will provide information about [REDACTED].

The [REDACTED] mice have an inhibited immune system. Consequently, these mice can receive [REDACTED] from human tissues without presenting a rejection response. This will provide information about feasibility of the (human) [REDACTED]. The [REDACTED] will be bought. [REDACTED] of [REDACTED] cells from human biopsy material will be a challenge. With the [REDACTED] technique an unlimited number of [REDACTED] can be generated from somatic cells of [REDACTED] patients. [REDACTED] of [REDACTED] derived [REDACTED] into [REDACTED] can then show the potential of [REDACTED].

For all approaches, we will determine the contribution of [REDACTED]. For immunohistochemistry, [REDACTED] will be collected and stained using antibodies against [REDACTED] proteins such as dystrophin, laminin and myosin heavy chain. In vitro analysis of [REDACTED] function in a tissue bath is done as described by Park et al (J. Vis Exp. 2012). Functional measurements will be performed to compare motor capacity (e.g. [REDACTED]) and [REDACTED] in [REDACTED] and [REDACTED] as previously done for [REDACTED] research.

In the end, we expect to reduce [REDACTED]-related [REDACTED] symptoms by [REDACTED] and witness: [REDACTED], [REDACTED] and [REDACTED].

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

We want to investigate the ability of [redacted] to contribute to functional [redacted]. To assess the *in vivo* [redacted] capacity we will inject [redacted] populations in the [redacted] of mice. Functional measurements to compare [redacted] capacity will include an exercise regimen on a treadmill. The mice will be allowed to settle for 2 minutes with the treadmill belt stationary. After acclimatization with gentle walking for two minutes (speed of 4m/min) and a warm up (8m/min) the main exercise session starts (30 min at 12m/min). [redacted] measurements can be performed by placing the mice on [redacted] while gently pulling [redacted] in the opposite direction. The maximal [redacted] by the mouse before releasing should be recorded multiple times with a short recovery in between. The mean of the recorded measurements is the [redacted]. Mice will be tested before (baseline measurement) and several times after cell treatment. With a maximum of twice a week. A decrease in [redacted] can be measured around 10 months of age therefore animals are kept up to a maximum of 12 months after [redacted]. As a starting point we will analyze engraftment, regeneration and functional outcomes [redacted].

[redacted] After the last functional test mice will be sacrificed and [redacted] will be collected for immunohistochemistry. The numbers of [redacted] and control cells that have successfully [redacted] and survived are counted. In this manner, we can analyze the contribution of different cell populations to [redacted].

Based on the outcome of these initial experiments we will vary the transplantation conditions ([redacted]). We aim to start the [redacted] with 5×10^5 [redacted] with a maximum of 20 [redacted] (max 1×10^7 [redacted] total). One injection will induce temporary mild stress and a short-term painful sensation of the [redacted].

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

We will gather experience from the group of [redacted] and the group of [redacted]. The first group is working in the [redacted] field and experienced with the mouse model while the [redacted] group set up the [redacted] protocol and is working with other [redacted] animal models. They can provide the first guidelines on [redacted] time points and doses. [redacted] treatment is given to one limb, with the other limb muscle serving as a control and receiving saline solution. This approach provides us with a valid control for treatment group and minimizes the number of animals needed.

Optimization in the form of pilot experiments (n=3) will still be necessary. After this, reliable statistics for precise group size can be performed. The first trials and following optimization will be done with de [redacted] mice. These mice are easier to breed and experience less discomfort. Therefore the number of [redacted] mice included in DAP3 is higher (n=50) than the number of [redacted] mice included in DAP3 (n=36). [redacted] mice (n=12) are included to study the behaviour of human cells *in vivo*. These mice are bought.

B. The animals

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

As mentioned before we aim to identify both functional and histological effects of [redacted] with control and [redacted]

██████████. By implementing both ██████████ and ██████████ cells we are able to investigate the total therapeutical value. Two different questions are answered by the approaches:

1. ██████████ will enable us to ██████████

██████████ This will provide information about ██████████.

2. ██████████ allows us to study the ██████████.

This will provide information about the possibility to ██████████

The immunodeficient ██████████ have an inhibited immune response. Therefore we can inject ██████████ without a rejection response. This will provide information about feasibility of the ██████████ Whilst ██████████ has ample experience with breeding of ██████████ mice, the 12 ██████████ mice will be bought.

It is important to consider that only ██████████ ██████████ mice are able to express a ██████████ phenotype when in a challenging environment. These ██████████ ██████████ mice are important models to investigate the functional effects of ██████████. In addition, the protocol deals with many variables such as ██████████. For ██████████ the variables time points, ██████████ number and location need to be considered. For these three variables our experiences teaches us that we need 12 animals per group (n=36). We will start with a small pilot study (n=3) with ██████████ into ██████████ old mice. The optimization will be done with de ██████████ mice. These mice are easier to breed and experience less discomfort. Therefore the number of ██████████ mice included in DAP3 is higher (n=50) than the number of ██████████ mice included (n=36). We will pay attention to cell survival and contribution to myogenesis. Depending on the outcome we will change ██████████ time, dosis and frequency.

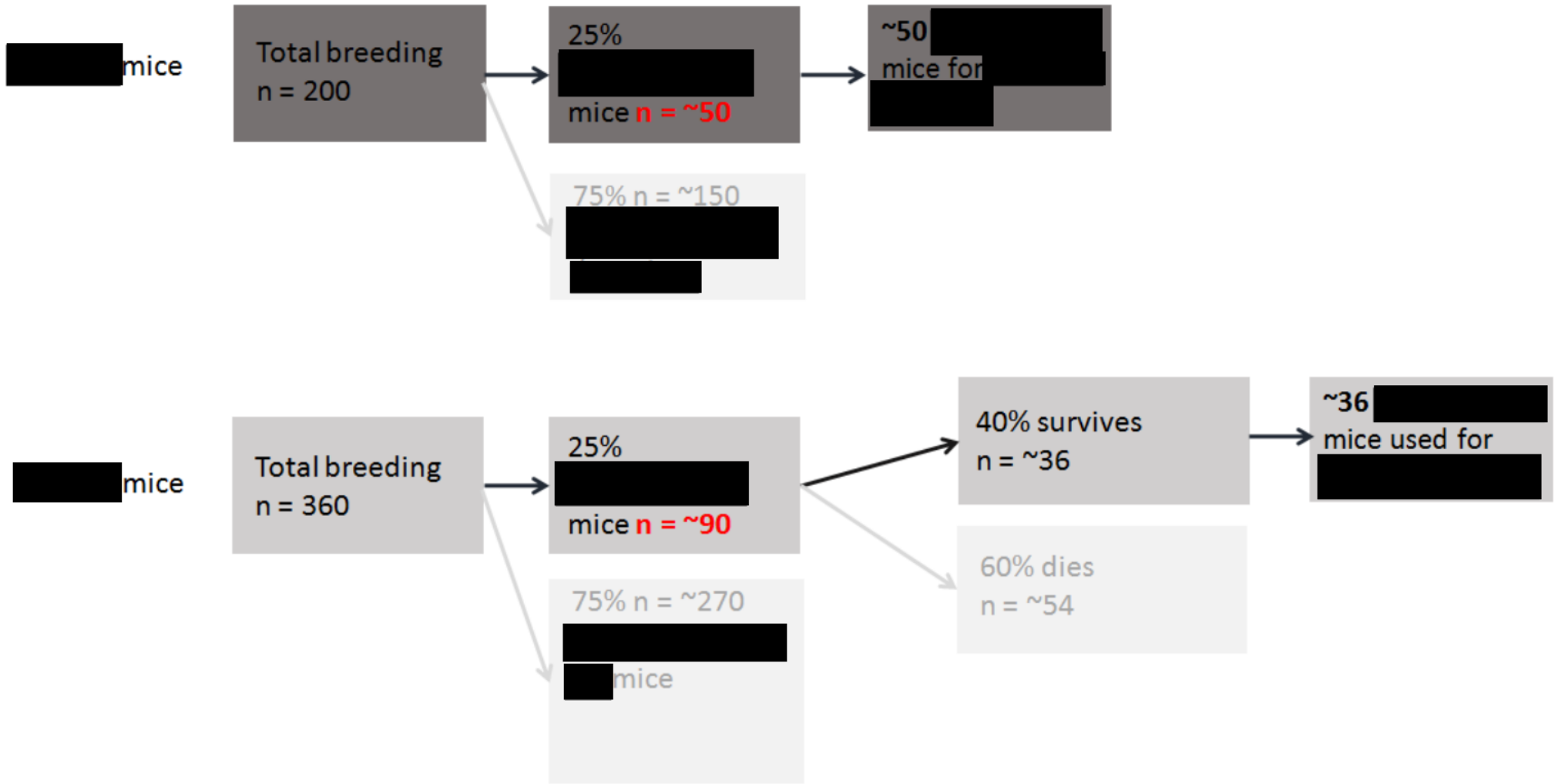


Figure 2: ██████ into ██████ and ██████ mice.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
█████	█████	50	█████
█████	█████	90	█████
█████	█████	12	█████

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:

- We aim to treat patients with [REDACTED] and [REDACTED]. It is therefore important to use [REDACTED], since these [REDACTED] will not evoke an immune response. To investigate the effectiveness and potential of this approach we need an animal model in which we can a) [REDACTED] in a similar approach, b) [REDACTED] and c) [REDACTED] into the [REDACTED] and investigate whether they can contribute to [REDACTED] *in vivo*. We will perform immunohistochemistry and functional measurements such as *in vitro* analysis of [REDACTED] function in a tissue bath. For these experiment we need the only mouse models of DM in which we can look at the contribution of [REDACTED]. Consequently, replacement is not an option.
- Testing whether human [REDACTED] can contribute to [REDACTED] can only be done in [REDACTED] mice. The [REDACTED] mice have an inhibited immune system. Consequently, these mice can receive [REDACTED] from human tissues without presenting a rejection response. This will provide information about feasibility of the (human) [REDACTED]. Replacement is not an option.

Reduction:

- To optimally design the protocol we aim to use as few animals as possible while still obtaining statistically valid results. We build on expertise gathered from other groups ([REDACTED]), published data and experiments performed previously in our own research group. However, optimization in the form of pilot experiments (n=3) is necessary. After the pilot experiment, reliable calculations (in collaboration with a biostatistician) for precise group size can be performed.
- [REDACTED] treatment is given to one limb, the other limb will serve as a control and will receive saline solution. This approach minimizes the number of mice needed.

Refinement:

- The first trial and following optimization will be done with the [REDACTED] mice. These mice are easier to breed and experience less discomfort.

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

We aim for the most optimal treatment as minimal invasive as possible. Meaning that we aim to reduce the numbers of [REDACTED] to an absolute minimum to reduce animal suffering, while still holding an effective [REDACTED]. Outcomes from the pilot experiment will help determining the most optimal but minimal invasive [REDACTED] protocol.

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.

Administration of [REDACTED] is a up-and-coming approach for the treatment of muscular dystrophies. In models of [REDACTED] [REDACTED] of [REDACTED] However, research only just started. Our approach against [REDACTED] is even more promising as it is [REDACTED] and applicable to a broad patient spectrum. Online databases show no articles on [REDACTED] from [REDACTED] patients/models. [REDACTED] and applying them as [REDACTED] against the neuromuscular phenotype in [REDACTED] is innovative promising new research never attempted before.

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.

No anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods are used. Pain experienced is due to the [REDACTED]). Only short term mild pain and distress are induced. There is no use in giving pain relief as this will be an injection itself.

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?

██████ mice will display an █████ phenotype in a challenging environment. From previous experience we know that █████ mice show normal cage behaviour in standard environment. Only when challenged differences appear between █████ mice and wild-type littermates. No muscle pain or discomfort has been reported in literature. We expect a decrease in █████ from 4 months of age and decrease in █████ around 10 months of age. █████ exhibit growth retardation. Mouse weight monitoring showed that during the first month of life, █████ mice were smaller than their █████ littermates (about 50%). After 2 months of age, █████ females and males caught up in weight (70–80% for females, and 60–70% for males) █████). Mice might start to develop █████ (in █████ and █████ with █████ are administered with a starting point of 5×10^5 █████ with a maximum of 20 █████ (max 1×10^7 █████ total). One █████ will induce temporary mild stress and a short-term painful sensation of the █████

Explain why these effects may emerge.

Cause of the adverse effects are 1) the █████, 2) the █████.

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

We aim to reduce the numbers of █████ to an absolute minimum to reduce animal suffering. Possible infections or wounds as a consequence of █████ will be monitored closely. We do not expect to see any adverse events as a consequence of █████ If mice start to develop █████), the teeth have to be clipped regular, however this is stressful for the animals. When mice will only be in experiments for another foreseeable/short time period, they are fed water soaked soft food. This to allow the mice to eat while preventing the stressful procedure of █████.

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.

We will euthanize a mouse if any of the following signs of discomfort arise between █████ and programmed sacrifice and the symptoms do not diminish/disappear in a few days:

- Self-mutilation: excessive licking of the area, biting, scratching.
 - Isolation: stays in the corner of the cage, does not interact with cage mates.
 - Change in posture: hunching, huddling, stiff movement, head down.
-

Indicate the likely incidence.

We expect the incidence of humane endpoints to be zero or very low.

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).

██████████ mice are included in this DAP. All mice (100%) included will experience short term mild pain as a consequence of ██████████. We expect no complications as the ██████████ fluid is composed of sterile ██████████. The functional measurements performed on all mice (100%) included can be slightly stressful the first time around however, they will not cause pain and are therefore classified as mild discomfort. The ██████████ mice do not develop elephant teeth. Breeding of ██████████ mice is classified as moderate and the ██████████ mice develop ██████████. We expect this to occur in ~██████████ of ██████████ mice. The discomfort is mild.

Summary cumulative discomfort:

- 50 ██████████ + 12 ██████████ mice in experiment; 62 mice, mild discomfort (40% of the mice).

- 90 ██████████ :
54 ██████████ mice ██████████; moderate discomfort (36 % of the mice).

36 ██████████ mice in experiment; moderate discomfort (24 % of the mice).

Total 152 mice (100% of all mice).

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 are sacrificed. We aim to investigate the therapeutic potential of ██████████. To analyze the histological effects of the ██████████ we need to examine ██████████.

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'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 3	Type of animal procedure 3.4.4.3 [redacted] application of [redacted]

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.

If we succeed to obtain positive results with [redacted] of [redacted] [redacted] our next aim is to assess the functional incorporation of the [redacted] in [redacted] tissue after [redacted] application. This is a very important research step, since we intent to translate the therapeutic approach to the clinic. After [redacted] will only reach a [redacted]. [redacted]

[redacted] administration will be applied to the [redacted] [redacted] mice. The [redacted] [redacted] mice show progressive [redacted] weakness from 4 months of age. This is due to [redacted] present at 3 months of age. Mild phenotypic [redacted] is also observed in 4 to 18 months old [redacted] mice ([redacted]). As suggested by [redacted] et al. we will set up a therapeutic pilot trial with [redacted] old [redacted] mice ([redacted]). The [redacted] phenotype remains constant between 4 and 12 months of age, improvements not disease stabilization by a therapy could therefore be demonstrated. [redacted] are the only [redacted] that will be [redacted]. These are the only cells have the capability to [redacted]; thereby allowing [redacted] delivery towards the [redacted]. These properties have also prompted investigations towards the use of [redacted] in the treatment [redacted]. Moreover, very recently a phase I/II clinical study started treatment with delivery of [redacted] boys. [redacted] in human proved to be feasible and safe [redacted].

To minimize the use of animals and obtain the most effective approach we will start with a small pilot study of 3 mice. We expect [redacted] to home to [redacted], not to other tissues. To enhance this principle mice are subjected to [redacted] of the [redacted]. This is classified as short term moderate impairment of general well being. Mice are anesthetized, shaved and disinfected. An incision in the inguinal region is performed, the [redacted] is [redacted] diluted in PBS are [redacted] into the [redacted] [redacted]. The wound is then disinfected, closed with sutures and antibiotics and analgesics are administered. This approach has already successfully been applied in a mouse model of [redacted]. [redacted] The technique is applied in the lab of [redacted] were I am currently learning the procedures needed to start this project.

[redacted] is preferred over [redacted] as the first is the [redacted]. [redacted] of [redacted] into the [redacted] showed that $30 \pm 7\%$ of the [redacted]. Only $<3\%$ of [redacted] had occurred through [redacted]. [redacted] delivered [redacted] towards all downstream [redacted], especially in areas where degeneration and regeneration was occurring ([redacted]).

We will analyze the effect of [redacted] treatment in [redacted] mice with functional measurements. There is mild impairment in general well being due to the training for functional [redacted] measurements comparing motor capacity, muscle force etc. These parameters can be assessed by a [redacted] test, time-to-exhaustion assay ([redacted]) and measurement of [redacted] properties. Of course, histological incorporation of [redacted] is investigated. When [redacted] home to [redacted] and contribute to [redacted] we will plan a follow up study adjusting and further optimizing the [redacted] application (eg [redacted] time point, [redacted] dosis).

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

First, mice are trained for functional [redacted] capacity measurements. [redacted] function in mice can be assessed by measuring [redacted] strength, balance/coordination, and [redacted] capacity. For example, mice hindlimb [redacted] can be evaluated on a weekly basis by a grip strength test. Mice are placed on a [redacted] and [redacted] in the opposite direction. The [redacted] exerted by the mouse before releasing their grip is recorded. The mean of around five measurements is taken as the index of hindlimb [redacted] (Vignaud et al., Neuromuscul Disord., 2010).

Secondly, the animals are exposed to [redacted]. We expect to measure a >2 fold increase in IL, integrins and NF-kB in a small blood sample taken from the tail vein. Efficient engraftment of bone marrow derived stem cells (BMDC's) has previously been accomplished by forced [redacted] period. This will be our starting point ([redacted]). To gain experience in functional measurements we will seek collaboration with other research groups in the [redacted] field already using functional read-outs (e.g. [redacted]). Finally, [redacted] cells are [redacted] into the [redacted] mice. As suggested by [redacted] et al. we will use [redacted] old [redacted] mice ([redacted]). The [redacted] phenotype remains constant between [redacted] of age, improvements not disease stabilization by a therapy could therefor be demonstrated. A control group receiving placebo (saline solution) is included. Functional measurements are performed until a few weeks after [redacted]. Mice are sacrificed and tissues analysed. We expect histological analysis to show homing of [redacted] cells into [redacted] tissue and involvement of [redacted] in [redacted].

The absence of adverse effects and contribution of [redacted] to [redacted] will allow the design of a larger optimized follow-up trial.

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

We will investigate the feasibility of the [redacted] approach before starting a follow up study to prove the effectiveness of the treatment. It is important to consider that only [redacted] mice ([redacted] of the pups born) exhibit a [redacted] phenotype, of which only [redacted] survives. Only these [redacted] mice are used to investigate the [redacted]. In addition, this protocol deals with many variables such as [redacted] time points, [redacted] dosis, injection sites etc. We will gather experience from the group of [redacted] and the group of [redacted]. The first group is working in the [redacted] field and experienced with the mouse model while the latter group set up the [redacted].

██████████ protocol and is working with other ██████████ animal models. Optimization in the form of small pilot experiments (n=3) will still be necessary. Most animals will be used to test ██████████ application. Only a few mice will undergo ██████████ application of the ██████████. The exact numbers depend on the outcome of ██████████ administration (protocol 3.4.4.2). We aim for two trials of n=7 (total n=14).

B. The animals

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

We will start with a feasibility study injecting three ██████████-old ██████████ mice with ██████████). When ██████████ home to ██████████ ██████████ and cells seem to contribute to ██████████ a follow up study will start. Since the ██████████ phenotype remains constant between 4 and 12 months of age, improvements not disease stabilization by a therapy could therefore be demonstrated. After proving the feasibility we can optimize the effectiveness of the treatment.

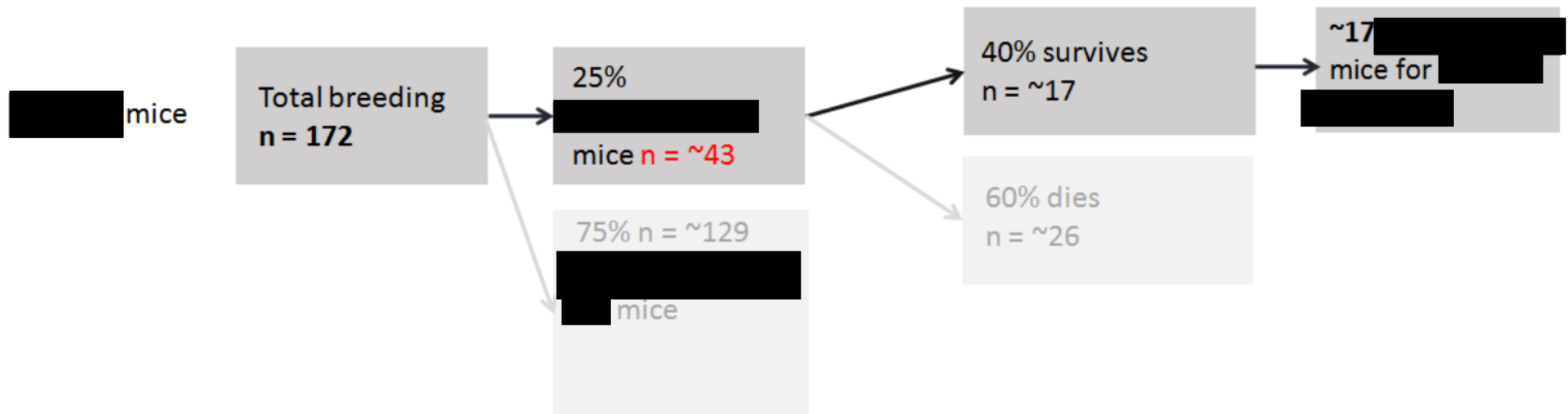


Figure 3: ██████████ into ██████████ mice.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
██████████	██████████ line	43	██████████

C. Re-use

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:

- The [redacted] mouse model shows [redacted] degeneration and [redacted] important disease characteristics seen in patients with [redacted]. It is the only [redacted] model with a functional phenotype when in a challenging environment. To study the effectiveness of [redacted], the [redacted] mouse is the only available model.

Reduction:

- Results from [redacted] will be evaluated and a small pilot study will be performed to further reduce the number of mice included in [redacted].

Refinement:

- For [redacted] mice are anesthetized. In addition, antibiotics and analgesics are administered.
- Collaborations are established with groups experienced in functional measurements and [redacted] administration of [redacted] ([redacted]). Techniques and expertise are exchanged to further refine experiments.

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

For [redacted], mice are anesthetized and analgesics are administered. Moreover, animals will be closely monitored so that discomfort can be established in an early stage. It is of particular importance to monitor the animals for possible inflammation or infection as a consequence of

the [REDACTED]. When those unexpected circumstances arise, are visibly affecting the mouse and they do not disappear after a few days, the mouse will be sacrificed. We have established humane endpoints to minimize suffering.

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 study has not been performed before. The Radboudumc is a leading institute in the field of [REDACTED] research. Investigations to the role of [REDACTED] in [REDACTED] [REDACTED] are promising and widely studied, however the potential of these cells has never been studied with regards to [REDACTED]. This is confirmed by a literature search.

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.

Mice are anesthetized with an intra-peritoneal injection. An incision in the inguinal region is performed and the [REDACTED] is [REDACTED] for [REDACTED]. The wound is then disinfected, closed with sutures and antibiotics and analgesics are administered. This approach has already successfully been applied in a mouse model of [REDACTED].

Moreover, on all [REDACTED] treated animals transcatheter perfusion is applied to a.) investigate the contribution of cells to myogenesis and b.) explore [REDACTED] to other tissues. In this case, animals will be euthanized by the fixative under anesthesia.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

From previous experience and literature we know that [REDACTED] mice show normal cage behaviour in standard environment. Only when challenged differences appear between [REDACTED] mice and wild-type littermates. The [REDACTED] mice might start to develop [REDACTED]. [REDACTED] mice are exposed to [REDACTED]. To measure increase in inflammation, a small blood sample is taken from the tail vein before and after [REDACTED]. Moreover, locomotion is measured by investigating strength, balance/coordination, and endurance capacity which cause mild impairments in general well being.

Explain why these effects may emerge.

Cause of the adverse effects are 1) the [REDACTED], 2) the [REDACTED] and 3) the [REDACTED].

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

If mice start to develop [REDACTED], however this is stressful for the animals. When mice will only be in experiments for another foreseeable/short time period, they are fed water soaked soft food. This to allow the mice to eat while preventing the stressful procedure of [REDACTED]. Possible inflammation or infection as a consequence of the [REDACTED] is monitored carefully. When those unexpected circumstances arise, do not disappear after a few days and visibly affect the mouse, the animal will be sacrificed (see Human endpoints).

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.

We will euthanize a mouse if any of the following signs of discomfort continue to be present after [REDACTED]:

- Self-mutilation: excessive licking of the area, biting, scratching.
 - Isolation: stays in the corner of the cage, does not interact with cage mates.
 - Change in posture: hunching, huddling, stiff movement, head down.
-

Indicate the likely incidence.

We expect the incidence of humane endpoints to be zero or very low.

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).

Breeding of [REDACTED] mice is classified as moderate. Locomotion in all (100%) [REDACTED] [REDACTED] mice included is measured by investigating strength, balance/coordination, and endurance capacity which will cause mild impairments in general well being. In addition, the [REDACTED] mice are exposed to [REDACTED] causing mild impairment. A blood sample is taken and [REDACTED] is applied by [REDACTED] causing short-term moderate discomfort. [REDACTED] [REDACTED] mice. These animals experience mild discomfort. Due to the breeding (moderate discomfort), multiple treatments causing mild discomfort and the [REDACTED] causing moderate discomfort the cumulative discomfort level for all mice included is moderate.

Summary cumulative discomfort:

- DMSXL HOM:

[REDACTED] mice in experiment; moderate discomfort (40% of the mice).
[REDACTED] mice [REDACTED]; moderate discomfort (60% of the mice).

Total 43 mice (100% of all the mice).

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 are sacrificed. We aim to examine the therapeutic potential of [REDACTED] [REDACTED]. To analyze the histological effects of the [REDACTED] [REDACTED] we need to dissect [REDACTED].

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

DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: 2016-0049
2. Titel van het project: Development of a [REDACTED] [REDACTED] against the [REDACTED] [REDACTED] of Myotonic Dystrophy type 1
3. Titel van de NTS: Ontwikkeling van een celtherapie voor Myotone Dystrofie type 1
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
 - wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: RUDEC
 - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED] bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9:00 tot 15:00 uur
 - e-mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: 22-08-2016
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken: 06-09-2016 en 08-11-2016
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van 13-09-2016 tot 17-10-2016 en van 14-11-2016 tot 08-12-2016
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 17-10-2016 en 16-11-2016
 - advies aan CCD: 21-12-2016
7. De inhoud van dit project is afgestemd met de IvD en deze heeft geen bezwaren tegen de uitvoering van het project binnen deze instelling.
8. Eventueel horen van aanvrager:
 - Datum
 - Plaats
 - Aantal aanwezige DEC-leden
 - Aanwezige (namens) aanvrager
 - Gestelde vraag / vragen
 - Verstrekt(e) antwoord(en)
 - Het horen van de aanvrager heeft wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag.
9. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum vragen: 13-09-2016
 - Datum antwoorden: 17-10-2016
 - Gestelde vragen en antwoorden:

Project Proposal:

-3.2 De haalbaarheid is nog onvoldoende toegelicht en onderbouwd met referenties naar eigen werk.

Antwoord: De haalbaarheid van het project is verder toegelicht in hoofdstuk 3.2 van het PP. De groep heeft verscheidene publicaties en veel ervaring met [REDACTED] en [REDACTED] [REDACTED] en het gebruik van [REDACTED]. Competentie voor het werken met [REDACTED] is

vergaard aan de [REDACTED]. Kennis voor [REDACTED] in DM1 modellen wordt verzameld aan de [REDACTED]. Ervaring [REDACTED] injectie van [REDACTED] in [REDACTED] muizen zal worden opgedaan in het [REDACTED].

-3.4.1 De strategie voor het werk met [REDACTED] is duidelijk. De strategie-beschrijving van het werk met [REDACTED] is onvoldoende.

Antwoord: Wij zien inderdaad in dat de omschrijving van de humane experimenten nog niet helder was. De strategiebeschrijvingen van het werk met [REDACTED] zijn aangevuld in de hoofdstukken 3.1, 3.4.1 en 3.4.2 van het PP.

-3.4.2 Het muizenwerk vormt een afgerond geheel. Waarom is het nodig om ook het humane werk te doen? Zijn beide onderdelen van de projectaanvraag nodig voor het behalen van de doelstelling? Is er een volgorde in de experimenten, bijvoorbeeld eerst de rescue-experimenten in het DM1 muismodel alvorens de [REDACTED] in de [REDACTED] muizen worden onderzocht? De commissie mist een duidelijke beschrijving hiervan. Bovendien ontbreken de experimenten met [REDACTED] in de DAPs. Willen de onderzoekers overwegen dit project te beperken tot de experimenten met de DM1 muis?

Antwoord: Door zowel het muizen- als het humane werk te implementeren is het mogelijk de doelstelling van het project te behalen, namelijk het onderzoeken van de therapeutische waarde voor de patiënt. Verschillende vragen worden beantwoord door de twee uiteenlopende benaderingen:

- 1. Ten eerste, door [REDACTED] uit [REDACTED] muis modellen, deze [REDACTED] en injecteren in [REDACTED] modellen is het mogelijk een functionele read-out van de behandeling toe te passen. Dit geeft een beeld van de effectiviteit van de behandeling.*
- 2. Ten tweede, om te onderzoeken of deze aanpak therapeutische waarde heeft voor in de kliniek maken we gebruik van [REDACTED] en [REDACTED] deze, na [REDACTED], in [REDACTED] muizen. Zo kunnen we het gedrag van [REDACTED] in een [REDACTED] bestuderen.*

Het is op dit moment op basis van literatuurgegevens niet uit te sluiten dat [REDACTED] en [REDACTED] zich bij de [REDACTED] en [REDACTED].

Door gebruik te maken van beide benaderingen kunnen we in een zo kort mogelijke tijd efficiënt en met zo min mogelijk dieren een inschatting maken van de haalbaarheid van onze hypothese, om op termijn mogelijk iets voor patiënten te kunnen betekenen.

-3.4.3 Waarom zijn beide muismodellen noodzakelijk? Het [REDACTED] model is het enige model met een fenotype. Waarom is onderzoek in beide muismodellen nodig en kan niet worden volstaan met onderzoek in het [REDACTED] model?

Antwoord: Het includeren van beide muismodellen is van groot belang. Dit wordt in detail uitgelegd in hoofdstuk 3.4.3 van het PP.

[REDACTED] patiënten hebben een [REDACTED] in het [REDACTED]. Dit is een van de belangrijkste kenmerken van de aandoening. Hoe [REDACTED] de [REDACTED] is verschilt [REDACTED] van patiënt tot patiënt. Dit veroorzaakt verschil in ziektebeeld. [REDACTED] en [REDACTED] muizen hebben een [REDACTED] van [REDACTED]. [REDACTED] heeft een [REDACTED] en vertoont hierdoor ook een [REDACTED] fenotype. Het toepassen van de techniek op beide modellen geeft waardevolle informatie over de [REDACTED]. Het laat zien of de [REDACTED], [REDACTED] en [REDACTED] mogelijk zijn in verschillende [REDACTED] modellen. Dit weerspiegelt de patiëntenpopulatie. Het zou fantastisch zijn als we met één techniek het hele patiëntenspectrum kunnen behandelen.

Description of Animal Procedures:

*DAP1

-A2: Het fenotype is niet goed uitgelegd voor beide modellen. Ook zijn de handelingen met de dieren niet adequaat beschreven.

Antwoord: De beschrijving van het fenotype en de handelingen met de [REDACTED] muizen zijn aangevuld. U kunt deze vinden in hoofdstuk 3.4.4.1 A.2.

-A3: De aantallen zijn niet onderbouwd (geldt ook voor andere DAPs). Waarom zijn er 200 [REDACTED] en 250 [REDACTED] dieren nodig? Optelling van de muizen opgevoerd in DAPs 2-4 leidt tot andere aantallen. Op p5 wordt gesteld dat 'Statistics, power calculations and pilot experiments are used to reduce the number of animals to an absolute minimal'. Het is de commissie volstrekt onduidelijk hoe deze intentie wordt waargemaakt.

Antwoord: Door de ervaring opgedaan aan de [REDACTED] zijn de aantallen zijn naar beneden bijgesteld. 150 [REDACTED] en 150 [REDACTED] muizen worden gefokt waarvan we er 100 includeren in [REDACTED] experimenten en 50 in [REDACTED] experimenten. In alle DAPs is de onderbouwing voor de aantallen uitgebreid.

-I: zacht voedsel werkt in zijn algemeenheid averechts bij [REDACTED].

Antwoord: [REDACTED] maar muizen die nog maar enkele dagen in het experiment blijven krijgen zacht voedsel (hoofdstukken 3.4.4.1 D.2 en 3.4.4.1 I.3). Op deze manier krijgen de dieren voldoende voedsel binnen maar hoeven ze niet de stressvolle procedure van [REDACTED] te ondergaan. Deze aanpak wordt in andere [REDACTED] fokken ook toegepast [REDACTED]).

-J: De CCD heeft geen toegang tot de genoemde intranetsite. Graag de te hanteren humane eindpunten beschrijven. (geldt ook voor DAP2)

Antwoord: Zoals omschreven in de eerste ingediende versie van DAP1 en DAP2 verwachten wij géén ongerief in de fok of weefsel isolatie waarbij het nodig is humane eindpunten te implementeren. Daarom wordt de algemene regelgeving aangehouden met humane eindpunten volgens 'OECD Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation' (OECD Guidance Document 19, 2000). Voor [REDACTED] kunt u de humane eindpunten die gehanteerd worden terug vinden in de hoofdstukken 3.4.4.3 J en 3.4.4.4 J.

-K: De percentages dieren die matig respectievelijk licht ongerief ondergaan ontbreken. Wat is het ongerief voor de dieren die binnen een maand na geboorte overlijden?

Antwoord: De percentages dieren die ongerief ondervinden in de [REDACTED] fok zijn terug te vinden in hoofdstuk 3.4.4.1 K. Het ongerief voor de [REDACTED] muizen die kort na geboorte overlijden is in de eerdere DEC geclassificeerd als mild (code 2), zo ook in deze aanvraag.

*DAP2

-B: Worden mannen en vrouwen in gelijke aantallen gebruikt? (geldt ook voor DAP3 en 4)?

Antwoord: De inclusie van mannen en vrouwen is 1:1 in DAP 2, 3 en 4

-B: Muizen ouder dan [REDACTED] worden gebruikt, maar hoe oud zijn de dieren maximaal bij gebruik voor een experiment? Het ongerief voor de [REDACTED] dieren is aanzienlijk.

Antwoord: Voor [REDACTED] experimenten is de optimale leeftijd [REDACTED] en de maximale leeftijd van de muizen [REDACTED] (hoofdstuk 3.4.4.2 B). Na [REDACTED] is de [REDACTED] van [REDACTED] moeilijk en inefficiënt. Omdat de dieren niet ouder worden dan [REDACTED] is er geen sprake van ongerief gerelateerd aan het fenotype. [REDACTED] en [REDACTED] van [REDACTED] beginnen pas vanaf [REDACTED] [REDACTED]).

-I en K: Het ongerief van het fenotype is niet meegenomen.

Antwoord: Er is geen sprake van het ongerief van het fenotype. Dit komt niet tot uiting voor [REDACTED]

*DAP3

-A1: tekst gaat over [REDACTED]). Gaat dit over [REDACTED] In het Project Proposal is geen sprake van muizen [REDACTED] Gaat het hier ineens over [REDACTED] die in [REDACTED] muizen dienen te worden [REDACTED] De laatste ontbreken volledig in de aanvraag.

Antwoord: Door [redacted] muizen [redacted] te injecteren in [redacted] muizen is het mogelijk een functionele read-out van de behandeling te onderzoeken. Dit geeft een idee over de effectiviteit van de behandeling. Door humane [redacted] te [redacted] in [redacted] muizen kunnen we in vivo het gedrag zien van de humane [redacted] en onderzoeken of de aanpak therapeutische waarde heeft voor de kliniek. Een aanvraag voor [redacted] van de [redacted] is ingediend bij de [redacted]. [redacted] van [redacted] cellen is mogelijk uit [redacted] materiaal van [redacted] maar nog nooit eerder geprobeerd bij [redacted] patiënten. Het is onduidelijk of uit een [redacted] voldoende [redacted] en [redacted] kunnen worden om de [redacted] therapie te testen. Met behulp van de [redacted]-techniek kunnen we oneindig veel humane [redacted] [redacted] van lichaamscellen van [redacted] patiënten. We kunnen deze dan [redacted] muizen om het gedrag van de cellen in vivo te bestuderen (3.4.4.3 A1).

-A2: Hoe lang duurt het experiment maximaal? Worden de muizen meermaals functioneel getest? Worden ze direct na de functionele testen gedood?

Antwoord: Muizen worden getest vóór en na toediening van de [redacted] therapie. Functionele metingen worden gedaan met een maximum van 2 keer per week. De muizen worden gehouden tot een maximum leeftijd van 18 maanden. Na de laatste functionele test worden de muizen geofferd en wordt het weefsel geïsoleerd (hoofdstuk 3.4.4.3 A.2).

-B: Klopt het aantal dieren? In de figuur staat dat [redacted] muizen ook voor DAP4 worden gebruikt, maar deze komen in DAP4 niet meer voor. Zijn er dus 250 i.p.v. 500 dieren nodig? Deze dienen dan opgeteld te worden bij het totaal aantal benodigde dieren voor DAP3. Zie ook eerdere vraag over aantallen.

Antwoord: In DAP 3 en DAP 4 worden de [redacted] experimenten beschreven. Het aantal muizen dat nodig voor deze groep is eenmalig 50 [redacted] muizen en eenmalig 50 [redacted] muizen.

-I1 en K: niet alle oorzaken van ongerief zijn genoemd: experimentele handelingen, en fenotype ontbreken.

Antwoord: De informatie is aangevuld in hoofdstuk 3.4.4.3 I

-I3: maatregelen om ongerief van fenotype te minimaliseren ontbreken.

Antwoord: De informatie is aangevuld in hoofdstuk 3.4.4.3 I

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag

- Datum vragen: 14-11-2016

- Datum antwoorden: 08-12-2016

- Gestelde vragen en antwoorden:

Description of Animal Procedures:

***DAP1**

-K: het cumulatief ongerief voor de dieren is nog niet juist weergegeven. De onderzoekers worden verzocht hier het totale ongerief voor de dieren als gevolg van alle ongeriefsoorzaken (inclusief fenotype indien de dieren oud genoeg worden) samen te vermelden. Indien dit cumulatieve ongerief niet voor alle dieren hetzelfde is, dan dienen de percentages dieren vermeld te worden waarop dit ongerief betrekking heeft (samen 100%). (geldt ook voor de andere DAPs). Het ongerief dat wordt veroorzaakt door het doden zonder voorafgaande handelingen wordt in Nederland geclassificeerd als licht. De classificatie "terminaal" wordt alleen gebruikt wanneer eerst nog ingrepen onder anesthesie plaatsvinden, waarna het dier direct, onder dezelfde anesthesie, wordt gedood.

Antwoord: Per DAP is onderdeel K 'Classification of severity of procedure' aangepast.

Wanneer het ongerief niet voor alle dieren hetzelfde is, wordt met percentages aangegeven op welke dieren het ongerief betrekking heeft.

***DAP2**

-A: De onderzoekers zullen humane [REDACTED] in [REDACTED] muizen [REDACTED]. Een beschrijving hiervan op p38/59 ontbreekt evenals een vermelding van de benodigde dieren onder B. Willen de onderzoekers inderdaad [REDACTED] muizen aanvragen?

Antwoord: Dat klopt. De [REDACTED] muizen die nodig zijn voor [REDACTED] van humane [REDACTED] worden gekocht (tabel DAP2 B blz. 15).

*DAP3

-B De aantallen dieren zijn nog niet navolgbaar voor de commissie. In de figuur bij onderdeel A wordt geen onderscheid gemaakt tussen dieren voor DAP2 en DAP3. De commissie verzoekt de onderzoekers in elke DAP duidelijk op te schrijven hoeveel dieren zij hiervoor aanvragen.

Antwoord: De afbeeldingen in DAP2 en 3 zijn verder uitgeschreven. 50 van de 50 [REDACTED] [REDACTED] muizen, worden gebruikt voor [REDACTED] - [REDACTED] [REDACTED] van [REDACTED] muis [REDACTED] zodat de [REDACTED] effecten kunnen worden gemeten. In 12 gekochte [REDACTED] muizen kan [REDACTED] het gedrag van herstelde humane [REDACTED] patiënten [REDACTED] worden getest. 36 van de 50 [REDACTED] [REDACTED] dieren worden gebruikt voor [REDACTED]. De overige 14 [REDACTED] muizen ondergaan [REDACTED] toediening van de [REDACTED] therapie.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

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

- Aard expertise
- Deskundigheid expert
- Datum verzoek
- Strekking van het verzoek
- Datum expert advies
- Advies expert

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. Er is geen betrokkenheid van DEC-leden bij deze projectaanvraag, waardoor onafhankelijkheid en onpartijdigheid zijn gewaarborgd.

C. Beoordeling (inhoud)

1. Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. De opzet komt het best overeen met voorbeeld 4B uit de handreiking 'Invulling definitie project' van de CCD. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft, zowel binnen de doelstellingen en bijlagen dierproeven, als tussen de doelstellingen, beschreven op basis van welke criteria zij zal besluiten het project wel of niet te continueren. De DEC is er daardoor van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en dat er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden.
2. Voor zover de DEC weet is er geen "tegenstrijdige" wetgeving die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is te onderzoeken of [REDACTED] of [REDACTED] gebruikt kunnen worden als [REDACTED] voor [REDACTED] in muismodellen voor deze aandoening. Het uiteindelijke doel is de ontwikkeling van een therapie die de [REDACTED] van [REDACTED] bij DM1 patiënten tegengaat door het toedienen van [REDACTED] of [REDACTED]. Behandeling met [REDACTED] wordt al uitgetest bij andere spierziekten [REDACTED]. De techniek waarmee het [REDACTED] kan worden hersteld ([REDACTED]) wordt in vele labs met succes gebruikt. De DEC is daarom van mening dat er binnen dit project een directe relatie is tussen het korte termijn doel en het uiteindelijke doel. De DEC is bovendien van mening dat het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld.
5. De belangrijkste belanghebbenden in deze projectaanvraag zijn de proefdieren, de onderzoekers en de doelgroep/patiënten.

Voor de proefdieren geldt dat hun welzijn en integriteit worden aangetast. De dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en pijn ondergaan. Uiteindelijk zullen ze in het kader van het onderzoek gedood worden. De dieren hebben er belang bij hiervan gevrijwaard te blijven.

Voor de onderzoekers geldt dat het publiceren van belangrijke nieuwe wetenschappelijke inzichten resulteert in een goede wetenschappelijke reputatie, hetgeen vaak de sleutel is voor het verkrijgen van nieuwe onderzoeksmogelijkheden. Carrière mogelijkheden en welstand kunnen door de onderzoeker zelf van belang geacht worden, maar dienen naar de mening van de DEC geen rol te spelen in de ethische afweging over de toelaatbaarheid van het gebruik van proefdieren. Het gaat uiteindelijk om de vraag of dit onderzoek belangrijke maatschappelijke en wetenschappelijke doelen dient (gezondheid, kennis). Er dient tenminste (ook) sprake te zijn van een algemeen of publiek belang, wil een dierproef gerechtvaardigd zijn.

Voor patiënten is dit onderzoek van belang, omdat het kan bijdragen aan een verbetering van hun gezondheid en kwaliteit van leven. Gerichte behandeling op basis van mechanistisch inzicht kan bijdragen aan een betere behandeling met minder bijwerkingen. Dit kan er toe leiden dat de patiënt een betere kwaliteit van leven heeft. Kunnen beschikken over adequate behandelingen voor ernstige ziekten, zoals DM1, is van groot belang voor de samenleving.
6. De onderzoekers maken gebruik van transgene dieren waarbij zij de nationale GGO-regels in acht nemen. Hierdoor is er geen sprake van belangwekkende milieueffecten.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager, zoals blijkt uit de in de aanvraag vermelde publicaties van deze onderzoeksgroep. De aanvragers beschikken over voldoende kennis en kunde om te kunnen voldoen aan alle zorgvuldigheidseisen omtrent het verrichten van dierproeven.
8. De doelstellingen van het project zijn realistisch en de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten hier logisch bij aan. Bovendien heeft deze groep veel ervaring in dit onderzoeksveld en met de voorgestelde dierproeven. De DEC is dan ook van mening dat het project goed is opgezet, en dat deze strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.

Welzijn dieren

9. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
- Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
 - Niet-menselijke primaten (10e)
 - Dieren in/uit het wild (10f)
 - Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn)
 - Zwerfdieren (10h)
 - Hergebruik (1e lid 2)
 - Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
 - Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
 - Dodingsmethode niet volgens bijlage IV richtlijn (13c lid 3)
10. De huisvesting en verzorging van de dieren zijn conform de eisen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief wordt hoofdzakelijk veroorzaakt door de perinatale sterfte, [REDACTED] bij sommige dieren, en het [REDACTED] door dieren die [REDACTED] hebben. Het cumulatief ongerief is juist ingeschat als licht voor 30% van de dieren en matig voor 70 % van de dieren.
12. De integriteit van dieren is aangetast doordat zij [REDACTED] zijn. Deze [REDACTED] leidt tot [REDACTED] en op latere leeftijd tot [REDACTED]. Op zichzelf kan het "inbouwen" van een dergelijk [REDACTED] [REDACTED] als een vrij ernstige aantasting van de integriteit worden beschouwd. Deze [REDACTED] heeft echter geen gevolgen voor de zelfredzaamheid van de dieren tijdens de duur van het experiment. Daar niet de intentie bestaat de dieren in leven te laten tot het [REDACTED] tot expressie komt, kiest de commissie er voor dit mee te wegen op dezelfde wijze als andere [REDACTED] die niet tot een afwijkend fenotype leiden.
13. De criteria voor humane eindpunten zijn voldoende specifiek gedefinieerd en toegesneden op het experiment. Het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken is op basis van eerdere ervaringen met de diermodellen ingeschat. De commissie is het dan ook eens met deze inschatting en de gehanteerde humane eindpunten.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Het effect van [REDACTED] bij DM1 kan alleen goed in een proefdiermodel met dezelfde [REDACTED] die DM1 veroorzaakt onderzocht worden. De onderdelen van het project die in vitro bestudeerd kunnen worden zijn al uitgevoerd. Voor het beantwoorden van de resterende onderzoeksvragen zijn dierproeven noodzakelijk.
15. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en is proportioneel ten opzichte van de gekozen onderzoeksopzet en de looptijd. De onderzoekers hanteren een goede strategie om ervoor te zorgen dat er met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een

wetenschappelijk betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Door de stapsgewijze aanpak waarin de resultaten uit eerdere proeven worden gebruikt voor het design van vervolgentoelagen wordt onnodig gebruik van proefdieren voorkomen. De commissie heeft met de aanvragers gediscussieerd over de noodzaak van het gebruik van meer dan één diermodel. De beide [REDACTED] diermodellen vormen samen een afspiegeling van de patiëntenpopulatie, waardoor de DEC overtuigd is van het belang van het gebruik van beide modellen. De experimenten met de [REDACTED] dieren zullen duidelijk maken of de beoogde [REDACTED] bij patiënten succesvol kan zijn.

16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven. De muis is de minst complexe diersoort met skeletspieren die voldoende overeenkomen met de humane situatie. Bovendien is er een muismodel beschikbaar voor deze ziekte. De onderzoekers beogen een optimale behandeling met zo min mogelijk [REDACTED]. De DEC is ervan overtuigd dat de beschreven proefopzet de meest verfijnde is en dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.
17. Het betreft geen wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Dieren van beide geslachten zullen in gelijke mate ingezet worden.
19. De dieren zullen in het kader van het project gedood worden. Dit is noodzakelijk om spierweefsels te kunnen onderzoeken voor het beantwoorden van bepaalde onderzoeksvragen. De gebruikte dodingsmethode staat vermeld in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU.
20. Er worden in deze projectaanvraag geen landbouwhuisdieren, honden, katten of niet-humane primaten gedood om niet-wetenschappelijke redenen.

NTS

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

D. Ethische afweging

1. Rechtvaardigt het belang van de doelstelling van het project het ongerief dat de dieren wordt aangedaan, en is aan alle zorgvuldigheidseisen (3V's) voldaan?
2. Er vindt een lichte of matige aantasting van welzijn en integriteit van de proefdieren plaats (beschreven in C9 tot C20). De doelstellingen kunnen niet zonder dieren behaald worden. De onderzoekers doen al het mogelijke om het lijden van de dieren en het aantal dieren te beperken.
Voor patiënten is dit onderzoek van belang, omdat het op termijn kan bijdragen aan een verbetering van hun gezondheid en kwaliteit van leven. De DEC kent daar veel gewicht aan toe. DM1 is een ernstige progressieve erfelijke ziekte die ondermeer leidt tot voortdurende afname van [REDACTED] waardoor de patiënt steeds verder beperkt wordt in zijn [REDACTED] en een beperkte levensverwachting heeft. Het is aannemelijk dat de doelstellingen op termijn behaald zullen worden. De commissie acht het ontwikkelen van een [REDACTED] waarmee de [REDACTED].

3. De DEC is overtuigd van het belang van de doelstellingen: onderzoeken of [REDACTED] gebruikt kunnen worden als [REDACTED] in muismodellen voor deze aandoening. Het uiteindelijke doel daarvan is de ontwikkeling van een therapie die de [REDACTED] bij DM1 patiënten tegengaat. De DEC is van mening dat de belangen van de patiënten voldoende zwaar wegen om het schaden van de belangen van de proefdieren (om gevrijwaard te blijven van een aantasting van hun welzijn en integriteit) te rechtvaardigen. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager. De DEC is van mening dat het project goed is opgezet, en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn, dat het doel niet met minder dieren behaald kan worden, dat de gebruikte aanpak de meest verfijnde is en dat zij zal kunnen voorkomen dat mens, dier en het milieu onbedoelde negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven.
- De DEC is van oordeel dat het hier boven geschetste belang de onvermijdelijke nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren, in de vorm van angst, pijn of stress, rechtvaardigt. Aan de eis dat het belang van de experimenten op dient te wegen tegen het ongerief dat de dieren wordt berokkend, is voldaan.

E. Advies

1. Advies aan de CCD
- De DEC adviseert de vergunning te verlenen
 - De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
 - Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.
 - Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist
 - Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...
 - De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
 - De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen:...
 - De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...
 - De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...
2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.
3. Er zijn geen knelpunten of dilemma's geconstateerd – zowel binnen als buiten de context van het project - die de verantwoordelijkheid en competentie van de DEC overstijgen.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
Instantie voor dierenwelzijn
Postbus 9101, t.a.v. [REDACTED]
6500 HB NIJMEGEN
[REDACTED]

**Centrale Commissie
Dierproeven**
Postbus 20401
2500 EK Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD103002016801
Bijlagen
2

Datum 22 december 2016
Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 22 december 2016. Het gaat om uw project "Development of a cell therapy against the muscular phenotype of Myotonic Dystrophy ". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD103002016801. 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. U ontvangt binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. Als wij nog informatie van u 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 voldoen, 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).

Datum:

22 december 2016

Aanvraagnummer:

AVD103002016801

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
22 december 2016
Aanvraagnummer:
AVD103002016801

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10300
Naam instelling of organisatie: Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
KvK-nummer: 41055629
Postbus: 9101, t.a.v. [REDACTED]
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN
IBAN: NL90ABNA0231209983
Tenaamstelling van het rekeningnummer: UMC St Radboud

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Datum:
22 december 2016
Aanvraagnummer:
AVD103002016801

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

Functie: Instantievoor Dierenwelzijn
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Gegevens gemachtigde

Naam: [REDACTED]
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN

Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Nee

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: 22 januari 2017
Geplande einddatum: 22 januari 2022
Titel project: Development of a cell therapy against the muscular phenotype of Myotonic Dystrophy
Titel niet-technische samenvatting: Ontwikkeling van een celtherapie voor Myotone Dystrofie type 1
Naam DEC: RU DEC
Postadres DEC: Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen [REDACTED]
E-mailadres DEC: [REDACTED]

Datum:
22 december 2016
Aanvraagnummer:
AVD103002016801

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1.441,-
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: Instantie voor dierenwelzijn
Plaats: Nijmegen
Datum: 22 december 2016



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Instantie voor dierenwelzijn
Postbus 9101, t.a.v. [REDACTED]
6500 HB NIJMEGEN
[REDACTED]

**Centrale Commissie
Dierproeven**
Postbus 20401
2500 EK Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD103002016801
Bijlagen
2

Datum 22 december 2016
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 22 december 2016
Vervaldatum: 21 januari 2017
Factuurnummer: 16700801
Ordernummer: 040823-461220/2016-0049/[REDACTED]

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD103002016801	€ 1.441,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL29INGB 070.500.1512 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93144, 2509 AC te 's Gravenhage.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
Instantie voor Dierenwelzijn
t.a.v. ██████████,
Postbus 9101, ██████████
6500 HB (628) NIJMEGEN
██████████

**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.centrale
commissiedierproeven.nl

T 0900-28 000 28 (10 ct /min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD103002016801

Uw referentie

Bijlagen
1

Datum 6 januari 2017
Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte ██████████,

Op 22 december 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Development of a cell therapy against the muscular phenotype of Myotonic Dystrophy" met aanvraagnummer AVD103002016801. 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:

- 1) In uw aanvraag geeft u aan muizen te willen gebruiken. De CCD hecht er aan dat het aantal dieren in voorraad gedood terug te dringen. Kunt u toelichten of het dieren van beide geslachten worden gebruikt en als dit niet mogelijk is kunt u dan onderbouwen waarom het belangrijk is dieren van 1 geslacht te gebruiken?
- 2) In bijlage dierproeven 3.4.4.1 meldt u dat 'Optimization of the procedure is established with ██████████ and wt littermates born from ██████████ breeding.' Onder punt 'B. The animals' geeft u alleen het aantal ██████████ muizen aan. Het is voor ons niet duidelijk hoe veel dieren voor de optimalisatie van de procedures worden gebruikt en waarom deze dieren niet meegerekend zijn in het aantal benodigde dieren. Zou u dit willen toelichten en indien van toepassing graag in uw aanvraag aanpassen?
- 3) In de bijlage dierproeven 3.4.4.3 beschrijft u ook pilotexperimenten te willen uitvoeren met n=3 dieren. Het is voor ons niet duidelijk of deze dieren meegerekend zijn in het aantal vermelde ██████████ dieren (35 ██████████ muizen). Zou u dit willen toelichten en indien van toepassing graag het aantal dieren in uw aanvraag aanpassen?

Datum

6 januari 2017

Onze referentieAanvraagnummer
AVD103002016801

4) In het projectvoorstel beschrijft u [REDACTED] applicatie van [REDACTED] te willen uitvoeren. Begrijpen we goed dat dit experiment onder de bijlage dierproeven 3.4.4.3 valt?

In de figuur op pagina 12 van het projectvoorstel geeft u aan dat [REDACTED] met de [REDACTED] [REDACTED] ook in [REDACTED] muizen worden gedaan.

Indien dit experiment onder bijlage 3.4.4.3 valt is voor ons niet duidelijk hoe veel [REDACTED] muizen hiervoor worden ingezet. In deze bijlage wordt niet naar de [REDACTED] muizen verwezen. Kunt u dit uitleggen en indien nodig de aanvraag aanpassen?

Opsturen binnen veertien dagen

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via NetFTP. Gebruik hierbij het formulier dat u bij deze brief krijgt indien u uw antwoord per post verstuurt.

Wanneer een beslissing

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

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.zbo-ccd.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

Van: Info-zbo
Verzonden: dinsdag 10 januari 2017 16:54
Aan: [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: Extra aanvullende informatie aanvraag AVD103002016801

Geachte [REDACTED]

In aanvulling op de eerder gevraagde aanvullende informatie willen we u graag vragen om de tekst onder kopje 'D. Replacement, reduction, refinement' in alle bijlages dierproeven verder uit te werken. De beschrijving van de toepassing van de methoden voor vervanging, vermindering en verfijning is summier. Vooral de methoden voor vervanging ontbreken in uw aanvraag.

Om uw aanvraag in de eerstkomende CCD vergadering te kunnen bespreken ontvangen we graag uw antwoord uiterlijk maandag, 16 januari 2017.

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen.

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

Van: Info-zbo
Verzonden: vrijdag 6 januari 2017 12:22
Aan: [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: aanvullende informatie aanvraag AVD103002016801

Geachte heer Sneepers,

Op 22 december 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Development of a cell therapy against the muscular phenotype of Myotonic Dystrophy" met aanvraagnummer AVD103002016801. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In de bijgaande brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. Om uw aanvraag in de eerstkomende CCD vergadering te kunnen bespreken ontvangen we graag uw antwoord uiterlijk **maandag, 16 januari 2017**.

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen.

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

Van: [REDACTED]
Verzonden: maandag 9 januari 2017 12:33
Aan: info@zbo-ccd.nl
CC: dierexperimentencommissie@radboudumc.nl
Onderwerp: RE: aanvullende informatie aanvraag AVD103002016801

Categorieën: Dossier: [REDACTED]

Geachte [REDACTED],

Allereerst ook voor u en de andere medewerkers van het bureau van de CCD de beste wensen voor 2017!

Excuses voor de onduidelijkheden in het DEC-advies wat betreft het aantal bijlagen en het gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren.

1. De aanvrager heeft tussentijds besloten (na overleg met de IvD) om de eerste bijlage (DAP1) weg te laten. Hierin werd alleen de fok voor de benodigde dieren beschreven. Deze fok is nu toegevoegd aan de drie bijlagen waarin de experimenten met de dieren worden beschreven, overeenkomstig de richtlijnen van de CCD. De nummering van de bijlagen is aangepast (wat eerst DAP4 was is nu DAP3 etc.).
2. De aanvrager heeft in eerste instantie het geslacht van de dieren niet vermeld. Volgens het format DEC-advies dient de DEC advies te geven over het gebruik van mannelijke en/of vrouwelijke dieren. Na de vraag van de DEC hierover heeft de onderzoeker geantwoord dat dieren van beide geslachten in gelijke aantallen gebruikt zullen worden in de experimenten. Deze informatie is opgenomen in het DEC-advies, maar kennelijk niet verwerkt in de projectaanvraag.

Ik hoop uw vragen aan de DEC hiermee voldoende te hebben beantwoord. Indien u meer informatie nodig heeft of een nieuw dec-advies waarin deze antwoorden zijn verwerkt, dan hoor ik het graag.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]
[REDACTED]

Van: Info-zbo [mailto:info@zbo-ccd.nl]
Verzonden: vrijdag 6 januari 2017 12:43
Aan: Postbus DierExperimenten Commissie
Onderwerp: aanvullende informatie aanvraag AVD103002016801

Geachte RUDEC,

Beste wensen voor 2017!

Op 21 december 2016 heeft u advies uitgebracht op een projectaanvraag met titel 'Development of a cell therapy against the muscular phenotype of Myotonic Dystrophy type 1' en aanvraagnummer AVD103002016801, uw kenmerk 2016-0049.

In uw advies zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden.

1) In de beschrijving van uw correspondentie met de aanvrager werd enkele keren naar DAP 4 gerefereerd: 'Optelling van de muizen opgevoerd in DAPs 2-4 leidt tot andere aantallen.'; '-B: Worden mannen en vrouwen in gelijke aantallen gebruikt? (geldt ook voor DAP3 en 4)? Antwoord: De inclusie van mannen en vrouwen is 1:1 in DAP 2, 3 en 4.'; '-B: Klopt het aantal dieren? In de figuur staat dat [REDACTED] muizen ook voor DAP4 worden gebruikt, maar deze komen in DAP4 niet meer voor. Zijn er dus 250 i.p.v. 500 dieren nodig? Deze dienen dan opgeteld te worden bij het totaal aantal benodigde dieren voor DAP3. Zie ook eerdere vraag over aantallen. Antwoord: In DAP 3 en DAP 4 worden de [REDACTED] experimenten beschreven. Het aantal muizen dat nodig voor deze groep is eenmalig 50 [REDACTED] muizen en eenmalig 50 [REDACTED] muizen.'

In de aanvraag die wij hebben ontvangen zijn er maar 3 bijlagen dierproeven benoemd en beschreven. Het is voor ons niet duidelijk over welke 4 bijlagen dierproeven wordt in uw advies besproken. Zou u dit punt kunnen verhelderen?

2) In de aanvraag wordt het geslacht van de muizen niet benoemd. Daarom is ook de volgende correspondentie tussen u en de aanvrager voor ons een beetje verwarrend: '-B: Worden mannen en vrouwen in gelijke aantallen gebruikt? (geldt ook voor DAP3 en 4)? Antwoord: De inclusie van mannen en vrouwen is 1:1 in DAP 2, 3 en 4.' Heeft u meer informatie hierover, of hoort deze correspondentie per ongeluk bij een andere aanvraag/advies? Zou u hierop uiterlijk maandag, 16 januari 2017, willen reageren?

De volgende vragen zijn aan de aanvrager voorgelegd:

1) In uw aanvraag geeft u aan muizen te willen gebruiken. De CCD hecht er aan dat het aantal dieren in voorraad gedood terug te dringen. Kunt u toelichten of het dieren van beide geslachten worden gebruikt en als dit niet mogelijk is kunt u dan onderbouwen waarom het belangrijk is dieren van 1 geslacht te gebruiken?

2) In bijlage dierproeven 3.4.4.1 meldt u dat 'Optimization of the procedure is established with [REDACTED] and wt littermates born from [REDACTED] breeding.' Onder punt 'B. The animals' geeft u alleen het aantal [REDACTED] muizen aan. Het is voor ons niet duidelijk hoe veel dieren voor de optimalisatie van de procedures worden gebruikt en waarom deze dieren niet meegerekend zijn in het aantal benodigde dieren. Zou u dit willen toelichten en indien van toepassing graag in uw aanvraag aanpassen?

3) In de bijlage dierproeven 3.4.4.3 beschrijft u ook pilotexperimenten te willen uitvoeren met n=3 dieren. Het is voor ons niet duidelijk of deze dieren meegerekend zijn in het aantal vermelde [REDACTED] dieren (35 [REDACTED] muizen). Zou u dit willen toelichten en indien van toepassing graag het aantal dieren in uw aanvraag aanpassen?

4) In het projectvoorstel beschrijft u [REDACTED] applicatie van [REDACTED] te willen uitvoeren.

Begrijpen we goed dat dit experiment onder de bijlage dierproeven 3.4.4.3 valt?

In de figuur op pagina 12 van het projectvoorstel geeft u aan dat [REDACTED] met de [REDACTED] [REDACTED] ook in [REDACTED] muizen worden gedaan.

Indien dit experiment onder bijlage 3.4.4.3 valt is voor ons niet duidelijk hoe veel naakte muizen hiervoor worden ingezet. In deze bijlage wordt niet naar de [REDACTED] muizen verwezen. Kunt u dit uitleggen en indien nodig de aanvraag aanpassen?

Indien u ook hierop wil reageren, horen we het graag.

Alvast hartelijk dank.

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

Het Radboudumc staat geregistreerd bij de Kamer van Koophandel in het handelsregister onder nummer 41055629. The Radboud university medical center is listed in the Commercial Register of the Chamber of Commerce under file number 41055629.

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

13 januari 2016

Kenmerk: aanvraagnummer AVD103002016801

Betreft: Aanvulling aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte leden van de Centrale Commissie Dierproeven,

Hiermee verzoeken wij de leden van de Centrale Commissie Dierproeven om een beoordeling van het onderzoek getiteld '*Development of a cell therapy against the muscular phenotype of Myotonic Dystrophy type 1*', geregistreerd onder nummer AVD103002016801.

Onderstaand vindt u de reactie op uw vragen en opmerkingen. De nieuwe rapporten van de herziene projectbeschrijving staan in iVentionLES. Wij hopen u hiermee voldoende geïnformeerd te hebben.

Met vriendelijke groet,



Radboudumc Nijmegen
Department of Human Genetics
Geert Grooteplein
6525 GA Nijmegen
The Netherlands



Radboudumc Nijmegen
Department of
Geert Grooteplein
6525 GA Nijmegen
The Netherlands

De CCD hecht er aan dat het aantal dieren in voorraad gedood terug te dringen. Kunt u toelichten of het dieren van beide geslachten worden gebruikt en als dit niet mogelijk is kunt u dan onderbouwen waarom het belangrijk is dieren van 1 geslacht te gebruiken?

In onze aanvraag worden dieren van beide geslachten gebruikt.

In bijlage dierproeven 3.4.4.1 meldt u dat 'Optimization of the procedure is established with [redacted] and [redacted] littermates born from [redacted] breeding.' Onder punt 'B. The animals' geeft u alleen het aantal [redacted] muizen aan. Het is voor ons niet duidelijk hoe veel dieren voor de optimalisatie van de procedures worden gebruikt en waarom deze dieren niet meegerekend zijn in het aantal benodigde dieren. Zou u dit willen toelichten en indien van toepassing graag in uw aanvraag aanpassen?

Onze excuses voor deze omissie. Het aantal dieren dat gebruikt wordt voor de optimalisatie is in de nieuwe versie van de aanvraag weergegeven in figuur 1 onder punt 3.4.4.1 B 'The animals'. Het gaat om 10% van de wt en [redacted] dieren. Deze surplus dieren zijn 'overtallig' van de [redacted] fok en zouden anders ook geëuthaniseerd worden. Het aantal is hoger voor de [redacted] dieren aangezien onze focus voornamelijk ligt op het [redacted] muismodel maar ook validatie en optimalisatie voor de [redacted] muizen is nodig omdat het verschil [redacted] achtergrond een effect kan hebben op cel isolatie.

In de bijlage dierproeven 3.4.4.3 beschrijft u ook pilot-experimenten te willen uitvoeren met n=3 dieren. Het is voor ons niet duidelijk of deze dieren meegerekend zijn in het aantal vermelde [redacted] dieren (35 [redacted] muizen). Zou u dit willen toelichten en indien van toepassing graag het aantal dieren in uw aanvraag aanpassen?

De dieren geïncubeerd in het pilot experimenten waren nog niet meegerekend in het totaal aantal [redacted] dieren. Dit is nu aangepast in 3.4.4.3. B 'The animals'.

In het projectvoorstel beschrijft u [redacted] applicatie van [redacted] te willen uitvoeren. Begrijpen we goed dat dit experiment onder de bijlage dierproeven 3.4.4.3 valt?

Ja, de [redacted] toediening valt onder bijlage 3.4.4.3. [redacted] application of [redacted]

In de figuur op pagina 12 van het projectvoorstel geeft u aan dat [redacted] met de geïsoleerde cellen ook in [redacted] muizen worden gedaan. Indien dit experiment onder bijlage 3.4.4.3 valt is voor ons niet duidelijk hoe veel [redacted] muizen hiervoor worden ingezet. In deze bijlage wordt niet naar de [redacted] muizen verwezen. Kunt u dit uitleggen en indien nodig de aanvraag aanpassen?

Het spijt ons dat het overzicht op blz. 12 voor verwarring heeft gezorgd. Deze afbeelding is aangepast. Om het aantal muizen in het project te verlagen en de haalbaarheid van het project te waarborgen wordt [redacted] alleen gedaan in [redacted] muizen. De experimenten met de [redacted] muizen zullen beperkt worden tot [redacted] zoals omschreven in DAP 3.4.4.2.

Kunt u de tekst onder kopje 'D. Replacement, reduction, refinement' in alle bijlages dierproeven verder uit te werken. De beschrijving van de toepassing van de methoden voor vervanging, vermindering en verfijning is summier. Vooral de methoden voor vervanging ontbreken in uw aanvraag.

De tekst onder 'Replacement, reduction, refinement' is in alle bijlagen verder uitgewerkt met de focus voornamelijk op informatievoorziening over vervanging.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
Instantie voor dierenwelzijn
Postbus 9101, t.a.v. [REDACTED]
6500 HB NIJMEGEN
[REDACTED]

**Centrale Commissie
Dierproeven**
Postbus 20401
2500 EK Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD103002016801
Bijlagen
1

Datum 1 februari 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 22 december 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Development of a cell therapy against the muscular phenotype of Myotonic Dystrophy " met aanvraagnummer AVD103002016801. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 16 januari 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. U heeft de vragen van de CCD beantwoord, het aantal dieren aangepast en de 3V's uitgewerkt.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning.

Met het oog op artikel 10a, lid 1, zijn er algemene voorwaarden gesteld.

U kunt met uw project "Development of a cell therapy against the muscular phenotype of Myotonic Dystrophy " starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 februari 2017 tot en met 22 januari 2022. De looptijd van de vergunning wijkt af omdat de startdatum in de aanvraag in het verleden ligt.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie RU DEC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 21 december 2016. 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. Dit advies van de commissie nemen wij over,

inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld. Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

Datum:
1 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD103002016801

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.centralecommissiedierproeven.nl. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze;


Ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

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: Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Adres: Postbus 9101, t.a.v. [REDACTED]

Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN

Deelnemersnummer: 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 februari 2017 tot en met 22 januari 2022, voor het project "Development of a cell therapy against the muscular phenotype of Myotonic Dystrophy " met aanvraagnummer AVD103002016801, volgens advies van Dierexperimentencommissie RU DEC. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Promovenda.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 22 december 2016
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 16 januari 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 16 januari 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 21 december 2016, ontvangen op 22 december 2016.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 16 januari 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 [REDACTED]	skeletal muscle			
	Muizen (Mus musculus) / [REDACTED]	455	71% Matig 29% Licht	
3.4.4.2 [REDACTED]	or saline solution			
	Muizen (Mus musculus) / [REDACTED]	152	60% Matig 40% Licht	
3.4.4.3 [REDACTED]				
	Muizen (Mus musculus) / [REDACTED]	43	100% Matig	

Aanvraagnummer:

AVD103002016801

Voorwaarden

Op grond van artikel 10a1 lid 2 van de Wet op de dierproeven zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen

De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat go/no go momenten worden afgestemd met de IVD.

In artikel 10, lid 1 sub a 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 afstemming met de IVD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarde wijzigen of intrekken.



Aanvraagnummer:
AVD103002016801

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 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 verdooving

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdooving 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 verdooving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdooving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdooving 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 verdooving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn

Aanvraagnummer:

AVD103002016801

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 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 13d 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 13c 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.

De Minister heeft vrijstelling ontheffing verleend volgens artikel 13c, die de afwijkende methode van doden op basis van wetenschappelijke motivering ten minste even humaan acht als de in de richtlijn opgenomen passende methoden.

Inventaris Wob-verzoek W17-07										
		wordt verstrekt				weigeringsgronden				
nr.	document NTS 2016803	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1	
1	Aanvraagformulier				x		x	x		
2	NTS initieel	x								
3	Project proposal				x			x		
4	bijlage dierproeven 1				x			x		
5	bijlage dierproeven 2				x			x		
6	DEC advies				x		x	x		
7	ontvangstbevestiging				x		x	x		
8	Advies CCD aan bestuur		x						x	
9	Beschikking				x		x	x		



28 DEC. 2016

Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

- U bent van plan om één of meerdere dierproeven uit te voeren.
- Met dit formulier vraagt u een vergunning aan voor het project dat u wilt uitvoeren. Of u geeft aan wat u in het vergunde project wilt wijzigen.
- Meer informatie over de voorwaarden vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl of in de toelichting op de website.
- Of 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 11400	
		<input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen	
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUmc) te Amsterdam	
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde [Redacted]	
		KvK-nummer 64156338	
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	Straat en huisnummer de Boelelaan 1117	
		Postbus	
		Postcode en plaats 1081HV Amsterdam	
		IBAN	
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	Tenaamstelling van het rekeningnummer	
		(Titel) Naam en voorletters [Redacted] <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.	
		Functie [Redacted]	
		Afdeling [Redacted]	
		Telefoonnummer [Redacted]	
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	E-mailadres [Redacted]	
		(Titel) Naam en voorletters <input 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 | 1-1-2018 |
| Einddatum | 1-1-2023 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- The role of mycobacterial lipid bodies in antibiotic tolerance, towards better understanding of persistent Mycobacterium tuberculosis
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- De rol van mycobacteriële vetbolletjes in antibiotica tolerantie, Voor een beter begrip van persistente Mycobacterium tuberculosis
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|---|
| Naam DEC | DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum |
| Postadres | Amsterdam Nederland |
| E-mailadres | |

4 Betaalgegevens

4.1 Om welk type aanvraag gaat het?	<input checked="" type="checkbox"/> Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1187 Lege
	<input type="checkbox"/> Wijziging € Lege
4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen. <i>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.</i>	<input type="checkbox"/> Via een eenmalige incasso
	<input checked="" type="checkbox"/> Na ontvangst van de factuur*
	* Wanneer de factuur direct naar de financiële afdeling van de VU of het VUmc dient te gaan moet hier een inkoopordernummer en factuuradres worden toegevoegd door de onderzoekers, graag van te voren afstemmen met de financiële afdeling.
	Inkoopordernummer: [REDACTED]
	Factuuradres:
	[REDACTED]
	VU medisch centrum t.a.v. crediteuren administratie
	[REDACTED]
	Postbus 7057 1007 MB Amsterdam
	Graag verzoeken we de CCD om het bovenstaande inkoopordernummer aan de factuur toe te voegen en de factuur te versturen naar het factuuradres.

5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?	Verplicht
	<input checked="" type="checkbox"/> Projectvoorstel
	<input checked="" type="checkbox"/> Niet-technische samenvatting
	Overige bijlagen, indien van toepassing
	<input checked="" type="checkbox"/> Melding Machtiging
	<input type="checkbox"/>

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	Amsterdam
Datum	22 - 12 - 2016
Handtekening	[REDACTED]



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.centralecommissiedierproeven.nl.

1 Gegevens aanvrager

- 1.1 Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.
- | | |
|--------------------------------|------------|
| Naam van de portefeuillehouder | [REDACTED] |
| KvK-nummer | 64156338 |
| NVWA deelnemernummer | 11400 |

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 | [REDACTED] |
| <input checked="" 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] Amsterdam | |

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

[Redacted]

Datum

1 6 - 0 8 - 2 0 1 6

Handtekening
portefeuillehouder
van de instelling

[Redacted]

Handtekening
gemachtigde



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

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

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

So, ultimately, this project will lead us to the understanding of the role of lipid bodies in antibiotic tolerance observed in mycobacterial persisters *in vivo*. We will determine whether lipid body formation is essential for persister formation *in vivo* and if they are the cause of antibiotic tolerance *in vivo*. When lipid bodies are indeed involved in persister formation and/or antibiotic tolerance, we can target the identified proteins that play a role in lipid body formation and directly kill this form or prevent further development of persisters such that they remain susceptible to current anti-TB drugs.

The researchers have longstanding expertise within the TB field and also to the topic of this proposal. We believe that understanding the molecular mechanisms underlying mycobacterial persistence is crucial to accelerate the development of effective drugs and vaccines for cure or prevention of TB. Therefore the main focus of the research group is to understand mycobacterial virulence (e.g. PMC523024 and PMID: 22256857). More specifically, we recently identified that a secretion system present in pathogenic mycobacteria is involved in transport of fatty acids across the membrane (PMC4418733), an important finding for step 2 in Figure 1.

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?

The goal of this project is to define the role of lipid bodies in persistent mycobacteria. The following questions will be answered within this project:

- Are lipid bodies essential for development of a persister cell *in vivo*?

[Redacted text]

- Are [Redacted] mutants more susceptible to anti-TB antibiotics *in vivo*?

This question will be answered by analyzing the bacterial load after antibiotic treatment.

[Redacted text]

[REDACTED]

The experiments will be performed at a specified (authorized) area at the department that is restricted to adult zebrafish infections only. Zebrafish (breed) are housed following standard procedures. An experienced technician will execute the experiments. We are specialized and highly experienced in performing both embryo and adult zebrafish mycobacteria experiments. [REDACTED]

3.3 Belang

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

Social interest

Treating TB in humans takes a minimum of six months, using a combination of antibiotics. Extensive (genotypic) drug resistant strains need even longer treatment, up to 2 years. Therefore, treatment is expensive and effective drugs are not always available in lower-income countries. Lack of compliance with long-term treatment schedules also promotes genotypic drug resistance. Lastly, TB drugs can have severe side effects.

As explained, persister cell formation is believed to be the reason for the need of prolonged treatment of TB. The presence of persisters is indeed identified in patient material (during treatment), based on transcriptomics, cultivability and lipid body positivity (PMC4825072 , PMC4548467, PMC4463005 and PMID: 24072170). Understanding persister cell formation and the role of lipid bodies in this is therefore crucial in our efforts to shorten duration of treatment and concomitant better and safer treatment of TB patients. More fundamental research on the mechanisms at the base of persister cell formation is urgently needed to direct research in this area.

Scientific interest

[REDACTED]
Therefore we hope we can determine the role of lipid bodies in persister formation and antibiotic tolerance within the set timeframe. If we reach this, the obtained data would be of great interest for both scientists and industry focusing on vaccine and drug development. We do understand that the development of drugs and vaccines takes many more years until a final product is developed. Nevertheless there is a need for relevant vaccine candidates, antigens that are important for survival of the TB bacillus in the host, and new drug targets, We hope to find targets that can be used for the development of vaccines and anti-TB drugs. [REDACTED]

On a longer run, both latent and active TB patients, but also individuals at risk of becoming infected may benefit from this work. When key mechanisms of lipid body formation are targeted, persisters will not be formed or will be eliminated, making the bacterial population sensitive to antibiotic treatment. This will

hopefully shorten the duration of treatment and limit the development of genotypic drug resistance because of better compliance.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

[REDACTED]

To test that our hypothesis is true, we need [REDACTED]

As previously discussed, [REDACTED] experiments.

[REDACTED]

Animal experiment 1: M. marinum virulence screening in adult zebrafish.

It is uncertain whether lipid bodies are a key factor in persister formation and therefore virulence of the mutants need to be analyzed first. This is the first question as stated in 3.2. An *M. marinum* infection in zebrafish strongly reflects the disease state in human TB infection. In fact, the zebrafish model shows higher similarities to human TB disease than mouse TB models do. Mice are for example not able to generate robust encapsulated necrotic granulomas, whereas these are observed in *M. marinum* infected zebrafish. *M. marinum* infection in adult zebrafish does not always lead to disease, indicating that a latent TB infection occurs in zebrafish [REDACTED], which is also seen in humans. Therefore, we decided to use the zebrafish infection model to study virulence. [REDACTED]

[REDACTED]

Animal experiment 2 Antibiotic susceptibility testing using the [REDACTED] zebrafish mode of tuberculosis.

When we know the infection behavior/virulence of the mutants, we can continue to study the antibiotic susceptibility of the mutants, which is the following question as stated in 3.2. Adult zebrafish have a full functional immune system which is required to trigger the formation of persister cells. [REDACTED]

[REDACTED]

Before we can test antibiotic susceptibility, we have to adapt the zebrafish infection model such that an antibiotic treatment is included to treat the infection. [REDACTED]

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

1. *M. marinum virulence screening in adult zebrafish:*

[REDACTED] In short, a maximum of 3024 adult zebrafish will be infected with [REDACTED]

[REDACTED] the infection will be monitored by observing loss of body weight and development of clinical symptoms of disease, which involves (i) the formation of lesions, (ii) lethargy and changes in consumption behavior. The mutants will be divided in different groups, [REDACTED]. Importantly, when we observe a clear difference between wild-type and a mutant, we will stop testing the remainder mutants.

- *Severity of experiment 1:*

Of the maximum of 3024 zebrafish, 37.5% will encounter mild discomfort whereas 61.3% will encounter moderate discomfort, due to the development of disease. The use of human endpoints will prevent the fish from severe discomfort from the infection. This experiment requires two interventions (injection and sacrifice).

2. *Antibiotic susceptibility testing using the [REDACTED] zebrafish model of tuberculosis:*

This experiment consists of two phases. The first phase is the setup of the [REDACTED] model in adult zebrafish. [REDACTED].

Treatment will start when the infection has set and loss of body weight is observed. [REDACTED]

[REDACTED]. When reactivation occurs, we continue with phase 2. Here we study the antibiotic susceptibility of the obtained mutants, using the model from phase 1. Not all mutants will be tested in once [REDACTED]. When we observe loss of antibiotic tolerance, we will stop testing the other mutants.

- *Severity of experiment 2:*

Experiment 2a: from the 342 zebrafish, 5.26% will encounter mild discomfort, whereas 94.74% will encounter severe discomfort. Experiment 2b: Of the maximum of 3024 zebrafish, 6.66% will encounter mild discomfort, whereas 93.33% will encounter severe discomfort.

This experiment requires the following interventions (including the severity):

Injection = mild discomfort. This requires a single injection to infect the zebrafish. The zebrafish will receive anesthetics prior injection.

Antibiotic treatment = severe discomfort. The zebrafish will be treated after infection with antibiotics [REDACTED]. The zebrafish will receive anesthetics prior treatment. [REDACTED]

[REDACTED]. This part of the experiment is classified as severe because of the frequency of treatment. [REDACTED]

[REDACTED] Importantly, when experiment 2a shows that the bacterial load is strongly reduced within less than [REDACTED], we will treat the zebrafish in experiment 2b for the new set time period, such that we reduce the time of severe discomfort.

Immunosuppressant treatment = moderate discomfort. [REDACTED]

[REDACTED]. The fish will not

encounter any discomfort from this intervention directly, but due to the intervention will start to develop disease symptoms. This will therefore be moderate discomfort. To prevent further discomfort, we will sacrifice fish when we observe clinical symptoms (human endpoints).
Sacrifice = mild discomfort

For both experiments a daily welfare diary will be used. The following phenotypic behaviors will be tracked during the entire experiment (1 and 2):

- (i) Lesion formation on the skin and raised scales. These are classical symptoms observed in an *M. marinum* infected fish that develops disease.
- (ii) Lethargy. When disease develops, the zebrafish will either remain on the bottom of the tank or float to the top.
- (iii) Consumption behavior. When disease develops, the zebrafish will consume less.

Human endpoints are based on these three measurements. In case we observe clear change in behavior and/or lesion formation, we will sacrifice the zebrafish. Thus human endpoints will be monitored on a regular basis.

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.



Experiment 1, *M. marinum* virulence screening in adult zebrafish, will be performed to test whether lipid bodies are a key factor in persister formation.

When we do not have mutants, we will not start this experiment. Experiment 1 will be divided in groups. When we observe clear difference



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.	11400				
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	VU Medisch Centrum				
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	<table border="1" style="border-collapse: collapse; width: 100%;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left;">Volgnummer</th> <th style="text-align: left;">Type dierproef</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="padding: 2px;">1</td> <td style="padding: 2px;"><i>M. marinum</i> virulence screening in adult zebrafish</td> </tr> </tbody> </table>	Volgnummer	Type dierproef	1	<i>M. marinum</i> virulence screening in adult zebrafish
Volgnummer	Type dierproef					
1	<i>M. marinum</i> virulence screening in adult zebrafish					

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

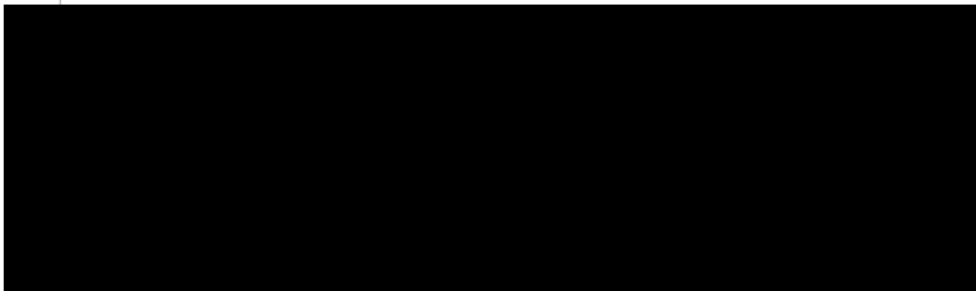
2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

[Redacted content]

Figure 1. [REDACTED]



The following readouts will be determined during this experiment

Bacterial load (endpoint measurement)

The bacterial load (+) will be determined [REDACTED]
[REDACTED] A total of 18 zebrafish will be used for every time point.

Loss of body weight

When disease develops, the fish will start to lose body weight, therefore we will monitor the weight of the fish over time. For every time point (*), we will weigh the fish that are selected for bacterial load determination, thus 18 fish per time point.

Clinical signs of illness

A welfare diary will be used to track the following phenotypic behaviors of the fish during the entire experiment: (i) lesion formation on the skin and raised scales. These are classical symptoms observed in an *M. marinum* infected fish that develops disease. (ii) Lethargy and (iii) consumption behavior. Human endpoints are used to prevent severe discomfort as a result of the infection.

In addition to determination of bacterial load as a function of virulence, we aim to study the survival time of the adult zebrafish. For this study we will perform a Kaplan Meier analysis. The survival time will be based on the human endpoints definitions described before. Data for this analysis will be derived from the aforementioned readouts and therefore an additional group is not required.

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

Every intervention (detailed below) will take place under full anesthesia to limit stress and pain. [REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

Interventions

- 1x intraperitoneal injection of [REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
- Body weight measurements will be performed before sacrifice for bacterial load determination (as [REDACTED])
- Sacrifice using [REDACTED].

Analysis of clinical symptoms is not considered an intervention as the fish are only observed without disturbing their normal behavior.

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

Calculation:

Kaplan Meier: We use a power of 80% and a confidence of 95% to determine the minimal amount of zebrafish required. [REDACTED] Based on these numbers we 16 zebrafish for every group.

Bacterial load: We expect to determine a difference of 50% between the mean of the number of bacteria per fish (100% for group 1 and 50% for group 2) (using a power of 80% and a confidence of 95%) and therefore we need 8 fish per group. As The Kaplan Meier and bacterial load can both be determined on the same fish, we will need a total of 16 fish per group.

B. De dieren

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

Animal: Zebrafish (male and female, equally distributed)
Species: Danio rerio
Age: 9 months

[REDACTED]
Maximum number of required zebrafish:

We expect to obtain a maximum of 20 mutants [REDACTED]

We calculated that we need 16 zebrafish per group. Two zebrafish are added because of possible loss due to infection procedure. Therefore 18 fish per time point are required. We have [REDACTED]. This is for one bacterial strain (wild type or mutant). We expect a total of 20 mutants that need to be tested, plus a wild type strain as a control. That would mean 21 groups in total. 144 zebrafish per group * 21 groups brings us to **3024** zebrafish total. We will split the number of mutants in different groups. When we observe clear difference between [REDACTED] first group(s), we will stop testing the remainder mutants. The selected mutants will further be analyzed in experiment 2, preferably together with at least one mutant that did not differ from the wild type (in case we detect such a mutant). This because we can then further determine whether the formation of a persister cell is essential for antibiotic tolerance and not only the presence of lipid bodies.

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.

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?

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.

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.

To prevent pain and stress, the fish receive anesthetics (MS-222) prior to injection, body weight measurement and bacterial load determination.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

The fish will develop disease and to prevent severe discomfort, specific humane endpoints will be used to sacrifice the fish.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

The fish will suffer from disease symptoms and progression.

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

Use of humane endpoints will be applied.

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.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee

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

To be able to measure the bacterial load we need to isolate organs from the animals

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

The zebrafish will be sacrificed using ice bath followed by decapitation. Although this method is not formally approved yet, the IvD VU/VUmc has been informed that a general exemption is in preparation and the NVWA inspectorate will accept this method already.

Ja



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.	11400	
1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.	VU Medisch Centrum	
1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
<i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>	2	Antibiotic susceptibility testing using the [redacted] zebrafish model of tuberculosis

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

A subset of mycobacteria is able to withstand antibiotic treatment, known as so-called persisters. This form of bacteria have been identified in sputa of *M. tuberculosis* infected individuals that were treated with antibiotics. This population cannot be cultured on plate but can in liquid or when resuscitated (PMID: 24072170, PMC2809243). Furthermore, transcriptomics of *M. tuberculosis* population in sputa shows a 'fat and lazy (slow-growing)' persister like form of *M. tuberculosis* (PMC2276522), which is maintained in persisting *M. tuberculosis* during drug treatment (PMC4825072) and lacks a stress response to anti-TB drug (PMC4548467). Most of the *M. tuberculosis* infected individuals are latent infected, which means that they are infected with the bacterium but do not show any clinical symptoms. After infection, bacteria are not always cleared by the immune system as 5-10% will develop disease within 2 years after infection (PMID: 823803, 16899146 and 16267499), although reactivation has also been described to occur decades after infection (PMID: 12198629). [redacted]

The goal of the described experiment is to test the change in antibiotic susceptibility of [redacted] mutants. This will be determined based on the bacterial load present in the zebrafish after antibiotic treatment [redacted]

[REDACTED]

[REDACTED] Based on these previous studies we will adjust the infection zebrafish model by adding a treatment and immune suppression step after infection, [REDACTED].

The proposed experiment consists of two phases. The first phase is the setup of the [REDACTED] model in adult zebrafish and the second phase will be the study of antibiotic susceptibility of the [REDACTED] mutants in this model.

Phase 1.

Define the windows of reactivation for wild type *M. marinum* and a known [REDACTED] mutant strain.

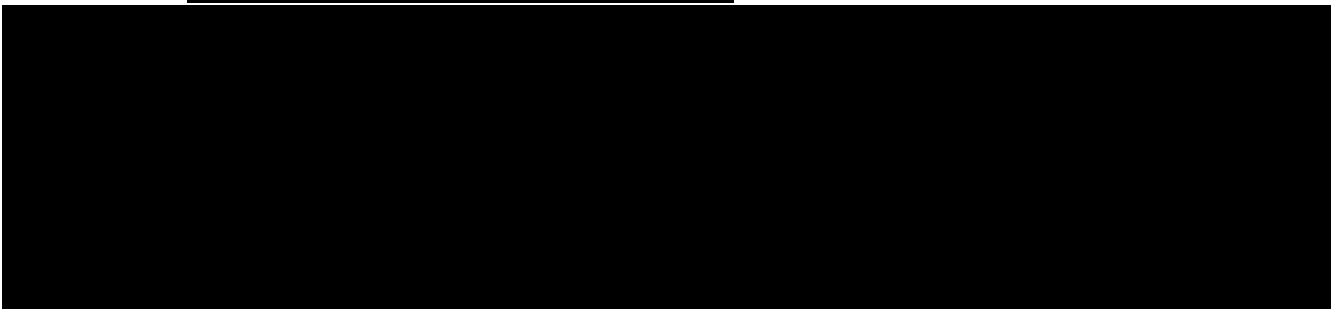
[REDACTED]

[REDACTED] reactivation

Zebrafish will be infected with wild-type *M. marinum* and a known [REDACTED] strain. Infection procedure is identical as performed in *M. marinum* virulence screening in adult zebrafish (*Bijlage 1*). Treatment will start when the infection has set and loss of body weight is observed (maximum of 30%). [REDACTED]

[REDACTED] After withdrawal of the immunosuppressant, the fish will be monitored [REDACTED]

Figure 1. [REDACTED]



The following readouts will be determined during this experiment:

Bacterial load (endpoint measurement)

The bacterial load (†) will be determined [REDACTED]. A total of 9 zebrafish will be used for each of these time points. To estimate the reactivation, the bacterial load (†) will also be determined, however, this requires 18 zebrafish per time point. During immunosuppression, bacterial load will be determined [REDACTED].

Loss of body weight

When TB develops, the fish will start to lose body weight. This measurement is required to determine the time of treatment as well as the reactivation of disease after treatment. Body weight (★) of the zebrafish will be measured prior bacterial load determination but also includes 6 more time points in the infection week. Nine randomly selected fish will be weighted and put back in tray afterwards for this 6 additional days. At intervention days, all fish undergoing intervention will be weighed.

Clinical signs of illness

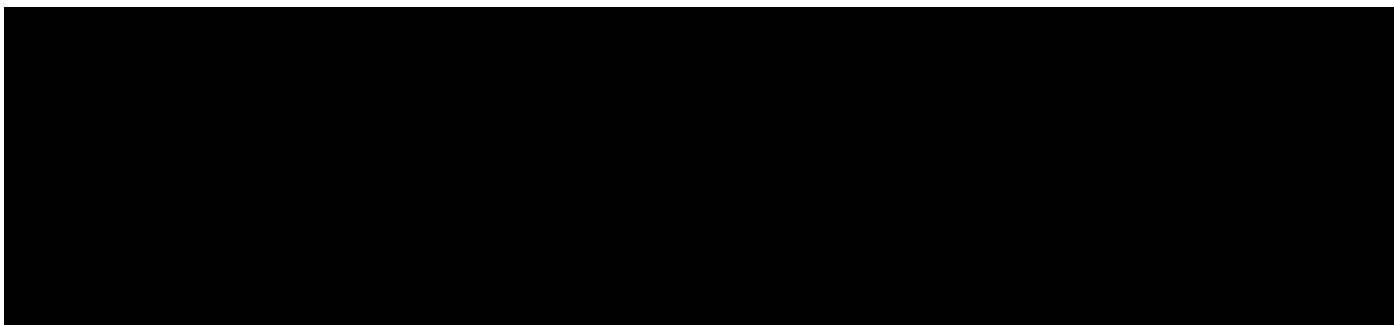
A daily welfare diary will be used to track the following phenotypic behaviors of the fish during the entire experiment: (i) lesion formation on the skin and/or raised scales, (ii) lethargy and (iii) consumption behavior.

The bacterial load derived from the immunosuppression and monitoring groups will be used to determine the rate of reactivation.

Phase 2

After setup of the model we expect to limit the number of time points required to measure the bacterial load and body weight. In phase 2 the antibiotic susceptibility of the selected [REDACTED] mutants. [REDACTED]

Figure 2. [REDACTED]



The following readouts will be determined during this experiment:

Bacterial load (endpoint measurement)

The bacterial load (†) will be determined [REDACTED]

[REDACTED] A total of 9 zebrafish will be used for these time points.

To estimate the reactivation, the bacterial load (†) will also be determined, however this requires 18 zebrafish per time point. During immunosuppression, bacterial load will be determined [REDACTED]

Loss of body weight

When disease develops, the fish will start to lose body weight. This measurement is required to determine the time of treatment as well as the reactivation of disease after treatment. Body weight (★) of the zebrafish will be measured prior bacterial load determination but also includes 6 more time points in the infection week. Nine randomly selected fish will be weighted and put back in tray afterwards for this 6 additional days. At intervention days, all fish undergoing intervention shall be weighed.

Clinical signs of illness

A daily welfare diary will be used to track the following phenotypic behaviors of the fish during the entire experiment: (i) lesion formation on the skin and/or raised scales, (ii) lethargy and (iii) consumption behavior.

The bacterial load derived from the immunosuppression and monitoring groups will be used to quantify

reactivation.

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

Every intervention (detailed below) will take place under full anesthesia to limit stress and pain. [REDACTED]

[REDACTED]

Interventions:

- 1x intra peritoneal injection with [REDACTED]
- [REDACTED] antibiotic treatment [REDACTED]
- [REDACTED] treatment with immunosuppressant [REDACTED]
- Body weight measurements will be performed before sacrifice for bacterial load determination. 6 additional time points will include body weight measurement only and will be performed directly after exposure to anesthetics.
- Sacrifice using ice bath and decapitation (see L), followed by isolation of the organs.

Analysis of clinical symptoms is not considered an intervention as the fish are only observed without disturbing their normal behavior.

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

Calculation:

Reactivation: Determine bacterial load for both wild-type *M. marinum* and the [REDACTED] mutant. Reactivation of *M. marinum* in adult zebrafish has previously been studied [REDACTED]

[REDACTED]

Bacterial load: In order to determine a difference of 50% between the mean of the number of bacteria per fish (100% for group 1 and 50% for group 2) (using a power of 80% and a confidence of 95%) we need 8 fish per group.

B. De dieren

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

Animal: Zebrafish (male and female, equally distributed)

Species: Danio rerio

Age: 9 months

Maximum number of required zebrafish:

Phase 1:

Five time points are selected for the determination of the bacterial load during infection and treatment. We need 8+1 zebrafish per group, thus $5 * 9 = 45$ zebrafish for the first part of the experiment (infection and treatment). In the second part (immunosuppression and monitoring) we expect reactivation to occur and calculated 16+2 zebrafish per group. We have 7 time points, thus $7*18 = 126$ zebrafish for the second part. A total of $45 + 126 = 171$ zebrafish is required per condition (wild type or mutant). In phase one we have a wild type and a [redacted] strain and therefore the total number of zebrafish required in phase 1 = $171*2 = 342$ zebrafish.

Phase 2:

We expect to obtain a maximum of 20 mutants [redacted]

We expect to decrease the number of time points required in phase 2 compared to phase 1. This because we know from phase 1 at which time reactivation sets in. Five time points are taken in the first part of the experiment (infection and treatment) thus $5*9$ zebrafish = 45 for the first part. The second part (immunosuppression and monitoring) holds 5 time points and required per time point 18 zebrafish, thus $5 * 18 = 90$ zebrafish. So per condition $45+90 = 135$ zebrafish are required.

We expect a maximum of 20 mutants to be tested. Because we do not want to test 20 mutants in one experiment, we have to split the groups. [redacted]

[redacted] Thus every group consists of 3 mutants * 135 zebrafish = 405 zebrafish. When we calculate for the maximum of mutants we need $20 * 135 = 2700$ zebrafish for this experiment. However, we expect to see a difference already within the first set of mutants and this would already show that [redacted] mutants are more susceptible to antibiotics. This would mean that we will not test all the mutants when we already see an effect in the first group.

Phase 1 and phase 2:

So we need a maximum of **3042** zebrafish for both experiments.

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.

Replacement:

The host immune system is required to suppress infection and induce persister formation of mycobacteria. These persisters withstand treatment and cause reactivation after withdrawal of treatment. This delicate co-existence is required to study antibiotic susceptibility measured as reactivation for the mutants. Therefore, it is not possible to test this antibiotic susceptibility *in vitro*.

Reduction:

Importantly, in this proposal the maximum number of zebrafish required to test 20 mutants is given.

However, the mutants will be tested in different rounds, [REDACTED] We expect to see a difference already within the first set of mutants, showing that [REDACTED] mutants are more susceptible to antibiotics. In this case, we will not test all the mutants. As a result, this would lead to a strong reduction in zebrafish required; 405 zebrafish will be used instead of 2295. Furthermore, by performing phase 1 in this experiment, we will be able to decrease the number of time points (less treatment time / less time points during monitor phase).

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
Furthermore, both male and female fish will be used in this experiment, and therefore less fish are lost during breeding. Also, fish selected for body weight measurement will subsequently be sacrificed for bacterial load determination. This means that one fish will provide information for two measurements and therefore less animals are required for this experiment

Refinement:

[REDACTED] When the results show that strong reduction of CFU is achieved in a shorter time, we will use this for experiment 2b. This will reduce the time of severe discomfort. [REDACTED]

[REDACTED] To reduce the stress and pain for the fish, multiple interventions will be performed at once. Body weight measurement will be combined with antibiotic treatment or immunosuppressant treatment. We will start treatment of the fish well before severe disease symptoms appear, reducing the discomfort of the animals. Finally, not all fish have to be weighed at every time point, limiting discomfort by reducing intervention.

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.

Every intervention is only performed when the fish are anesthetized. Furthermore the animals will be monitored for development of clinical symptoms. Once severe disease is observed, the animal will be sacrificed.

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.

The single components/steps required in this zebrafish [REDACTED] model have been published [REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]. However, combining the components in order to develop the [REDACTED] model in adult zebrafish has not been done before.

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

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.

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?

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.

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.

To prevent pain and stress, the fish receive anesthetics (MS-222) prior to injection or other interventions.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

The frequency of interventions are relatively high. First fish will be infected, such that they become infected with *M. marinum*. After onset of the infection an intense antibiotic treatment regimen will start to clear the infection. After treatment, the immune system will be suppressed to induce reactivation, making them vulnerable for disease again. This is an intense trajectory and therefore we try to limit distress as much as possible by the aforementioned reductions and refinements.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

The frequency of interventions.

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

We cannot change the frequency of interventions. We can limit damaging effects by adequate care of the zebrafish by professionals and the use of human endpoints such discomfort will be limited.

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.

A welfare diary will be used to track the following phenotypic behaviors of the fish during the entire experiment:

- (i) Lesion formation on the skin and raised scales. These are classical symptoms observed in an *M. marinum* infected fish that develops disease.
- (ii) Lethargy. When disease develops, the zebrafish will either remain on the bottom of the tank or float to the top.
- (iii) Consumption behavior. When disease develops, the zebrafish will consume less.

Human endpoints are based on these three measurements. In case we observe clear change in behavior and/or lesion formation, we will sacrifice the zebrafish.

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

Fish will be treated before the onset of severe disease. However, after the end of treatment and immune suppression, reactivation is expected to occur. This includes the groups that are used to determine reactivation. After reactivation, it takes time to develop severe disease. Therefore upon start of immunosuppression we expect development of severe disease. So if we assume all fish to show reactivation, we estimate that in phase 1, 73.7% of the zebrafish will develop severe disease. For phase 2, this accounts for 75% of the fish. [REDACTED].

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.

Experiment 2a.

All 342 zebrafish (100%) will receive anesthetics via a water bath prior 1x intraperitoneal injection of [REDACTED] = **mild discomfort**

All 342 zebrafish (100%) will receive anesthetics via a water bath prior body weight measurement and subsequent ice bath and decapitation to sacrifice the zebrafish = **mild discomfort**

108 zebrafish (31,6%) will receive anesthetics via a water bath prior weighing and put back in the tank = **mild discomfort**

324 zebrafish (94,74%) will receive anesthetics via a water bath prior [REDACTED] antibiotic treatment [REDACTED]

One time would be mild/moderate discomfort, however because of the frequency this intervention leads to **severe discomfort**.

252 zebrafish (73,7%) will receive treatment with immunosuppressant for a . The fish will not encounter any discomfort from this intervention directly, but due to the intervention will start to develop disease symptoms, this will therefore be **moderate discomfort**. To prevent further discomfort, we will sacrifice fish when we observe clinical symptoms (human endpoints, as described in part J).

5,26% of the zebrafish = mild discomfort
94,74% of the zebrafish = severe discomfort

Experiment 2b

All 2700 zebrafish (100%) will receive anesthetics via a water bath prior 1x intraperitoneal injection of = **mild discomfort**

All 2700 zebrafish (100%) will receive anesthetics via a water bath prior body weight measurement and subsequent ice bath and decapitation to sacrifice the zebrafish = **mild discomfort**

1080 zebrafish (40%) will receive anesthetics via a water bath prior weighing and put back in the tank = **mild discomfort**

2520 zebrafish (93,33%) will receive anesthetics via a water bath prior antibiotic treatment . One time would be mild/moderate discomfort, however because of the frequency this intervention leads to **severe discomfort**. Importantly, this treatment time period will be shortened when experiment 2a shows that strong bacterial load reduction is observed before the end of of treatment. This reduces the time of severe discomfort in this group of zebrafish.

1800 zebrafish (66,66%) will receive treatment with immunosuppressant . The fish will not encounter any discomfort from this intervention directly, but due to the intervention will start to develop disease symptoms, this will therefore be **moderate discomfort**. To prevent further discomfort, we will sacrifice fish when we observe clinical symptoms (human endpoints, as described in part J).

6,66% of the zebrafish = mild discomfort
93,33% of the zebrafish = severe discomfort

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.

To be able to measure the bacterial load we need to isolate organs from the animals

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

The zebrafish will be sacrificed using ice bath followed by decapitation. Although this method is not formally approved yet, the IvD VU/VUmc has been informed that a general exemption is in preparation and the NVWA inspectorate will accept this method already.

Ja

Format DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer:
NVWA nummer 11400
2. Titel van het project:
The role of mycobacterial lipid bodies in antibiotic tolerance, towards better understanding of persistent Mycobacterium tuberculosis
3. Titel van de NTS:
De rol van mycobacteriële vetbolletjes in antibiotica tolerantie, voor een beter begrip van persistente Mycobacterium tuberculosis
4. Type aanvraag:
Nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: *Vrije Universiteit Amsterdam / VU medisch centrum*
 - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
 - e-mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: *11-10-2016*
 - aanvraag compleet: *11-10-2016*
 - in vergadering besproken: *08-11-2016*
 - anderszins behandeld: *n.v.t.*
 - termijnonderbreking(en) van / tot: *n.v.t.*
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen: *n.v.t.*
 - aanpassing aanvraag: *25-11-2016*
 - advies aan CCD: *22-12-2016*
7. Afstemming IvD
 - Datum advies IvD: *11-10-2016*
 - Strekking advies IvD: *De IvD geeft aan dat de aanvrager het project met de IvD heeft afgestemd en dat deze de instemming heeft van de IvD.*
8. Eventueel horen van aanvrager: *n.v.t.*
9. Correspondentie met de aanvrager

Vraagronde 1

- Datum: *10-11-2016*
- Strekking gestelde vragen: *De DEC vindt het een duidelijk en heldere aanvraag. De NTS moet tekstueel nog worden aangepast. De DEC heeft graag extra uitleg bij de hoeveelheid dieren, de duur van het ernstige ongerief en de humane eindpunten.*
- Datum antwoord: *25-11-2016*
- Strekking van de antwoord(en): *De gevraagde aanpassingen zijn doorgevoerd en de benodigde toelichting is gegeven.*

- De antwoorden hebben wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag: *Ja, de antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.*

10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC) : *n.v.t.*

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. *Is het project vergunning plichtig. Het omvat dierproeven in de zin der wet.*
2. *De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.*
3. *De DEC is competent om over deze projectvergunningaanvraag te adviseren. De benodigde expertise op dit wetenschappelijk terrein is aanwezig binnen de DEC.*
4. Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom. *N.v.t*

C. Beoordeling (inhoud)

1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft (*Zie handreiking 'Invulling definitie project'; zie bijlage I voor toelichting en voorbeeld.*)

Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. De subdoelen zijn allemaal noodzakelijk om de doelstelling te behalen. Het is niet mogelijk de individuele doelen afzonderlijk te toetsen, omdat er sprake is van onderlinge afhankelijkheid. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft duidelijk de go/ no go momenten beschreven. De DEC is er daardoor van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

2. Geef aan of er aspecten in deze aanvraag zijn die niet in overeenstemming zijn met wet- en regelgeving anders dan de Wod?: *n.v.t.*
3. *De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën fundamenteel en toegepast onderzoek zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling. De doelstelling is helder omschreven.*

Belangen en waarden

4. *Het directe doel van deze studie is het onderzoeken van de rol van mycobacteriële vetbolletjes in antibiotica tolerantie bij zebravissen, voor een beter begrip van persistente Mycobacterium tuberculosis (tuberculose).*

Het uiteindelijke doel van de studie is deze kennis te gebruiken voor de ontwikkeling van nieuwe effectievere medicijnen tegen tuberculose. Hierdoor kan de duur van de tuberculose behandeling worden verkort en kunnen patiënten met tuberculose beter en sneller worden geholpen.

Het betreft hier fundamenteel en toegepast onderzoek. Er is een reële relatie tussen deze beide doelstellingen. Het directe doel is nodig om het uiteindelijke doel in de toekomst te bereiken.

5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden.

De belangrijkste belanghebbenden in dit project dat gericht is op de ontwikkeling van nieuwe medicijnen voor de behandeling van tuberculose: de proefdieren, de onderzoekers en de patiënten.

De waarden die voor proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal worden aangetast omdat de dieren ingrepen ondergaan en omdat de dieren worden gedood. De waarde van deze proef voor onderzoekers is: Het vergroten van de wetenschappelijke kennis. Waarden die voor patiënten bevorderd worden: Het ontwikkelen van een effectievere behandeling tegen tuberculose. Hierdoor zal het welzijn van de patiënten en hun kwaliteit van leven verbeteren. Bovendien is antibiotica resistentie is een maatschappelijk probleem dat moet worden behandeld.

6. Geef aan of er sprake kan zijn van substantiële milieueffecten: *n.v.t.*

Proefopzet en haalbaarheid

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn.

Naar de overtuiging van de DEC beschikt de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen om de projectdoelstelling met de gekozen strategie/aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren.

Alle technische voorzieningen die benodigd zijn voor uitvoering van het project zijn voorhanden, evenals voldoende deskundigheid en financiering om het project succesvol uit te voeren. Ervaring binnen het onderzoeksinstituut met vergelijkbaar onderzoek waarborgt het technisch succesvol uitvoeren van de dierexperimenten. Bovendien wordt er nauw samengewerkt met de academische wereld en andere instituten actief binnen dit onderzoeksveld.

8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.

De aanvraag heeft een navolgbare opbouw en is naar de mening van de DEC goed opgezet. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en helder en sluiten aan bij de aangegeven doelstellingen. De DEC acht het reëel om te veronderstellen dat op basis van de resultaten van de voorgenomen reeks experimenten beschreven in het project, nieuwe en/of aanvullende kennis zal worden verkregen. De nieuw verkregen inzichten kunnen op termijn bijdragen aan het beschikbaar komen van een behandeling voor tuberculose. De gevraagde looptijd van 5 jaar acht de DEC reëel, gezien de beschrijving van de verschillende subonderdelen van het onderzoek.

Welzijn dieren

9. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren: *n.v.t.*

Alle dieren worden gefokt voor het gebruik in dierproeven, er is geen sprake van hergebruik. Er is geen sprake van bedreigde diersoorten, niet-menselijke primaten, zwerfdieren en/of dieren in/uit het wild. De locatie is binnen de instelling van de vergunninghouder. De dieren krijgen adequate verdoving en pijnbestrijding. De zebravissen zullen worden gedood door de dieren op ijs te koelen

en daarna te decapiteren. De IvD heeft vernomen dat de NVWA dit accepteert als geldige methode en dat er binnenkort een algemene vrijstelling voor deze dodingsmethode volgt.

10. *De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de richtlijn.*

11. *Beoordeel of het ongerief als gevolg van de dierproeven realistisch is ingeschat en geclassificeerd.*

Het ongerief als gevolg van de dierproeven is naar de mening van de DEC door de aanvragers realistisch ingeschat en geclassificeerd.

Het onderzoek bestaat uit 2 experimenten. In experiment 1 wordt licht ongerief verwacht als gevolg van injectie (bij ongeveer 39% van de zebravissen). Een groot deel van de zebravissen (ongeveer 62%) zal ziekte symptomen vertonen, de ontwikkeling van de ziekte wordt ingeschat als matig ongerief. De humane eindpunten zullen worden toegepast om ernstig ongerief te voorkomen. In experiment 2 wordt licht ongerief verwacht als gevolg van injecties. Een groot deel van de zebravissen (ongeveer 64%) zal ziekte symptomen vertonen, de ontwikkeling van de ziekte wordt ingeschat als matig ongerief. Daarnaast wordt bij de meeste zebravissen (ongeveer 94%) ernstig ongerief verwacht, dit komt door de frequentie van het toedienen van medicatie om de tuberculose te verminderen.

12. *Geef aan op welke wijze de integriteit van de dieren wordt aangetast*

De integriteit van de dieren zal worden aangetast omdat de dieren injecties en medicatie krijgen toegediend. Daarnaast zullen de meeste dieren ziekte verschijnselen van tuberculose vertonen.

13. *Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken.*

De criteria voor humane eindpunten zijn goed gedefinieerd. De humane eindpunten zullen worden toegepast, wanneer er duidelijke veranderingen in het gedrag plaatsvinden en/of laesie vorming optreedt.

3V's

14. *Het project is in overeenstemming met de vereisten ten aanzien van de vervanging van dierproeven. Het gebruik van proefdiervrije methoden of minder complexe diersoorten is volgens de DEC niet mogelijk.*

Voorafgaand is er in celkweek onderzoek gedaan naar de bacteriestam die tuberculose veroorzaakt in vissen. Voor deze studie op het gebied van tuberculose is een intact immuunsysteem is nodig om de bacteriële virulentie te testen. Een re-activatie vindt alleen plaats in een volwaardig werkend immuunsysteem, daarom is het gebruik van proefdieren noodzakelijk.

*De keuze voor het gebruik van zebravissen is naar het oordeel van de DEC gerechtvaardigd. In vissen ontwikkeld tuberculose zich op een gelijkwaardige wijze als in de mens. De bacteriestam die men gebruikt in de vissen is minder schadelijk waardoor het veilig is om mee te werken. Daarbij is de infectieduur van deze bacteriestam een stuk korter dan die van *M. tuberculosis*, de bacterie die tuberculose veroorzaakt in de mens, waardoor men sneller tot een antwoord op de*

gestelde vragen kan komen. Bovendien is de zebravis de laagst mogelijke vertebraat waarbij tuberculose onderzoek mogelijk is.

15. *In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de vermindering van dierproeven.*

Door gebruik te maken van het gefaseerd uitvoeren van de experimenten en een poweranalyse wordt voorkomen dat er teveel of te weinig dieren worden gebruikt. In dit model wordt de re-activatie versneld, wat zorgt voor minder tijdspunten om te meten en dus ook minder vissen. Verder worden er uit 1 dier meerdere gegevens gehaald, waardoor er minder dieren nodig zijn. Op basis van eerder verkregen data hebben de onderzoekers een zorgvuldige schatting kunnen maken voor de hoeveelheid vissen die noodzakelijk is om tot een correcte conclusie te komen.

Het maximale aantal proefdieren is proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd. De DEC onderschrijft dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 6066 zebravissen en acht dit aantal realistisch onderbouwd. Onnodige duplicatie van experimenten wordt voorkomen doordat de onderzoekers goed bekend zijn met het onderzoeksveld en samenwerken met de andere onderzoeksgroepen die vergelijkbaar onderzoek verrichten.

16. *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.*

Passende anesthesie en pijnbestrijding zal de gevolgen van de ingrepen minimaliseren. De vissen worden verdoofd voordat ze een ingreep zullen ondergaan.

17. *Beoordeel, indien het wettelijk vereist onderzoek betreft, of voldoende aannemelijk is gemaakt dat er geen duplicatie plaats zal vinden en of de aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om tijdens de uitvoering van het project te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt: n.v.t.*

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. *Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd? Geef ook aan welke maatregelen verder zijn getroffen om bij fok of aankoop van dieren het aantal in voorraad gedood te beperken.*

Men zal gebruik maken van zowel vrouwelijke als mannelijke zebravissen.

19. *Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef).*

De dieren worden gedood om de bacterieload in de organen te kunnen meten. De zebravissen zullen worden gedood door de dieren op ijs te koelen en daarna te decapiteren. De IvD heeft vernomen dat de NVWA dit accepteert als geldige methode en dat er binnenkort een algemene vrijstelling voor deze dodingsmethode volgt.

20. *Indien dieren worden gedood, is adoptie of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is.*

Dit is niet mogelijk omdat er een post-mortem analyse nodig is om de benodigde data te verkrijgen.

NTS

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

D. Ethische afweging

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

Rechtvaardigen de doeleinden van dit project het voorgestelde gebruik van de dieren?

Bij deze dierproef is de centrale morele vraag:

Rechtvaardigt het verkrijgen van kennis over de rol van mycobacteriële vetbolletjes in antibiotica tolerantie en daarmee de ontwikkeling van nieuwe effectievere medicijnen tegen tuberculose het gebruik van 6066 zebnavissen in de dierproef die daarvan maximaal ernstig ongerief ondervinden?

2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn ten opzichte van elkaar af.

De waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de proefdieren wordt aangetast en een groot aantal dieren ondervindt ernstig ongerief. Dat leidt tot veel nadeel voor deze proefdieren. De waarden voor de onderzoekers: veel voordeel vanwege de kennisontwikkeling. De waarden die voor de patiënten bevorderd worden: Mogelijk veel voordeel op de langere termijn, wanneer de dierproef bijdraagt aan het ter beschikking komen effectievere medicijnen tegen tuberculose.

De DEC is van mening dat de kennisontwikkeling en lange termijn belangen van de patiënten in dit project zwaarder wegen dan de belangen van de 6066 zebnavissen die hiervoor als proefdieren gebruikt worden. Er sterven jaarlijks nog steeds meer dan een miljoen mensen aan de ziekte tuberculose, er zijn antibiotica beschikbaar, maar de behandeling duurt bijzonder lang en er is sprake van de ontwikkeling van antibiotica resistentie. Voor de ontwikkeling van een effectievere en kortere behandeling van tuberculose is onderzoek in diermodellen noodzakelijk. Er zijn op dit moment geen alternatieven voor deze dierproeven beschikbaar waarmee men de doelstellingen kan bereiken.

3. Beantwoord de centrale morele vraag. Maak voor het beantwoorden van deze vraag gebruik van bovenstaande afweging van morele waarden. Maak daarnaast gebruik van de volgende moreel relevante feiten: belang onderzoek (C4), kennis en kunde van betrokkenen (C7), haalbaarheid doelstellingen (C8), categorieën en herkomst dieren (C9), 3V's (C14-C18), ongerief (C10-13 en C19) en relevante wet en regelgeving (C2).

Volgens de DEC rechtvaardigen de doeleinden van dit project het voorgestelde gebruik van dieren. Het doel van deze studie is kennis te verkrijgen over de rol van mycobacteriële vetbolletjes in antibiotica tolerantie. Het verwachte resultaat, in het kader van het beschikbaar komen van een adequate behandeling tegen tuberculose, is afgewogen tegen het, als maximaal ernstig geschatte ongerief en de aantasting van integriteit, inclusief het doden van de dieren in de proef.

De DEC onderschrijft dat de doelstellingen niet zonder het gebruik van proefdieren kunnen worden behaald en acht het gebruik van maximaal 6066 zebnavissen en de daarmee samenhangende schade

aan deze dieren gerechtvaardigd. Bij het uitvoeren van de dierproeven wordt een adequate invulling gegeven aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en verfijning van de dierproeven. Het project is (1) van substantieel belang en (2) van goede kwaliteit.

(1) Het maatschappelijk en wetenschappelijk belang wordt door de DEC ingeschat als substantieel. De resultaten van dit onderzoek zullen informatie geven over de rol van mycobacteriële vetbolletjes en zullen bijdragen aan het beschikbaar komen van een effectievere behandeling van tuberculose.

(2) De DEC is van mening dat dit project verantwoord is vanuit wetenschappelijk oogpunt en acht het waarschijnlijk dat op basis van de resultaten van de voorgenomen reeks experimenten beschreven in het project, nieuwe en/of aanvullende kennis zal worden verkregen. De onderzoekers beschikken over ruime ervaring en kennis op het gebied van de te gebruiken methoden en werken nauw samen met andere onderzoeksgroepen. Dit in combinatie met de beschikbare faciliteiten en infrastructuur betekent dat de onderzoekers goed gekwalificeerd en geoutilleerd zijn voor het uitvoeren van het in dit project beschreven onderzoek.

Samenvattend kan worden gesteld dat het als substantieel te kwalificeren maatschappelijk en wetenschappelijk belang van het onderzoek naar het oordeel van de DEC opweegt tegen het gebruik van maximaal 6066 zebrafissen en het daarbij verwachte maximaal ernstige ongerief.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

2. Het uitgebrachte advies kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt in de DEC.

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

3. Omschrijf de knelpunten/dilemma's die naar voren zijn gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies zowel binnen als buiten de context van het project (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.B*).

Het dilemma is dat een groot aantal dieren wordt gebruikt met ernstig ongerief bij experiment 2. Echter zijn zowel het wetenschappelijk als maatschappelijk belang erg groot, hierdoor wegen de belangen op tegen de kosten.

Als blijkt dat vetbolletjes daadwerkelijk een belangrijke rol spelen in de vorming van persisters en betrokken zijn bij antibiotica gevoeligheid, dan kunnen de onderzoekers dit proces gebruiken voor de ontwikkeling van nieuwe medicijnen tegen tuberculose. Er sterven jaarlijks nog steeds meer dan een miljoen mensen aan de ziekte tuberculose, er zijn antibiotica beschikbaar, maar de behandeling duurt bijzonder lang en er is sprake van de ontwikkeling van antibiotica resistentie. Een effectievere en kortere behandeling van tuberculose is dus zeer gewenst.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUmc) te
Amsterdam

AMSTERDAM

**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD114002016803

Bijlagen

2

Datum 23 december 2016

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 22 december 2016. Het gaat om uw project "The role of mycobacterial lipid bodies in antibiotic tolerance, towards better understanding of persistent Mycobacterium tuberculosis". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD114002016803. 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. U ontvangt binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. Als wij nog informatie van u 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 voldoen, 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).

Datum:

23 december 2016

Aanvraagnummer:

AVD114002016803

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
23 december 2016
Aanvraagnummer:
AVD114002016803

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 11400
Naam instelling of organisatie: Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUmc) te Amsterdam
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 64156338
Straat en huisnummer: de Boelelaan 1117
Postcode en plaats: 1081 HV AMSTERDAM

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Datum:
23 december 2016
Aanvraagnummer:
AVD114002016803

Gegevens gemachtigde

BSN: [REDACTED]
Naam: [REDACTED]
Adres: [REDACTED]
Postcode en plaats: [REDACTED] AMSTERDAM
Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Nee

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 januari 2018
Geplande einddatum: 1 januari 2023
Titel project: The role of mycobacterial lipid bodies in antibiotic tolerance, towards better understanding of persistent Mycobacterium tuberculosis
Titel niet-technische samenvatting: De rol van mycobacteriele vetbolletjes in antibiotica tolerantie, vor een beter begrip van persistente Mycobacterium tuberculosis
Naam DEC: DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum
Postadres DEC: [REDACTED] Amsterdam | Nederland
E-mailadres DEC: [REDACTED]

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1.187,-
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: [REDACTED]
Plaats: Amsterdam
Datum: 22 december 2016

Datum:
23 december 2016
Aanvraagnummer:
AVD114002016803



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

VU medisch centrum
t.a.v. crediteuren administratie, [REDACTED]
Postbus 7057
1007 MB AMSTERDAM
[REDACTED]

**Centrale Commissie
Dierproeven**
Postbus 20401
2500 EK Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD114002016803
Bijlagen
2

Datum 23 december 2016
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 23 december 2016
Vervaldatum: 22 januari 2017
Factuurnummer: [REDACTED]
Ordernummer: [REDACTED]

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD114002016803	€ 1.187,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL29INGB 070.500.1512 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93144, 2509 AC te 's Gravenhage.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUmc) te
Amsterdam

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED] AMSTERDAM
[REDACTED]

**Centrale Commissie
Dierproeven**
Postbus 20401
2500 EK Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD114002016803
Bijlagen
1

Datum 20 februari 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 22 december 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "The role of mycobacterial lipid bodies in antibiotic tolerance, towards better understanding of persistent Mycobacterium tuberculosis" met aanvraagnummer AVD114002016803. 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). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning.

Met het oog op artikel 10a, lid 1, zijn er algemene voorwaarden gesteld.

U kunt met uw project "The role of mycobacterial lipid bodies in antibiotic tolerance, towards better understanding of persistent Mycobacterium tuberculosis" starten. De vergunning wordt afgegeven van 20 februari 2017 tot en met 1 januari 2023.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Beoordeling achteraf

Na afloop van het project zal er een beoordeling plaatsvinden, zoals bedoeld in artikel 10a1, lid 1d en lid 3, in de wet. Meer informatie over de eisen bij een beoordeling achteraf vindt u in de bijlage.

Een beoordeling achteraf is noodzakelijk in verband met ernstig ongerief.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum gevoegd. Dit advies is opgesteld op 22 december 2016. 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. Dit advies van de commissie nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

Datum:

20 februari 2017

Aanvraagnummer:

AVD114002016803

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.centralecommissiedierproeven.nl. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

Datum:
20 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD114002016803

ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

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: Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUmc) te Amsterdam
Adres: de Boelelaan 1117
Postcode en plaats: 1081 HV AMSTERDAM
Deelnemersnummer: 11400

deze projectvergunning voor het tijdvak 20 februari 2017 tot en met 1 januari 2023, voor het project "The role of mycobacterial lipid bodies in antibiotic tolerance, towards better understanding of persistent Mycobacterium tuberculosis" met aanvraagnummer AVD114002016803, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 22 december 2016
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 22 december 2016;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 22 december 2016;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 22 december 2016, ontvangen op 22 december 2016.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
M. marinum virulence screening in adult zebrafish				
	Zebravissen (Danio rerio) / onbekend	3.024	61% Matig 39% Licht	
Antibiotic susceptibility testing using the Cornell zebrafish model of tuberculosis				
	Zebravissen (Danio rerio) /	3.042	95% Ernstig 5% Licht	

Aanvraagnummer:

AVD114002016803

Voorwaarden

Op grond van artikel 10a1 lid 2 van de Wet op de dierproeven zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet en wordt daarom voorzien van beoordeling achteraf. Deze beoordeling zal uiterlijk april 2023 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 de dierproeven conform de vergunning waren.

De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat go/no go momenten worden afgestemd met de IVD.

In artikel 10, lid 1 sub a 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 afstemming met de IVD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarde wijzigen of intrekken.



Aanvraagnummer:
AVD114002016803

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 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

Aanvraagnummer:
AVD114002016803

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 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 13d 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 13c 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.



Aanvraag Projectvergunning Dierproeven

Administratieve gegevens

- U bent van plan om één of meerdere dierproeven uit te voeren.
- Met dit formulier vraagt u een vergunning aan voor het project dat u wilt uitvoeren. Of u geeft aan wat u in het vergunde project wilt wijzigen.
- Meer informatie over de voorwaarden vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl of in de toelichting op de website.
- Of 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	11500
		<input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen	
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	UMC Utrecht
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]
		KvK-nummer	30244197
		Straat en huisnummer	Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht
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>	Postbus	12007
		Postcode en plaats	3501AA Utrecht
		IBAN	NL27INGB0000425267
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Utrecht
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED] <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	PhD student
		Afdeling	[REDACTED]
		Telefoonnummer	[REDACTED]
		E-mailadres	[REDACTED]
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(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 | <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 | 1 - 1 - 2017 |
| Einddatum | 1 - 1 - 2022 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Animal study to test spring based induction and reduction of spinal deformities
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Dierstudie om de inductie en reductie van groei-afwijkingen van de rug te onderzoeken met veerkrachten.
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|-------------------------------|
| Naam DEC | DEC Utrecht |
| Postadres | Postbus 85500 3508 GA Utrecht |
| E-mailadres | dec-utrecht@umcutrecht.nl |

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 935 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	Utrecht
Datum	19-12-2016
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.

Spinal deformity is a broad diagnostic classification that corresponds to an abnormal configuration of the spine in four possible directions: kyphosis, lordosis, lateral flexion deformity and rotation deformity. Combination of these abnormal configurations may be present in any spinal deformity. The spinal deformity can have different etiologic causes including congenital, neuromuscular and idiopathic. Often central to these spinal deformities is scoliosis, a complex three-dimensional spinal deviation that results in an abnormal spinal curve on plain x-rays. Idiopathic scoliosis is the largest group of spinal deformity and presents as a progressive torsional and lateral deformation of the spine in the growing child of unknown origin. This deformation is observed in about 5% of children. In about 0.5% of the children with a spinal deformation, medical attention is needed. In about 0.1% of children with a spinal curve of more than 10 degrees, the deformation becomes so severe that it needs surgical treatment (Konieczny et al., 2013). Left untreated in severe cases, the spinal deformity will continuously progress. This will eventually lead to a severe debilitating deformity, cardiopulmonary disease and early mortality (Pehrsson et al., 1992). In the previous decade, severe spinal deformities were treated with early fusion of the spine during childhood in order to stop progression of the curve (Dimeglio et al., 2012). Fusion consisted of reducing the spinal curve with metal rods connected to multiple spinal vertebrae. Fusion of the spine inhibits growth of the individual vertebrae and stops the overall thoracic growth. Problems with lung function and restrictive pulmonary disease occur in a substantial number of children with reduced thoracic growth (Karol, 2011). Posterior fusion of the spine during growth also causes a crankshaft problem; the vertebrae fuse posteriorly but continue to grow anteriorly (Dubousset et al., 1989). This crankshaft problem causes increased spinal torsion and leads to an increase of the spinal curve. The crankshaft problem will eventually result in material failure. In the previous decade several growth preserving techniques have been developed to combat this problem and control the spinal deformity, preserve growth and promote lung maturation (Tis et al., 2012).

Growing rods are currently used as a growth preserving technique for juvenile patients with spinal deformity in our clinic. Metal rods are connected to the spine with screws that are placed in the vertebrae. The juvenile patient has to be operated every 6 months after the initial implantation of the metal rods. The patient undergoes surgery to lengthen the rod-screw construct in the spine to allow for growth; an elongation surgery. These bi-annual surgical elongations are needed in order to prevent joint fusion of the spine, allow growth of the spine and prevent crank shafting (Akbarnia et al., 2008; Cahill et al., 2010). Therefore, the major drawback of growing rods are the multiple surgeries needed for a successful treatment and thus the increased infection risk. Moreover, the growth achieved per subsequent elongation decreases, lowering the effectiveness of the operations over time (Sankar et al., 2011). Other techniques were developed to obviate the need of re-operations and guide the spine. However, these growth guidance techniques showed a very high rate of auto-fusion of the spine, indicating the need for an active distraction force during treatment to reduce auto-fusion (Mardjetko et al., 1992; Fisk et al., 1995). Therefore, the previous decade a search began for a new single surgery spinal correction implant that retains spinal mobility and stimulates spinal growth. While new techniques were developed, they have unpredictable lengthening capacity, have a limited applicability due to their design, require advanced surgical experience and have a high frequency of reoperations (Campbell et al., 2004; Akbarnia et al., 2005; Cheung et al., 2012; McCarthy et al., 2014; Ouellet et al., 2011). Lastly, these techniques can in most cases not correct a spinal deformity to its original 3 dimensional alignment.

New and better devices are needed to treat spinal deformities in children. Therefore, a new spring-based non-fusion correction system was developed by the University of Twente. An animal study in pigs was done to test this spring-based non-fusion scoliosis correction system (Wessels et al., 2016). This spring-based design applied a continuous torque to the spine. Furthermore, this device allows passive longitudinal growth of the spine due to an integrated gliding mechanism. This device showed that it was capable of inducing spinal deformation without inhibiting growth of the spine and without fusion of the vertebrae. All implants remained functional, all animals reached their respective endpoints and no serious complications occurred during the experiment. The systems caused only moderate degeneration of the facet joints (especially at the instrumented ones) and some debris was found in surrounding tissue (Wessels et al., 2016).

Current scoliotic deformities are characterized by axial rotation, lateral deviation and anterior lengthening of the spine. Therefore, reducing the spinal deformity requires a torque and a growth stimulation to the posterior side of the spine. While the non-fusion system from Twente delivers a torque, a posterior distraction force is missing. Therefore, the UMC Utrecht and University of Twente realised an improved spring-based non fusion correction system with a combination of a torsional spring and a distraction spring.

The torsional and distraction springs need to be tested first on animals to study the effect on the spine during implantation. There are no vertebrates except humans that develop a scoliotic spinal deformity naturally. Therefore, the springs are first implanted and loaded in such a way that they *induce* a scoliotic spinal deformity in animals. After induction, a comparable system is implanted with a second surgery to *reduce* the scoliotic spinal deformity. The evaluation will be based on the degree of lateral curvature reduction after the second surgery. Please refer to the appendix for in-depth visuals and explanation on how the springs will be implemented (e.g. fig 2.). The optimal forces of the springs were selected based on extensive previous research by the University of Twente. All materials for the spring-based design have previously been used in orthopedic implants. If the forces of the springs, the force translation to the spine and biocompatibility after the first animal study are not deemed optimal, a new version of the spring-based non-fusion system needs to be tested. This will continue until the spring-based system is deemed optimal on all three points. We deem it feasible to test a maximum of 4 versions of the spring-based system in a time frame of 5 years. During the testing of the springs we will implant small springs intra-muscular to investigate the biocompatibility. We will use fluorochrome injections and CT's scans to investigate bone remodeling. Please refer to the appendix for an in depth explanation on the intra-muscular springs and the use of the fluorochrome injections.

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?

Objective and research questions

The main objective is to analyze the functioning of the spring-based systems on spinal deformity induction and reduction. Following the main objective, our research question is the following; How much spinal deformity reduction can be achieved with a spring-based non fusion system? From previous animal research we know that a rotational spring-based non fusion system can successfully reduce a scoliotic spinal deformity (Wessels et al., 2016). We know from clinical studies in children that distraction based techniques can successfully reduce a scoliotic spinal deformity (Campbell et al., 2004; Akbarnia et al., 2005; Cheung et al., 2012). However, we do not know the amount of spinal curvature reduction with a combined torque and distraction force. Using a torque or distraction force has previously been deemed safe in animal studies (Wessels et al., 2016; Akbarnia et al., 2013). First inducing and reducing a spinal deformity is a safe and the preferred method for testing a spinal non-fusion system (Ouellet et al., 2012; Roth et al., 2013). Both the research teams of the UMC Utrecht and the University of Twente have extensive experience with animal studies, spinal surgery and non-fusion systems.

Other objectives

The other objective is to find new ways to improve possible new versions of the spring-based non fusion system. We will implant small springs intra-muscular to investigate potential small improvements (e.g. protective sleeves and delayed release systems) to the non-fusion system without the need to use new animals. Small springs are placed during the initial surgery with the same surgical incision. The small implants are placed far enough (> 2 cm) from the primary implant site that they will not interfere with the main objective. Another objective is to investigate the bone remodeling effects of the spring-based non fusion system. Therefore, we will use CT-scans and Fluorochrome injections to monitor bone remodelling and any spinal fusion. Fluorochrome injections have previously been implemented in animals successfully by one of the primary investigators of this project (Kruyt et al., 2008).

The remaining research questions are the following;

- How much spinal curvature during induction and reduction can be achieved by the implants?
- How much spinal rotation during induction and reduction can be achieved by the implants?
- How much growth during induction and reduction can be achieved by the implants?
- Does fusion of spine occur while using the implants?
- What are the soft tissue reactions on the implants?
- What is the remaining function of the springs after removal?
- What is the role of tissue ingrowth on the springs?
- What is the effect of protective measures on the functioning of the springs?

3.3 Relevance

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

Scientific relevance

This study will add to our current knowledge on the etiology of scoliotic spinal deformities. The current cause of idiopathic scoliosis is still unknown despite the extensive research already available. If a coupled rotational force and distraction force can produce comparable features to a scoliotic deformity in humans, this knowledge can be used for future etiology studies. The ability to reduce a spinal deformity with a spring-based non-fusion system in animals could also add to our knowledge on the treatment of spinal deformities. This study can further shift the spinal deformity treatments to non-fusion systems. Auto-fusion is a serious problem in the current treatment of spinal deformities. This study further allows us to improve our knowledge on bone-modulation and auto-fusion of the spine during surgical spinal deformity treatment and possible ways to prevent it.

Social relevance

The current standard care requires a bi-annual surgical adjustment of the implants to allow for spinal growth. A spring-based correction obviates the need of reoperations because it allows and stimulates spinal growth. The lack of reoperations has a direct impact on the physical and mental health of a child with a spinal deformity. The reduction of operations and consequently hospitalisations has a direct economic benefit for the patient and society. Using the springs for the spinal correction, outcomes of spinal deformity correction can be improved and complications reduced. Improving outcomes and reducing complications can result in health and economic benefits on a patient and a society level.

3.4 Research strategy

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

A spinal deformity induction-reduction animal model is the basis of the project. We will use the induction-reduction animal model to test different versions of a spring-based implant design. If the forces of the springs (e.g. not enough degree of spinal curvature reduction), the force translation to the spine (e.g. failure of the implant during testing) and biocompatibility (tissue reactions to the implant materials) after the first animal study are not deemed optimal, new animals are required to test a new version of the spring-based non-fusion system. This will continue until the spring-based system is deemed optimal. We deem it feasible to test a maximum of 4 versions of the spring-based system in a time frame of 5 years. During the testing of the spring-based non-fusion system, we will simultaneously test small springs intra-muscular. If the potential improvements (e.g. protective sleeves and delayed release systems) do not function properly, new versions of these small improvements will be tested in subsequent testing of the new versions of the spring-based non-fusion systems. During the testing of the spring-based non-fusion system, we will simultaneously look for bone-remodeling with fluorochrome injections. If the fluorochrome injections cannot provide a sufficient image for analysis of bone remodeling, the dosage and timing of the injections are changed during the subsequent testing of the new versions of the spring-based non-fusion systems. Please refer to the appendix for an in depth explanation on the intra-muscular springs and the use of the fluorochrome injections.

The same spinal deformity induction-reduction animal model will be used during the testing of every version. There will be no discernable differences in the grievance of the animals across the testing of the multiple versions of the spring-based implants.

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

A spinal deformity induction-reduction pig model will be used for every iteration of the spring-based implant. This model follows an established 4 step process to induce and reduce a spinal deformity in animals; induction surgery, induction phase, reduction surgery and reduction phase. The surgeries will not differ from the surgeries done in children and adhere to the same principles.

- Acclimatization for 1 week
- Pre-operative analgesic and general anaesthesia
- Induction surgery for placement of the induction springs
- Intramuscular placement of small springs
- Intra-operative fluorochrome injection
- Postoperative analgesic twice a day for 72 hours
- Post-operative monthly X-rays and CT's under sedation
- After spinal deformity induction, the pigs are selected for reduction surgery
- Pre-operative analgesic and general anaesthesia
- Reduction surgery for removal of induction springs and placement of reduction springs
- Intra-operative fluorochrome injection
- Postoperative analgesic twice a day for 72 hours
- Post-operative monthly X-rays and CT's under sedation
- Final intramuscular fluorochrome injection
- After spinal deformity reduction, the pigs are euthanised.
- The spring-based implants are removed and biomechanically examined.
- Intramuscular springs are removed
- The spines of the pigs are used for CT imaging and fluorochrome analysis

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.

Every version of the spring-based implant can be viewed as a different part of the project. It is essential to test different versions of the springs to find the optimal implementation for clinical application. If the forces of the springs, the force translation to the spine and biocompatibility of the spring-based implant after the first animal study are not deemed optimal, a new version of the spring-based non-fusion system is tested. If a new version is tested, the intramuscular springs and fluorochrome injections with CT's are automatically used again during the testing of the new version (Figure 1.).

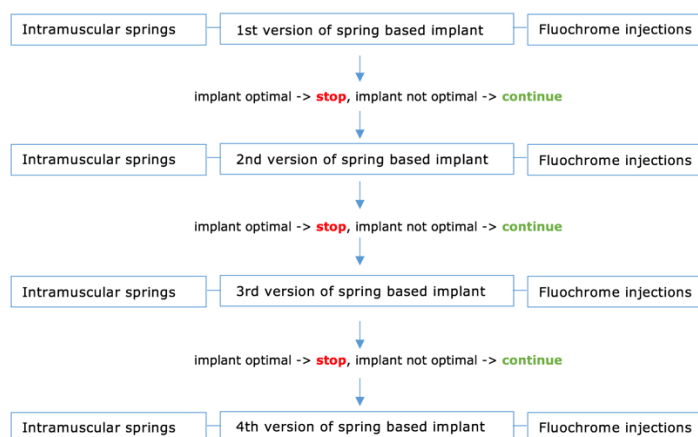


Figure 1. Flow-chart of the milestone and selection points

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	Animal study to test different versions of a spring-based spinal deformity induction and reduction.

References

- Akbarnia, B. A., Marks, D. S., Boachie-Adjei, O., Thompson, A. G., & Asher, M. A. (2005). Dual growing rod technique for the treatment of progressive early-onset scoliosis: a multicenter study. *Spine*, *30*(17S), S46-S57.
- Akbarnia, B. A., Breakwell, L. M., Marks, D. S., McCarthy, R. E., Thompson, A. G., Canale, S. K., ... & Growing Spine Study Group. (2008). Dual growing rod technique followed for three to eleven years until final fusion: the effect of frequency of lengthening. *Spine*, *33*(9), 984-990.
- Akbarnia, B. A., Mundis Jr, G. M., Salari, P., Yaszay, B., & Pawelek, J. B. (2012). Innovation in growing rod technique: a study of safety and efficacy of a magnetically controlled growing rod in a porcine model. *Spine*, *37*(13), 1109-1114.
- Cahill, P. J., Marvil, S., Cuddihy, L., Schutt, C., Idema, J., Clements, D. H., ... & Betz, R. R. (2010). Autofusion in the immature spine treated with growing rods. *Spine*, *35*(22), E1199-E1203.
- Campbell, R. M., Smith, M. D., Mayes, T. C., Mangos, J. A., Willey-Courand, D. B., Kose, N., ... & Surber, J. L. (2004). The effect of opening wedge thoracostomy on thoracic insufficiency syndrome associated with fused ribs and congenital scoliosis. *J Bone Joint Surg Am*, *86*(8), 1659-1674.
- Cheung, K. M. C., Cheung, J. P. Y., Samartzis, D., Mak, K. C., Wong, Y. W., Cheung, W. Y., ... & Luk, K. D. K. (2012). Magnetically controlled growing rods for severe spinal curvature in young children: a prospective case series. *The Lancet*, *379*(9830), 1967-1974.
- Dimeglio, A., & Canavese, F. (2012). The growing spine: how spinal deformities influence normal spine and thoracic cage growth. *European Spine Journal*, *21*(1), 64-70.
- Dubousset, J., Herring, J. A., & Shufflebarger, H. (1989). The crankshaft phenomenon. *Journal of Pediatric Orthopaedics*, *9*(5), 541-550.
- Fisk, J. R., Peterson, H. A., Laughlin, R., & Lutz, R. (1995). Spontaneous fusion in scoliosis after instrumentation without arthrodesis. *Journal of Pediatric Orthopaedics*, *15*(2), 182-hyhen.
- Karol, L. A. (2011). Early definitive spinal fusion in young children: what we have learned. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, *469*(5), 1323-1329.
- Konieczny, M. R., Senyurt, H., & Krauspe, R. (2013). Epidemiology of adolescent idiopathic scoliosis. *Journal of children's orthopaedics*, *7*(1), 3-9.
- Kruyt, M., De Bruijn, J., Rouwkema, J., van Blitterswijk, C., Oner, C., Verbout, A., & Dhert, W. (2008). Analysis of the dynamics of bone formation, effect of cell seeding density, and potential of allogeneic cells in cell-based bone tissue engineering in goats. *Tissue Engineering Part A*, *14*(6), 1081-1088.
- Mardjetko, S. M., Hammerberg, K. W., Lubicky, J. P., & Fister, J. S. (1992). Review of Nine Cases Requiring Revision. *Spine*, *17*(5), 582-589.
- McCarthy, R. E., Luhmann, S., Lenke, L., & McCullough, F. L. (2014). The Shilla growth guidance technique for early-onset spinal deformities at 2-year follow-up: a preliminary report. *Journal of Pediatric Orthopaedics*, *34*(1), 1-7.
- Ouellet, J. (2011). Surgical technique: modern Luque trolley, a self-growing rod technique. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, *469*(5), 1356-1367.
- Ouellet, J., & Odent, T. (2013). Animal models for scoliosis research: state of the art, current concepts and future perspective applications. *European Spine Journal*, *22*(2), 81-95.
- Roth, A. K., Bogie, R., Jacobs, E., Arts, J. J., & van Rhijn, L. W. (2013). Large animal models in fusionless scoliosis correction research: a literature review. *The Spine Journal*, *13*(6), 675-688.
- Pehrsson, K., Larsson, S., Oden, A., & Nachemson, A. (1992). Long-Term Follow-Up of Patients with Untreated Scoliosis A Study of Mortality, Causes of Death, and Symptoms. *Spine*, *17*(9), 1091-1096.
- Sankar, W. N., Skaggs, D. L., Yazici, M., Johnston, C. E., Shah, S. A., Javidan, P., ... & Akbarnia, B. A. (2011). Lengthening of dual growing rods and the law of diminishing returns. *Spine*, *36*(10), 806-809.
- Tis, J. E., Karlin, L. I., Akbarnia, B. A., Blakemore, L. C., Thompson, G. H., McCarthy, R. E., ... & Growing Spine Committee of the Scoliosis Research Society. (2012). Early onset scoliosis: modern treatment and results. *Journal of Pediatric Orthopaedics*, *32*(7), 647-657.
- Wessels, M., Hekman, E. E., Kruyt, M. C., Castelein, R. M., Homminga, J. J., & Verkerke, G. J. (2016). Spinal shape modulation in a porcine model by a highly flexible and extendable non-fusion implant



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'.
- 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 |
|--------------------------------|---|
| <input type="text" value="1"/> | <input type="text" value="Animal study to test spring based induction and reduction of spinal deformities."/> |
- 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.

General design

A spring based non-fusion system need to be tested on animals first to study the effect on the spine during implantation. There are no vertebrates except humans that develop a scoliotic spinal deformity naturally. Therefore, a spinal deformity has to be induced in animals before it can be reduced with a spring based non-fusion system. A scoliosis porcine model has previously successfully been used to induce and reduce a scoliosis.(Ouellet et al., 2012; Roth et al., 2013). An established 4 step process will be followed to induce and reduce a spinal deformity; induction surgery, induction phase, reduction surgery and reduction phase. First, induction springs will be fixated to the spine during surgery to induce a scoliotic spinal deformity. The animals are followed until a sufficient curvature develops (>15 degrees) in the spine. This sufficient curvature is based on the definition of a scoliosis. The animals are then selected for a reduction surgery. The induction springs are switched out with reduction springs during the reduction surgery. After the reduction surgery, the animals are followed until the spinal curvature is sufficiently reduced (>5 degrees). 23 animals will be used per version of the spring-based non fusion system. This will include 3 animals per version for testing purposes and confirmation that the implant fits and works. 20 animals per version will be used for the experimental set-up for the induction and reduction of a spinal deformity with a spring based implant.

Primary outcome

Our primary outcome the amount of spinal curvature reduction on imaging after reduction surgery. This outcome is also used in humans after surgical spinal deformity treatment. This primary outcome can help us improve the designs of the springs and answer questions about the etiology and progression of spinal

deformities.(Fig 1.). The sufficient induction curvature (>15 degrees) is based on the definition of a scoliotic spinal deformity. A scoliotic spinal deformity is defined as a curvature of 10 degrees or more on AP x-rays. A clinical significant reduction is when more than 5 degrees has changed between curves. Therefore, we used >15 degrees and more than 5 degrees as cut-of points for induction and reduction in our analysis. In humans has been shown that the time it takes to develop a scoliotic deformity differs between individual humans. The same happens in animals. If we induce a scoliotic deformity in animals and wait a fixed time, some animals will have developed a scoliotic deformity by that time and some do not. By using cut-of points, we can use all the animals for reduction surgery rather than using some of the animals. We do not expect that our endpoint is influenced by the different scoliosis induction times of the animals.

Porcine model

Numerous animal models for scoliosis models currently exist. The major drawback of all these models is the use of quadruped animals compared to a bipedal human for the investigation of scoliosis. In animals the spine is horizontal and in humans vertical. However, the forces on the the quadruped spine are quite similar to a human spine despite it's orientation. In animals, muscles and ligaments are needed to control the posture of a quadruped spine. As a consequence, the forces on the spine are mainly axial and comparable to humans.(Smit et al., 2002).However, it is theorized that the lack of upright position and rotational instability protects animals from developing a scoliosis.(Janssen et al., 2011).

The anatomy of the spine is an important factor in deciding the most optimal animal for scoliosis research. Bone follows wolffs law; bone in a healthy person or animal will adapt to the forces under which it is placed. If the spinal anatomy is comparable, it can be assumed that the forces on the spine are similar as well. Therefore, comparable anatomy of the spine between an animal and a human will result in a good model for scoliosis. Several studies have compared vertebrae of animals with those of human and found that the porcine spine was mostly comparable to a human spine. (McLain et al., 2002; Bozkus et al., 2005, Dath et al. 2007; Sheng et al., 2010).

Despite comparable anatomy, the porcine spine needs to be able to facilitate a scoliotic spinal deformity. Previous studies with a porcine model have shown that a three-dimensional deformity can be induced using various posterior tether types.(Accadbled et al., 2011; Chay et al., 2012; Odent et al., 2011; Schwab et al., 2009). Moreover, the previous study from our research group has shown that we can induce a three-dimensional deformity in porcine spines with a rotational force.(Wessels et al., 2016). Based on previous research, the porcine model has been recognised as the best option to investigate a new spinal implant.(Ouellet et al., 2012; Roth et al., 2013). The induction and reduction model has also been shown to be the preferred model for testing a non-fusion system.(Roth et al., 2013).

Induction surgery

20 pigs will be used for every version of the spring-based non fusion system. Every pig will receive a torsional induction spring with half of the pigs receiving an additional contralateral tension induction spring. A tether with sufficient slack is added to all the implants and will start working after 2 cm of spinal growth to aid in the induction process.(Fig 1.). The force of the tension spring (100N) and torsional spring (2Nm) were based on literature and previous research by the University of Twente to assure the safety of the animals.(Wessels et al., 2016; Accadbled et al., 2011; Chay et al., 2012; Odent et al., 2011; Schwab et al., 2009). The pigs will receive an X-ray immediately after implantation to asses the direct effect of the induction springs on the spine.

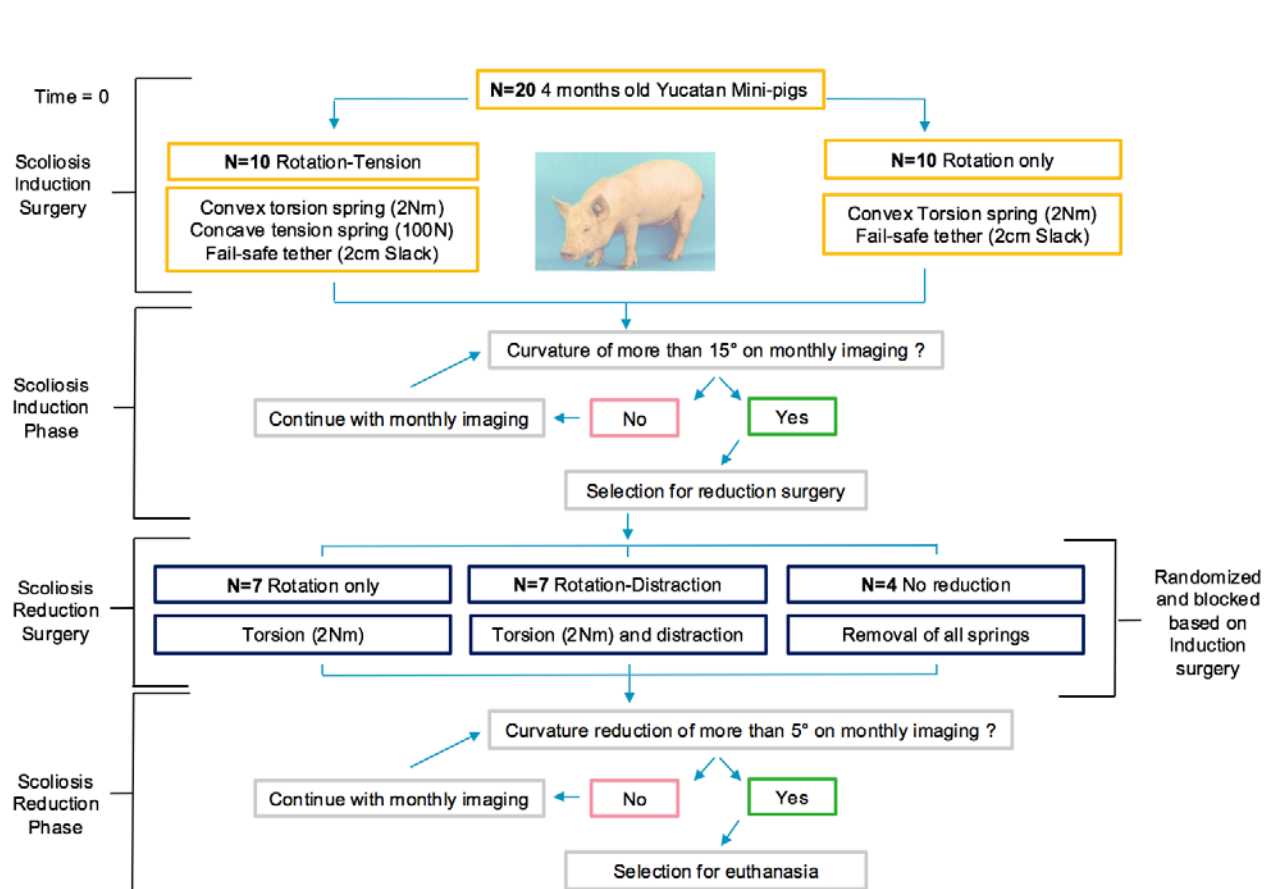


Fig 2. Schematic for general design.

Induction phase

The pigs will be followed during the induction phase. An X-ray is made after 1 month to check for material failure and assess for deformity progression. A CT is made 2 months after surgery to assess for spinal deformity progression and magnitude. Every pig that shows a sufficient spinal curvature (>15 degrees) on imaging is directly selected for reduction surgery. The pigs that do not develop a sufficient spinal curvature will be followed until imaging shows a sufficient spinal curvature (>15 degrees). They will receive a CT on 3 months and subsequently monthly x-rays until a sufficient spinal curvature (>15 degrees) develops. These pigs will be selected for reduction surgery when a sufficient curvature (>15 degrees) is present on imaging. This means that it is possible that some pigs have an induction phase duration of 2 months, some have an induction phase of 3 months and the last 2 pigs will not be selected for reduction surgery but instead will first be euthanised. The spines in these pigs will be extracted and used for CT-imaging, histology and biomechanical analysis.

Reduction surgery

A total of 18 pigs remain for reduction surgery. The 18 pigs will be selected for three different surgery groups based on a randomized block design (Fig. 1). This ensures that the two induction groups (pigs with contralateral tension springs and pigs without) are equally distributed over the three reduction groups. The first group will have their induction spring(s) exchanged with only a torsional spring for rotational reduction ($n=7$). The second group will have their induction spring(s) exchanged with a torsional spring and a distraction spring for a coupled reduction ($n=7$). The force of the distraction spring (100N) and torsional spring (2Nm) were based on literature and previous research by the University of Twente to assure the safety of the animals (Wessels et al., 2016; Akbarnia et al., 2012). The springs will be removed in the final group and no new springs are placed ($n=4$). This final group will be used to assess what degree of spinal reduction occurs without the use of reduction springs. This group will act as a control. The pigs will receive an x-ray immediately after implantation to assess the direct effect of the

induction springs on the spine.

Reduction phase

A total of 18 pigs will be followed during the reduction phase. An X-ray is made after 1 month to check for material failure and assess deformity progression. A CT is made after 2 months to assess for spinal deformity progression and magnitude. Every pig that shows a sufficient spinal curvature reduction of more than 5 degrees on imaging will be euthanized. The remaining pigs will be followed longer and receive a CT on 3 months and subsequently monthly x-rays. These pigs will be euthanized when a sufficient curvature reduction (>5 degrees) is present on imaging. The spines in these pigs will be extracted and used for CT-imaging, histology and biomechanical analysis.

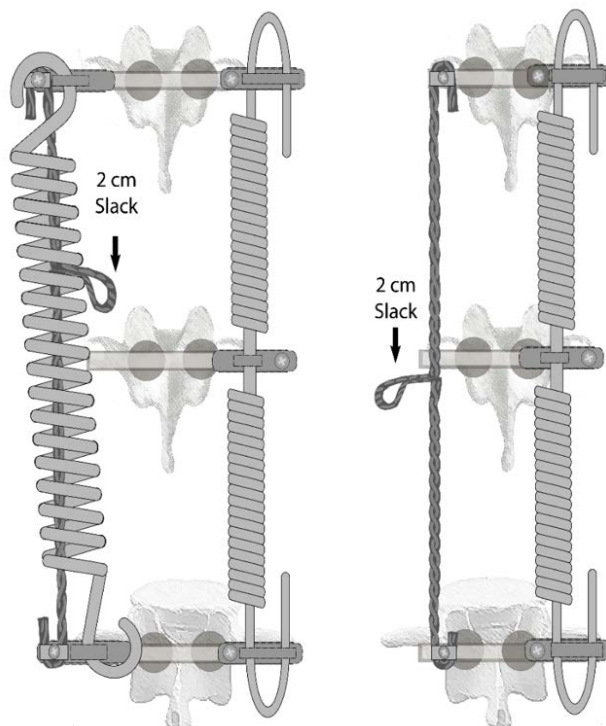


Fig 2. Left is a torsional induction spring with a contralateral tension induction spring and a tether with sufficient slack. Right shows the design without a contralateral tension induction spring

Fluorochrome injection

Three fluorochrome injections will be given during the study. Two injections during the induction and reduction surgery and finally one during the induction phase. The fluorochrome is taken up by the bone after injection. During histology, three fluorochrome bands are visible on the vertebrae and new bone-formation can be measured.

Intramuscular spring placement

These springs will be used to investigate two practical applications that can possibly be used in future versions of the springs. For example, protective measures around the springs could potentially prevent tissue ingrowth and improve the functioning of the springs. Another example would be a delayed spring release. Using a soluble suture around the spring, the force springs could potentially be released after the suture has been dissolved. This delayed spring release could theoretically prevent material failure by reducing the load on the implant material directly after surgery. The first version will implement these two improvements. During the testing of the second, third or fourth version of the spring based implant, these two applications could potentially be improved upon and tested again. Therefore, we are not certain on the exact specifications of the intramuscular springs after the first version. The improvements applied to the intramuscular springs would not alter the size, location or placement of the springs. These springs will be examined and mechanically tested on remaining strength and function.

Adjustment of the protocol in future versions

If one of the two induction surgeries (rotation-tension induction and rotation only induction) works better

during the testing of the first version of the spring based non-fusion system that induction type will be used during future testing of the 2,3 or 4th versions of the spring based non-fusion systems.

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

Acclimatisation

The pigs are allowed to acclimatize for 1 week before the start of the experiment.

Anaesthesia protocols (Induction surgery)

Pre-operative analgesic is provided by subcutaneous injections of analgesics minimum of 2h before surgery. All operations will be performed under general anaesthesia with adequate pain control during surgery.

Induction surgery (4 hours)

Before start of the surgery and after anaesthesia, a lateral and AP x-ray will be made of the pig. The operation will be performed in aseptically conditions. The surgeon will wear scrubs, sterile gloves and sterile gown. After shaving, the skin will be disinfected with iodine and the surgical site will be draped. A postero-lateral approach is done through one long skin incisions. The spine surgeon places a left and right pedicle screw in an upper, middle and lower vertebrae. The six pedicle screws will be placed with the free-hand technique. The upper instrumented vertebrae and lower instrumented vertebrae will span nine vertebrae. Bridges connect the left and right pedicle screws. These bridges contain a rail mechanism for easy sliding and locking of the springs. The induction springs are slid on the bridges along the spine and locked. A tether is locked on the bridges with 2 cm slack.(fig 2.). After the wound is closed, another lateral and AP x-ray will be made of the pig.

Intramuscular spring placement (Induction surgery)

We will use two intramuscular sites away from the surgical area to place small custom springs. The springs will be approximately 6 cm in size and place away from the primary surgical site (estimated 2 cm distance from the primary surgical site. The springs are removed after euthanasia of the animals for biomechanical testing. The placement of the springs is essential to find potential new improvements for the spring based implants. By utilising the same pigs for the intramuscular spring placement and the spring based implants, we can reduce the amount of animals used in this experiment.

Fluorochrome injection (Induction surgery)

A fluorochromic agent is injected intravenously after closure of the wound. The fluorochrome agent adheres to places of new bone formation. One fluorochrome agent is injected intra-muscular during the reduction phase. After euthanasia, the spines are harvested and readied for fluorochromic analysis. Assessing areas of new bone formation is essential in the development of a new spinal deformity reduction treatment. It can show the effect of the spring forces on bone growth and inform us on the etiology of spinal deformities.

Postoperative care (Induction phase)

The animals are postoperatively treated with the analgesic for 72 hours twice a day. The animals will be housed together. The animals will be placed under heat lamps post operatively.

Induction phase (2-6 months)

During the follow-up all the animals will receive an X-ray at 1 month and CT at 2 months. Pigs that progress to a spinal curvature of more than 15 degrees will directly be selected for reduction surgery. The remaining pigs are followed longer and receive a CT at 3 months and consequently monthly x-rays until they develop a sufficient spinal curvature (>15 degrees) and can be selected for reduction surgery. No pain or discomfort is expected from the spinal implants.

Anaesthesia protocols (Reduction surgery)

Pre-operative analgesic is provided by subcutaneous injections of analgesics minimum of 2h before surgery. All operations will be performed under general anaesthesia with adequate pain control during surgery.

Reduction surgery (2 hours)

Before start of the surgery and after anaesthesia, a lateral and AP x-ray will be made of the pig. During the second surgery the same skin incision is opened. The tethers are removed. The inductions spring(s) are easily unlocked and removed from the rail system. The reduction spring(s) are then placed and

locked on the rail system. The wound is again closed with resorbable sutures and staples. A different fluorochoime agent is injected after wound closure in order to examine new bone formation in the spine. Finally, another lateral and AP x-ray will be made of the pig.

Postoperative care (Reduction surgery)

The animals are postoperatively treated with the analgesic for 72 hours with analgesics twice a day. The animals will be housed together. The animals will be placed under heat lamps post operatively.

Reduction phase (2-6 months)

During the follow-up, all the animals will receive an X-ray at 1 month and CT at 2 months under sedation. A final intramuscular fluorochoime agent is injected during the 2 months CT in order to examine new bone formation. Pigs that have a reduction of a spinal curvature of more than 5 degrees will be selected for euthanasia. The remaining pigs are followed longer and receive a CT at 3 months and consequently monthly x-rays until they sufficiently reduce (> 5 degrees) the spinal curvature and can be selected for euthanasia. No pain or discomfort is expected from the spinal implants.

After euthanasia

After 2 months of reduction, the mini-pigs are euthanized and the spinal implants used for advanced imaging studies. After imaging, the implants are ex-planted and tested biomechanically. The spines are harvested for further histology.

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

The three reduction groups will be analyzed with a repeated measurement ANOVA (between factor design). We expect that the spring reduction groups to reduce the spinal deformity curvature from 15 degrees to <10 degrees. We do not expect the control groups to change in spinal deformity curvature. From a previous spring-based implant study done by the University of Twente in domestic pigs we can extract a standard deviation of 2. (Wessels et al., 2016). A sample size calculation was done based on three groups in a repeated measurement ANOVA. This results in a total of 12 animals for our endpoint. However, the standard deviation is based on a different study using domestic pigs. We do not expect a difference in standard deviation with the previous study and the current study. However, to factor in the possibility that the standard deviation is different, we used a range of possible standard deviations. If we recalculate the sample size based on this range, we get a sample size between 9 and 15. We have to include the possibility of animals not reaching our endpoint. We estimate from similar studies that 15% of the animals will not reach our endpoint. Furthermore, 2 animals will be euthanized after the induction phase. Therefore, we need 20 pigs for every version of the spring based non fusion implant to make sure we have enough pigs at the final reduction endpoint. We also need 3 pigs for training purposes per version. We need 3 pigs for training for every version because the size and fixation method to the spine for every version of the spring based implant can substantially change. This changes the way the implant fits in the spine and the way the surgeon needs to fixated the implant to the spine. To make sure we don't wrongly implant 20 pigs or damage the spine of the pigs during the testing of a new version, we need training with 3 pigs per version of the spring-based implant. Thus, to test all versions of the spring based implant, we need 92 pigs.

B. The animals

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

We will use the previously established porcine model for the testing of the spring based non-fusion system. (Wessels et al., 2016). The spines of pigs are comparable to human spines and using pigs in an animal study is preferred method for testing a non-fusion system to correct a spinal deformity. (Ouellet et al., 2012; Roth et al., 2013). Domestic pigs were previously used in our animal model and we succesfully induced a scoliosis that is comparable to humans. However, the spinal growth rate of the domestic pigs was not comparable to humans. The spines of a domestic pig undergo a growth spurt, increases from 25 cm of spinal length to 75 cm in 5 months. This results in three big problems. At 6 months, domestic pigs are 90 kg and hard to handle. Making an implant that fits and functions in a 75 cm spine is impossible. The spines of domestic pigs undergo a giant growth spurt compared to a relative more stable growth rate of the spine in children. Therefore, the use of mini-pigs may provide a solution (Roth et al., 2013). Mini-pigs have previously successfully been used to induce scoliosis with other

research groups for spinal implants. (McLain et al., 2002; Newton et al., 2008; Akbarnia et al., 2012; Kim et al. 2004). Mini-pigs show a much more constant growth velocity and continue to grow over a longer period. (Fig. 3.). 6 months old mini-pigs are still <25kg making them better to handle for care-givers. Immature mini-pigs (mini-pigs reach maturity at 24 months) can be housed in groups and socially, thus improving the well-being of the animals.

Our induction and reduction scoliosis implant not only allows for growth, but also increases in applied force to the spine when the implant expands during growth. Because spring forces differ if they are applied over various distances, we need our animals to have the same spinal distance at the start of the experiment and the end. This means that we need to have a uniform growth rate to make sure that we apply the same forces at the same time points to each animals. E.g. an animal with a slow spinal growth rate (0,5 cm/month) and an animal with a fast spinal growth rate (grows 2 cm/month) would have different forces applied to there spine.

Unfortunately, male and female mini-pigs have different growth rates. (fig. 4) Therefore, we need to choose one sex in order to avoid applying different forces to the spine. This is probably the main reason why previous mini-pigs studies only used one sex of mini-pigs. (McLain et al., 2002; Newton et al., 2008; Akbarnia et al., 2012; Kim et al. 2004). Adolocent scoliosis occurs more in females than in males. However, adolocent scoliosis (scoliosis at an age >10) does not require a growth preserving treatment because surgeons can wait until the spine is fully grown before doing a single correction surgery. Scoliosis at a young age is much more progressive and children of this age have to be operated on a young age and during the growth period. Scioliosis that occurs during this period does not have a female dominance (Moe et al. 1984, Enercan et al. 2004). Moreover, scoliosis does not occur in animals, indicating that female domainance for scoliosis in animals is non-existant. Based on the weight data of gottingen mini-pigs we see that the male-mini pigs grow faster than the female mini-pig. Faster growth means more expansion of the implant and thus more force translation though the springs. This can result in that the induction of scoliosis is faster in male-pigs and may cause the average induction time to reduce substantially if we use the male-minipigs, reducing the unnececary greivance of the animals. Besides faster growth rate, we do have to know if the growth rate of male minipigs is comparable to children with scoliosis.

While the spinal growth rate of children is well documented and is similair between boys and girls during our interested growth period. The spinal growth of mini-pigs is not wel documented. Newton et al. used 7-month male yucatan mini-pigs for their experiement and found an comparable spinal growth rate to children. The 7-month male yucatan mini-pigs with an average vertebral growth rate of 1mm per vertebra per month for a period of 6 months for the minipigs. However, Yucatan mini-pigs are only available from United states of America. Gottingen mini-pigs are currently the only available mini-pigs in europe. No spinal growth data was available from Gottingen mini-pigs. Therefore, we went to their facility in denmark and aquired two different pigs for CT-scans. The spines were from 6 and 12 month old male gottingen pigs. We found that the spinal length over 10 vertebrea was 16,51 cm at 6 months and 21,58 cm at 11 months resulting in 5 cm growth. This results in 0,8mm growth rate per vertebra/per month. The growth rate of children varies from 0,7 mm at 5 years old to 1 mm per vertebra/per year untill the age of 15. (Newton et al., 2008). The average growth rate of children during the active growth period is 0,76 mm per vertebra/per year. This suggests that the spinal growth rate of male gottingen mini-pigs is comparable to children requiring surgery for scoliosis correction.

Based on sample size calculations we need 20 pigs for every version of the spring based non-fusion implant to make sure we have enough pigs at the final reduction endpoint. We also need 3 pigs for training purposes per version. To test all versions, we need 92 pigs.

Relative Body Weights and Growth of Domestic and Miniature Pigs

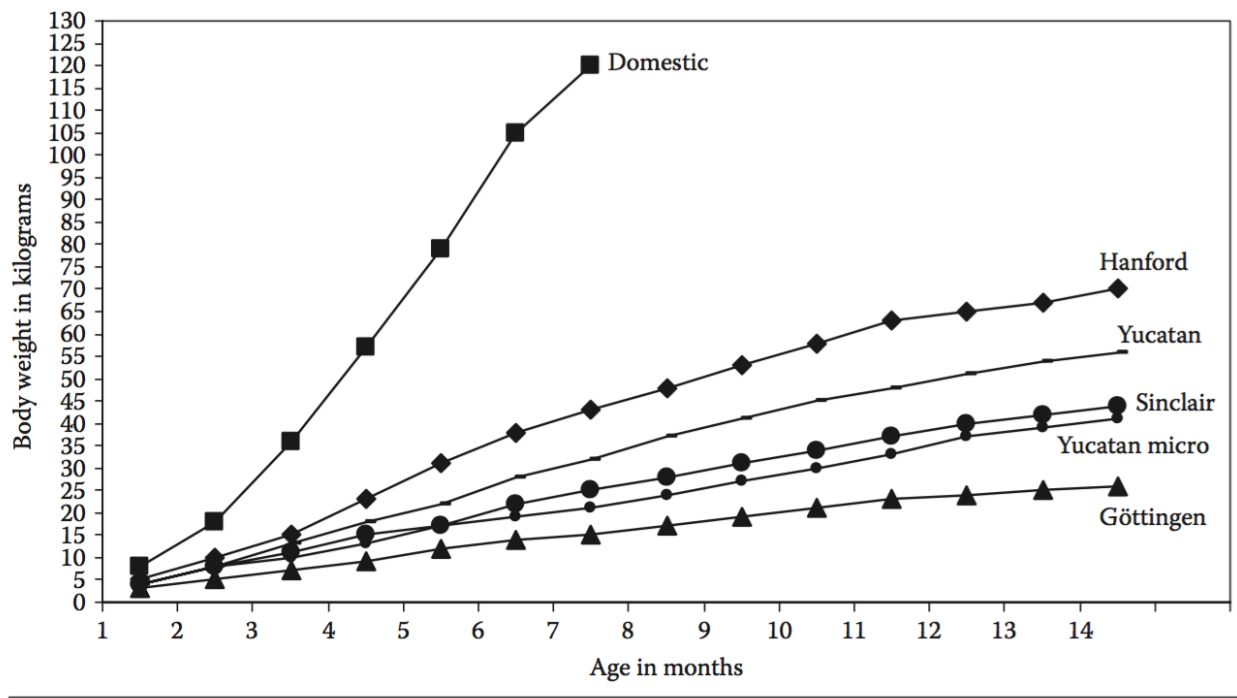


Fig 3. Growth chart comparing different sub-species of pigs.

Growth of gottingen mini-pigs

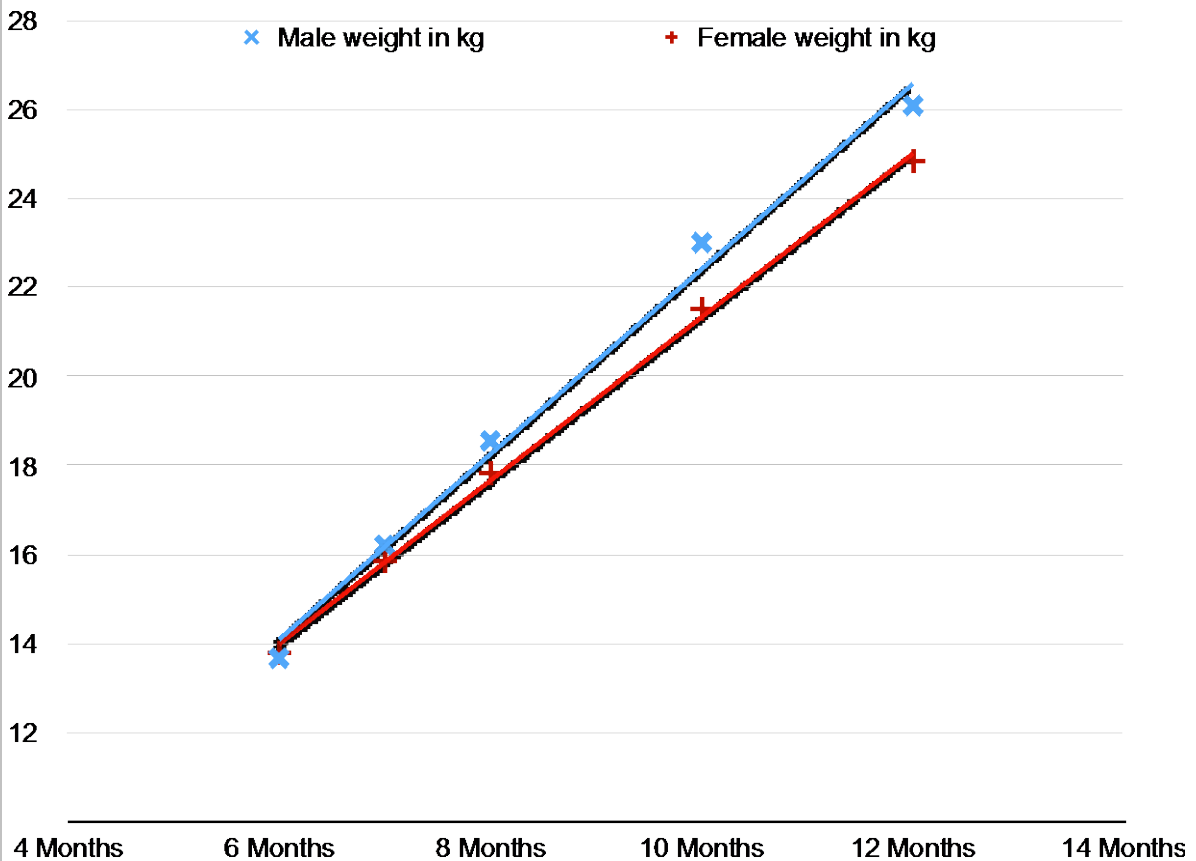


Fig 4. Growth chart comparing different sub-species of pigs.

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

We need a dynamic growing spine that walks around, puts forces on the spine, has active tissue near the spine, has active bone reaction of the spine and is able to reduce a scoliotic spinal deformity during growth after implantation. There are currently no in vitro or biomechanical models capable of simulating these factors.

Reduction

During the testing of the spring based non-fusion system, we will simultaneously test small springs intramuscular to test potential improvements to the non-fusion system and we will use fluorochrome injections to investigate bone remodelling. This is essential for the development of a medical implant. By studying multiple research questions for our main objective in the same animals, we prevent the use of new animals for the testing of our multiple research questions.

Refinement

- Animals will be given 1 week to acclimatize to their new environment.
- The porcine model is the best animal model to test a non-fusion system.
- Eye ointment will be used to prevent dry eyes during surgery.
- During and after surgery the animals will be placed on heat mats.
- The mini-pigs will receive adequate anaesthetics to prevent harm during surgery.
- Analgesia medication will be administered for 3 days after surgery to prevent harm post-operatively.
- Post-operative follow-up will be noted in a logbook
- If the mini-pigs have too much discomfort of the experiment (i.e. no weight gain), the experiment will be halted

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

The mini-pigs will have 1 week to acclimatize to the new environment before surgery. We will observe respiration continuously during surgery. The animals will be placed under heat lamps post operatively. The mini-pigs will be returned to routine housing after they have recovered from anesthesia. Unrestricted activity will be allowed post-op.

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.

Extensive literature search. Not applicable.

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 will be used for imaging studies. Pre-operative and post-operative analgesia is provided by subcutaneous injections of analgesics minimum of 2h before surgery and twice a day for 72 hours post-operatively.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

1. Pre-operative: Light stress anaesthesia.
2. Light stress postoperatively after implant surgery with adequate pain medication. No stress is expected during induction and reduction phase.
3. Pre-imaging: light stress anaesthesia.
4. Light stress during euthanasia.
(Spinal non-fusion systems are used clinically in children who do not experience adverse effects of the systems after a short period of post-operative recovery.)

Explain why these effects may emerge.

All described measurements are needed to create the least harm for the animals and most secure outcomes for this project.

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

1. 1 week to acclimatize to new environment before surgery.
2. Adequate pain medication.
3. Adequate protocol for anaesthesia.
4. Adequate protocol for euthanasia.
5. Intensive monitoring 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.

The mini-pigs will be euthanized in case the following humane endpoints are observed:

- Severe lethargy (extreme fatigue, prolonged sleep patterns)
- No weight gain (0% in 1 week)
- Paralysis (loss of function of the limbs)
- No sufficient curvature induction (>15 degrees)

Indicate the likely incidence.

- Severe lethargy = 2,5%
- Severe weight loss = 2,5%
- Paralysis = 5%
- No sufficient curvature induction (>15 degrees) = 5%

K. Classification of severity of procedures

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

The procedure is classified as moderate.

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.

We will have to kill the animals after a long period of follow-up in order to remove the implanted spring and examine the tissue ingrowth.

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

References

- Accadbled, F., Laffosse, J. M., Odent, T., Gomez-Brouchet, A., de Gauzy, J. S., & Swider, P. (2011). Influence of growth modulation on the effective permeability of the vertebral end plate. A porcine experimental scoliosis model. *Clinical Biomechanics*, 26(4), 337-342.
- Akbarnia, B. A., Mundis Jr, G. M., Salari, P., Yaszay, B., & Pawelek, J. B. (2012). Innovation in growing rod technique: a study of safety and efficacy of a magnetically controlled growing rod in a porcine model. *Spine*, 37(13), 1109-1114.
- Bozkus, H., Crawford, N. R., Chamberlain, R. H., Valenzuela, T. D., Espinoza, A., Yüksel, Z., & Dickman, C. A. (2005). Comparative anatomy of the porcine and human thoracic spines with reference to thoracoscopic surgical techniques. *Surgical Endoscopy And Other Interventional Techniques*, 19(12), 1652-1665.
- Chay, E., Patel, A., Ungar, B., Leung, A., Moal, B., Lafage, V., ... & Schwab, F. (2012). Impact of unilateral corrective tethering on the histology of the growth plate in an established porcine model for thoracic scoliosis. *Spine*, 37(15), E883-E889.
- Dath, R., Ebinesan, A. D., Porter, K. M., & Miles, A. W. (2007). Anatomical measurements of porcine lumbar vertebrae. *Clinical biomechanics*, 22(5), 607-613.
- Enercan, Meric, et al. "Apical and Intermediate Anchors Without Fusion Improve Cobb Angle and Thoracic Kyphosis in Early-onset Scoliosis." *Clinical Orthopaedics and Related Research*® 472.12 (2014): 3902-3908.
- Janssen, M. M., de Wilde, R. F., Kouwenhoven, J. W. M., & Castelein, R. M. (2011). Experimental animal models in scoliosis research: a review of the literature. *The Spine Journal*, 11(4), 347-358.
- Kim, W. J., Lee, S. H., Shin, S. W., Rivard, C. H., Coillard, C., & Rhalmi, S. (2004). The Effect of Segmental Pedicle Screw Instrumentation on Actively Growing Spine. *J Korean Neurosurg Soc*, 35, 502-506.
- Moe, John H., et al. "Harrington instrumentation without fusion plus external orthotic support for the treatment of difficult curvature problems in young children." *Clinical orthopaedics and related research* 185 (1984): 35-45.
- McLain, R. F., Yerby, S. A., & Moseley, T. A. (2002). Comparative morphometry of L4 vertebrae: comparison of large animal models for the human lumbar spine. *Spine*, 27(8), E200-E206.
- Newton, P. O., Upasani, V. V., Farnsworth, C. L., Oka, R., Chambers, R. C., Dwek, J., ... & Mahar, A. T. (2008). Spinal growth modulation with use of a tether in an immature porcine model. *J Bone Joint Surg Am*, 90(12), 2695-2706.
- Odent, T., Cachon, T., Peultier, B., Gournay, J., Jolivet, E., Elie, C., ... & Viguier, E. (2011). Porcine model of early onset scoliosis based on animal growth created with posterior mini-invasive spinal offset tethering A preliminary report. *European Spine Journal*, 20(11), 1869-1876.
- Ouellet, J., & Odent, T. (2013). Animal models for scoliosis research: state of the art, current concepts and future perspective applications. *European Spine Journal*, 22(2), 81-95.
- Roth, A. K., Bogie, R., Jacobs, E., Arts, J. J., & van Rhijn, L. W. (2013). Large animal models in fusionless scoliosis correction research: a literature review. *The Spine Journal*, 13(6), 675-688.
- Sheng, S. R., Wang, X. Y., Xu, H. Z., Zhu, G. Q., & Zhou, Y. F. (2010). Anatomy of large animal spines and its comparison to the human spine: a systematic review. *European Spine Journal*, 19(1), 46-56.
- Smit, T. H. (2002). The use of a quadruped as an in vivo model for the study of the spine—biomechanical considerations. *European Spine Journal*, 11(2), 137-144.
- Schwab, Frank, et al. "A porcine model for progressive thoracic scoliosis." *Spine* 34.11 (2009): E397-E404.
- Wessels, M., Hekman, E. E., Kruyt, M. C., Castelein, R. M., Homminga, J. J., & Verkerke, G. J. (2016). Spinal shape modulation in a porcine model by a highly flexible and extendable non-fusion implant system. *European Spine Journal*, 1-9.

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer : 2016.II.548.025
2. Titel van het project : Animal study to test different versions of a spring based spinal deformity induction and reduction
3. Titel van de NTS : Dierstudie om de inductie en reductie van rug afwijkingen tijdens de groei te onderzoeken met veerkrachten

4. Type aanvraag:

- nieuwe aanvraag projectvergunning
 wijziging van vergunning met nummer :

5. Contactgegevens DEC

- Naam DEC : DEC Utrecht
Telefoonnummer contactpersoon : 088 – 75 59 247
Emailadres contactpersoon : dec-utrecht@umcutrecht.nl

6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):

- ontvangen door DEC: 11-10-2016
 aanvraag compleet:
 in vergadering besproken: 24-10-2016
 anderszins behandeld:
 termijnonderbreking(en) van / tot : 31-10-2016/12-12-2016
 besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
 aanpassing aanvraag:
 advies aan CCD: 19-12-2016

7. De aanvraag is afgestemd met de IvD en deze is hiermee akkoord.

8. Eventueel horen van aanvrager

- Datum:
- Plaats:
- Aantal aanwezige DEC-leden:
- Aanwezige (namens) aanvrager:
- Gestelde vragen en verstrekte antwoorden:
- Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag.

9. Correspondentie met de aanvrager

- Datum vragen: 31-10-2016
- Datum antwoord: 12-12-2016
- Gestelde vragen en antwoorden:

Projectvoorstel

- 3.1 Achtergrond: De percentages die genoemd worden in de eerste alinea, zijn dat absolute percentages of percentages van percentages? De DEC adviseert u dit anders te formuleren.

De percentages zijn verduidelijkt.

Bijlage 1

- B. De dieren: De DEC verzoekt u hier nader te onderbouwen waarom u mannelijke minipigs wilt gebruiken. Bij, bijvoorbeeld, de göttingen minipigs ligt de curve namelijk veel vlakker. Of zou de keuze voor mannelijke dieren voor alle soorten biggen gelden? Graag uw motivatie/verhelderen.

De argumentatie voor mannelijke mini-pigs is verder uitgewerkt en verduidelijkt.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

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

- Aard expertise:
- Deskundigheid expert:
- Datum verzoek:
- Strekking van het verzoek:
- Datum expert advies:
- Advies expert:

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. Er zijn geen DEC-leden betrokken bij het betreffende project.

C. Beoordeling (inhoud):

1. De aanvraag is toetsbaar en heeft voldoende samenhang.

Scoliose is een complexe driedimensionale vervorming van de wervelkolom die verschillende oorzaken kan hebben. In de meeste gevallen is de oorzaak niet bekend en spreekt men van idiopathische scoliose. Deze vorm van scoliose ontstaat bij kinderen in de groei, treedt op bij 5% van alle kinderen, en is progressief van aard. Of medische behandeling van de scoliose vereist is hangt af van de ernst van de vervorming. In 0,1% van de kinderen met idiopathische scoliose is chirurgisch ingrijpen noodzakelijk om ernstige complicaties op latere leeftijd – zoals invaliditeit en cardiopulmonaire aandoeningen – te voorkomen. Tijdens de gangbare chirurgische behandeling wordt de stand van de wervels gecorrigeerd en de wervelkolom in de gewenste positie vastgezet. De implantaten die daarvoor gebruikt worden houden de wervels in de juiste positie, maar kunnen niet meegroeien met de wervelkolom. Daarom moet een patiënt in de huidige situatie gedurende de groei vele heroperaties ondergaan, waarbij het implantaat

aangepast wordt aan de toenemende lengte van de wervelkolom. Het spreekt voor zich dat dergelijke operaties zowel fysiek als psychisch zeer belastend zijn voor de jeugdige patiënten, en de behoefte aan effectievere behandelmethoden groot is.

Met behulp van het voorliggende project wil de aanvrager daarom de werkzaamheid van een nieuw type implantaat onderzoeken. De aanvrager heeft in samenwerking met een andere onderzoeksgroep veren ontwikkeld die zodanig geïmplanteerd kunnen worden dat zij de stand van de wervelkolom in een driedimensionaal vlak corrigeren, en tegelijkertijd ook mee kunnen groeien met de wervelkolom. Al het noodzakelijke vooronderzoek heeft reeds plaatsgevonden. Wat rest is het aantonen van de werkzaamheid van dit nieuw type implantaat *in situ* met behulp van dierexperimenteel onderzoek.

2. Voor zover de DEC bekend, is er geen mogelijk tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie sluit aan bij de hoofddoelstelling.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is het in kaart brengen van de werkzaamheid van een nieuw type implantaat met betrekking tot de reductie van geïnduceerde scoliose in minivarkens. Het uiteindelijke doel van het project is de ontwikkeling van een nieuw type implantaat voor de behandeling van scoliose in kinderen. Voordat de werkzaamheid van het te onderzoeken implantaat in mensen onderzocht kan worden is het van belang dat een *proof-of-concept* en een onderbouwing van de onderliggen hypothese geleverd wordt met behulp van dierexperimenten. De DEC is daarom van mening dat er in voldoende mate een relatie is tussen het directe doel en het uiteindelijke doel, en dat de beschreven experimenten noodzakelijk zijn om het uiteindelijke doel te kunnen bereiken.
5. De belangrijkste belanghebbenden in dit onderzoeksproject zijn: de proefdieren, de patiënten, het onderzoeksveld en de industrie. De morele waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: welzijn (pijn en stress) en rechtvaardigheid (intrinsieke waarde en integriteit). De morele waarden die voor de patiënten worden bevorderd zijn: welzijn (kwaliteit van leven) en rechtvaardigheid (beschikbaarheid van werkzame implantaten). De morele waarden die voor het onderzoeksveld en de industrie worden bevorderd zijn: welzijn (wetenschappelijke respectievelijk commerciële ontwikkelingen).
6. Er is geen sprake van substantiële milieueffecten.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd en dragen eraan bij dat de doelstellingen behaald kunnen worden, dat

aan de 3V-beginselen voldaan kan worden en dat voorkomen kan worden dat mens, dier en milieu negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven. Beide betrokken onderzoeksgroepen hebben veel ervaring met vergelijkbaar orthopedisch dierexperimenteel onderzoek. De DEC is van mening dat het projectvoorstel aansluit bij recente inzichten en dat het geen belangrijke hiaten bevat die de bruikbaarheid van de resultaten beperken. Het feit dat de voorliggende aanvraag een samenwerkingsproject is van een klinische onderzoeksgroep uit het UMC Utrecht en een technische onderzoeksgroep van de Universiteit Twente draagt bij aan de haalbaarheid en de relevantie van het project.

8. Het project is goed opgezet en de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten logisch en helder aan bij de aangegeven doelstellingen. In de aanvraag is helder toegelicht waarom het minivarken in het algemeen – en het Göttinger ras in het bijzonder – de aangewezen diersoort is voor de voorgestelde experimenten. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstellingen binnen het kader van het project. De onderzoeksstrategie, de logische samenhang tussen de verschillende onderdelen en go/no-go momenten, en de fasering in de uitvoering zijn met behulp van twee figuren helder uiteengezet. Elk experiment uit bijlage 1 is opgedeeld in twee logisch op elkaar volgende fasen. In de eerste fase wordt bij minivarkens scoliose geïnduceerd, omdat minivarkens – net als alle andere diersoorten en in tegenstelling tot de mens – van nature geen scoliose ontwikkelen. Wanneer in de eerste fase bij een minivarken in voldoende mate een kromming van de wervelkolom is bewerkstelligd (>15 graden) dan gaat de tweede fase van het experiment in. Dat houdt in dat het betreffende dier een tweede operatieve ingreep ondergaat, waarbij een implantaat aangebracht wordt dat de geïnduceerde scoliose moet reduceren. Wanneer voldoende reductie van de scoliose is bewerkstelligd, dan is het gewenste eindpunt van het betreffende experiment bereikt en wordt het betreffende dier geëuthanaseerd voor nadere analyse van het implantaat en omliggende weefsels. Wanneer onvoldoende reductie van de scoliose bewerkstelligd kan worden, dan eindigt de studie op een vooraf vastgesteld tijdstip. Wanneer na afloop van een experiment blijkt dat de werkzaamheid van een implantaat niet aan alle (in de aanvraag nader toegelichte) criteria voldoet, dan wordt het ontwerp van het implantaat aangepast en de werkzaamheid van het geoptimaliseerde implantaat in een volgende reeks experimenten onderzocht (maximaal 3 keer, dus 4 versies van het implantaat). Wanneer de werkzaamheid van een implantaat wel aan alle criteria voldoet, dan is het doel van de projectaanvraag bereikt en stopt de studie.

Welzijn dieren

9. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
- Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
 - Niet-menselijke primaten (10e)
 - Dieren in/uit het wild (10f)
 - Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn)

- Zwerfdieren (10h)
- Hergebruik (1e lid 2)
- Locatie: buit instelling vergunninghouder (10g)
- Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
- Dodingsmethode niet volgens bijlage IV richtlijn (13c lid 3)

10. De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de richtlijn.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Alle dieren zullen twee operatieve ingrepen ondergaan en meerdere keren gesedeerd worden ten behoeve van beeldvorming. Het matige ongerief dat hieruit volgt is toe te schrijven aan de directe gevolgen van de operaties en de herhaaldelijke anesthesie (kortdurende pijn en stress). Eerder uitgevoerde vergelijkbare experimenten hebben uitgewezen dat varkens geen pijn of stress ervaren door de indirecte gevolgen van de operaties (de feitelijke inductie en reductie van scoliose).
12. De integriteit van de dieren wordt aangetast door fysieke en mentale aantasting. De dieren worden geanestheiseerd (mentale aantasting) zodat scoliose geïnduceerd en vervolgens gereduceerd kan worden (fysieke aantasting).
13. De humane eindpunten zijn in de bijlage dierproeven goed gedefinieerd en het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt bereikt is goed ingeschat. Men houdt er rekening mee dat een aantal dieren het humaan eindpunt bereikt ten gevolge van complicaties na een operatieve ingreep: ernstige lethargie (2,5%), stagnatie in groei (2,5%) en paralyse (5%). Ook houdt men er rekening mee dat bij een aantal dieren (5%) onvoldoende kromming in de wervelkolom (<15 graden) bewerkstelligd kan worden. In dat geval is een no-go moment bereikt en wordt het betreffende dier uit de proef genomen.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Het ontstaan en de operatieve reductie van scoliose in een kind in groei gaat gepaard met een complex samenspel tussen verschillende biodynamische krachten en weefsels. Er zijn geen *in vitro* en biodynamische modellen beschikbaar die de onderliggende processen zodanig kunnen nabootsen, dat een betrouwbare uitspraak gedaan kan worden over de werkzaamheid van een implantaat *in situ*.
15. Het aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en er is een heldere strategie om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Met behulp van gegevens uit eerder uitgevoerd vergelijkbaar onderzoek is bepaald welke groepsgrootte nodig is om statistisch en biologisch

significante verschillen tussen groepen te kunnen detecteren. Bij de berekening van de benodigde groepsgrootte is rekening gehouden met het aantal dieren dat naar verwachting het humaan eindpunt zal bereiken (15% in totaal, zie C13). Voor elk van de vier varianten van het implantaat worden 3 extra dieren aangevraagd voor trainingsdoeleinden. De grootte en fixatiemethode kunnen tussen de varianten namelijk aanzienlijk verschillen, en daarom is het van belang dat voorafgaand aan het feitelijke experiment geoefend wordt met het aanbrenge van de betreffende variant. Op deze wijze wordt voorkomen dat proefdieren tijdens het experiment op grond van technische problemen vroegtijdig uit de studie gehaald moeten worden. Proefdieren worden efficiënt ingezet door tegelijk met het feitelijke experiment ook aanvullende onderzoeksvragen in hetzelfde dier te onderzoeken: fluorochroom injecties worden toegediend om de remodellering van het botweefsel in kaart te brengen, en kleine implantaten worden intramusculair aangebracht om de invloed van veranderingen in het ontwerp van het implantaat te onderzoeken. De resultaten van de aanvullende experimenten zullen in het lopende project toegepast worden voor de optimalisatie van de verschillende te onderzoeken varianten van het implantaat.

16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project is zodanig opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. De onderzoeksgroep heeft veel ervaring met de uit te voeren experimentele handelingen. Om ongerief zoveel mogelijk te beperken worden adequate en op het model afgestemde analgesie- en anesthesieprotocollen toegepast. De minivarkens worden gedurende het gehele experiment – ook direct na een operatie – in groepsverband gehuisvest.
17. Er is geen sprake van wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Er zullen in bijlag 1 alleen mannelijke dieren gebruikt worden, omdat het van belang is dat de variatie tussen de dieren met betrekking tot de groeicurve tot een minimum gereduceerd wordt. De mate waarin het implantaat in een dier tijdens de groei uitgerekt wordt is namelijk bepalend voor de hoeveelheid kracht die door het implantaat op de wervelkolom uitgeoefend wordt, en daarmee ook bepalend voor de werkzaamheid. Door enkel mannelijke dieren in te zetten wordt deze belangrijke variabele zoveel mogelijk gestandaardiseerd, en ook het benodigde aantal dieren per groep geminimaliseerd. Daarnaast groeien mannelijke Göttinger minivarkens sneller dan vrouwelijke dieren. Dat heeft als voordeel dat een implantaat in een korter tijdsbestek zodanig uitgerekt wordt dat voldoende kracht op de wervelkolom uitgeoefend wordt om scoliose te kunnen induceren (fase 1). De duur van het experiment kan op deze wijze verkort worden. Tenslotte hebben eerste metingen uitgewezen dat de groeicurve van de wervelkolom van mannelijke Göttinger minivarkens vergelijkbaar is met de groeicurve van de wervelkolom van kinderen. De DEC is ervan overtuigd dat de aanvrager met bovenstaande argumenten in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd dat het, om de doelstellingen te bereiken, noodzakelijk is om de proeven met alleen mannelijke dieren uit te voeren.

19. De dieren worden in het kader van het project gedood, omdat de doelstellingen van het project alleen behaald kunnen worden met behulp van uitgebreide analyse van het implantaat en het omliggende weefsel. De dieren worden volgens een passende en in bijlage IV van de richtlijn genoemde methode gedood.
20. Omdat in het projectvoorstel minivarkens worden aangevraagd is de vraag over herplaatsing/hergebruik niet van toepassing.

NTS

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

D. Ethische afweging

1. De centrale morele vraag luidt: rechtvaardigt het directe doel van het project (het in kaart brengen van de werkzaamheid van een nieuw type implantaat met betrekking tot de reductie van geïnduceerde scoliose in minivarkens) en het uiteindelijke doel (de ontwikkeling van een nieuw type implantaat voor de behandeling van scoliose bij kinderen), gezien de hoge waarschijnlijkheid dat de doelstellingen behaald worden, het matige ongerief dat de dieren wordt aangedaan in het voorliggende project?
2. Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: matig nadeel. Waarden die voor het onderzoeksveld en de industrie worden bevorderd: gering voordeel. Waarden die voor de patiënten worden bevorderd: veel voordeel. De DEC is van mening dat de belangen van de patiënten in dit project zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de proefdieren. Het feit dat de waarden voor het onderzoeksveld en de industrie door dit project worden bevorderd speelde voor de DEC bij het maken van de ethische afweging geen rol van betekenis. Indien de hierboven genoemde doelstelling behaald wordt, dan zal dit project bijdragen aan de ontwikkeling van een nieuw type implantaat voor de behandeling van scoliose bij kinderen. De patiënten zouden er zeer bij gebaat zijn wanneer dit nieuwe type implantaat gebruikt kan worden, omdat de huidige implantaten niet mee kunnen groeien met de patiënt. In de huidige situatie is het daarom noodzakelijk om gedurende de groei twee keer per jaar een heroperatie uit te voeren. Dergelijke belastende operaties zijn met het nieuwe type implantaat niet meer nodig. Daarmee kan het ongerief ten gevolge van de behandeling van scoliose met het nieuwe type implantaat voor de patiënt beduidend lager worden vergeleken met de huidige situatie. Het is aannemelijk dat de doelstellingen behaald zullen worden, en de onderzoekers doen er alles aan om ongerief voor de dieren tot een minimum te beperken.
3. De DEC is overtuigd van het belang van de doelstellingen: het in kaart brengen van de werkzaamheid van een nieuw type implantaat met betrekking tot de reductie van geïnduceerde scoliose in minivarkens, met als uiteindelijke doel de ontwikkeling van een nieuw type

implantaat voor de behandeling van scoliose bij kinderen. De DEC is van mening dat de waarden die voor de patiënten bevorderd kunnen worden zwaarder wegen dan de waarden die voor de proefdieren in het geding zijn. De DEC is van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstellingen binnen het kader van het project. De DEC is er verder van overtuigd dat de aanvrager voldoende kennis en kunde heeft om de doelstellingen te behalen, om te kunnen voldoen aan de 3V-beginselen en om te kunnen voorkomen dat mens, dier en milieu negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven. De DEC is ook van mening dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om het ongerief en het aantal dieren tot een minimum te beperken. Dit alles brengt de DEC tot het oordeel dat het belang van de doelstelling opweegt tegen het matige ongerief dat de dieren zullen ondervinden, en dat de doelstellingen het gebruik van proefdieren rechtvaardigen.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden.

De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

3. Er zijn geen knelpunten/dilemma's naar voren gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht

Postbus 12007 t.a.v. Instantie voor Dierenwelzijn
Utrecht
3501 AA UTRECHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD115002016804

Bijlagen

2

Datum 23 december 2016

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 22 december 2016. Het gaat om uw project "Animal study to test spring based induction and reduction of spinal deformities". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD115002016804. 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. U ontvangt binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. Als wij nog informatie van u 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 voldoen, 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.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:

23 december 2016

Aanvraagnummer:

AVD115002016804

Datum:
23 december 2016
Aanvraagnummer:
AVD115002016804

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 11500
Naam instelling of organisatie: UMC Utrecht
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: ██████████
KvK-nummer: 30244197
Postcode en plaats: 3501AA UTRECHT
IBAN: NL27INGB0000425267
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: Universiteit Utrecht

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: ██████████
Functie: PhD student
Afdeling: ██████████
Telefoonnummer: ██████████
E-mailadres: ██████████

Datum:
23 december 2016
Aanvraagnummer:
AVD115002016804

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Afdeling: [REDACTED]
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 januari 2017
Geplande einddatum: 1 januari 2022
Titel project: Animal study to test spring based induction and reduction of spinal deformities
Titel niet-technische samenvatting: Dierstudie om de inductie en reductie van groeiafwijkingen van de rug te onderzoeken met veerkrachten
Naam DEC: DEC Utrecht
Postadres DEC: Postbus 85500 3508 GA Utrecht
E-mailadres DEC: dec-utrecht@umcutrecht.nl

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 935,-
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: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Plaats: Utrecht
Datum: 19 december 2016

Datum:
23 december 2016
Aanvraagnummer:
AVD115002016804



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UU-ASC
Postbus 80.011
3508 TA UTRECHT


**Centrale Commissie
Dierproeven**
Postbus 20401
2500 EK Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD115002016804
Bijlagen
2

Datum 23 december 2016
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur
Factuurdatum: 23 december 2016
Vervaldatum: 22 januari 2017
Factuurnummer: 16700804
Ordernummer: CB.841910.3.01.011

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD115002016804	€ 935,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL29INGB 070.500.1512 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93144, 2509 AC te 's Gravenhage.

Van: [REDACTED] namens dec-utrecht <dec-utrecht@umcutrecht.nl>
Verzonden: dinsdag 24 januari 2017 14:21
Aan: 'Info-zbo'
Onderwerp: Diermodellen scoliose projecten

Beste [REDACTED]

Uw opmerking/verbazing betreffende de keuze van twee verschillende modellen voor scoliose onderzoek, nl. de rat en de mini pig in twee verschillende projecten uit dezelfde onderzoeksgroep, is naar de mening van de DEC als volgt te verklaren.

Het eerst ingediende en toegekende project (uw ref. AVD115002016564) is een onderzoek naar de etiologie van scoliose en is derhalve conform opgave van de onderzoeker fundamenteel van aard. Indien de resultaten daartoe aanleiding geven, is er wellicht uitzicht op nieuwe behandel mogelijkheden of op het voorkomen van progressie van de afwijkingen (preventie) maar zover is het nog niet. Voor dergelijk onderzoek dat nog in de fase zit van trial and error is de rat, ook internationaal, het aangewezen model.

Het voorliggende onderzoek (onze ref. 2016.II.548.025) daarentegen bevindt zich in een geheel andere fase en zit dicht aan tegen klinische toepassing en is derhalve te karakteriseren als Translationeel onderzoek. De onderzoekers kiezen daarom voor een diermodel dat hanteerbaar is en waarin de groeisnelheid, gezien de uitleesparameter, constant is en vergelijkbaar met die bij jonge kinderen. Naar de mening van de DEC is de keuze voor de mini pig uitstekend beargumenteerd en onderbouwd.

Concluderend: de keuze van de diermodellen is gebaseerd op (het karakter van) de vraagstellingen die wezenlijk verschillend zijn in de desbetreffende projecten.

Indien U nog aanvullende vragen hebt, zijn we gaarne bereid deze te beantwoorden.

Met vriendelijke groeten,

[REDACTED]



Secretaris DEC Utrecht | Raad van Bestuur, Kwaliteit en Patient Veiligheid, Bureau Toetsing van Onderzoek
Universitair Medisch Centrum Utrecht | Kamernummer C01.314 | Huispostnummer D01.343 | Postbus 85500 | 3508 GA UTRECHT
T: +31 88 75 592 47 | www.umcutrecht.nl | Werkdagen: ma, di, woe, do

De informatie opgenomen in dit bericht kan vertrouwelijk zijn en is uitsluitend bestemd voor de geadresseerde. Indien u dit bericht onterecht ontvangt, wordt u verzocht de inhoud niet te gebruiken en de afzender direct te informeren door het bericht te retourneren. Het Universitair Medisch Centrum Utrecht is een publiekrechtelijke rechtspersoon in de zin van de W.H.W. (Wet Hoger Onderwijs en Wetenschappelijk Onderzoek) en staat geregistreerd bij de Kamer van Koophandel voor Midden-Nederland onder nr. 30244197.

 Denk s.v.p. aan het milieu voor u deze e-mail afdrukt.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht

Postbus 12007
Utrecht
3501 AA UTRECHT


**Centrale Commissie
Dierproeven**
Postbus 20401
2500 EK Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD115002016804
Bijlagen
1

Datum 1 februari 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 

Op 22 december 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Animal study to test spring based induction and reduction of spinal deformities" met aanvraagnummer AVD115002016804. 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). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning.

Met het oog op artikel 10a, lid 1, zijn er algemene voorwaarden gesteld.

U kunt met uw project "Animal study to test spring based induction and reduction of spinal deformities" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 februari 2017 tot en met 1 januari 2022. De looptijd van de vergunning wijkt af omdat de startdatum in de aanvraag in het verleden ligt.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Utrecht gevoegd. Dit advies is opgesteld op 19 december 2016. 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. Dit advies van de commissie nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

Datum:
1 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD115002016804

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.centralecommissiedierproeven.nl. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Centrale Commissie Dierproeven

namens deze

ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

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: UMC Utrecht
Adres: Postbus 12007
Postcode en plaats: 3501AA UTRECHT
Deelnemersnummer: 11500

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 februari 2017 tot en met 1 januari 2022, voor het project "Animal study to test spring based induction and reduction of spinal deformities" met aanvraagnummer AVD115002016804, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Utrecht. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is PhD student.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 22 december 2016
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 22 december 2016;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 22 december 2016;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 19 december 2016, ontvangen op 22 december 2016.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Animal study to test spring based induction and reduction of spinal deformities.				
	Andere zoogdieren (andere Mammalia) / Gottingen minipigs	92	100% Matig	

Voorwaarden

Op grond van artikel 10a1 lid 2 van de Wet op de dierproeven zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen

De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat go/no go momenten worden afgestemd met de IvD.

In artikel 10, lid 1 sub a 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.

Aanvraagnummer:

AVD115002016804

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 afstemming met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarde wijzigen of intrekken.



Aanvraagnummer:

AVD115002016804

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 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

Aanvraagnummer:

AVD115002016804

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 13d 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 13c 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.

De Minister heeft vrijstelling ontheffing verleend volgens artikel 13c, die de afwijkende methode van doden op basis van wetenschappelijke motivering ten minste even humaan acht als de in de richtlijn opgenomen passende methoden.