

| Inventaris Wob-verzoek W17-09 | | | | | | | | | |
|-------------------------------|------------------------------------|-----------------|------|--------|-------|-------------------|--------|--------|------|
| | | wordt verstrekt | | | | weigeringsgronden | | | |
| nr. | document | reeds openbaar | niet | geheel | deels | 10.1.c | 10.2.e | 10.2.g | 11.1 |
| | NTS20171045 | | | | | | | | |
| 1 | Aanvraagformulier | | | | x | | x | x | |
| 2 | Projectvoorstel oud | | | | x | | x | x | |
| 3 | Niet-technische samenvatting | x | | | | | | | |
| 4 | Bijlage beschrijving dierproeven 1 | | | x | | | | | |
| 5 | Bijlage beschrijving dierproeven 2 | | | x | | | | | |
| 6 | Bijlage beschrijving dierproeven 3 | | | x | | | | | |
| 7 | Bijlage beschrijving dierproeven 4 | | | x | | | | | |
| 8 | Bijlage beschrijving dierproeven 5 | | | x | | | | | |
| 9 | DEC-advies | | | | x | | x | x | |
| 10 | Ontvangstbevestiging | | | | x | | x | x | |
| 11 | Verzoek aanvulling aanvraag | | | | x | | x | x | |
| 12 | Reactie verzoek aanvulling | | | | x | | x | x | |
| 13 | Projectvoorstel nieuw | | | | x | | x | x | |
| 14 | Advies CCD | | x | | | | | | x |
| 15 | Beschikking en vergunning | | | | x | | x | x | |

06 APR 2017



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?
Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.

Ja > Vul uw deelnemernummer in 80100-KNAW; [redacted]
 Nee > U kunt geen aanvraag doen

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

| | |
|---|--------------------|
| Naam instelling of organisatie | KNAW |
| Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde | [redacted] |
| KvK-nummer | 5 4 6 6 7 0 8 9 |
| Straat en huisnummer | |
| Postbus | Postbus 19121 |
| Postcode en plaats | 1000GC Amsterdam |
| IBAN | NL33DEUT0546900054 |
| Tenaamstelling van het rekeningnummer | [redacted] |

1.3 Vul de gegevens van het postadres in.
Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.

| | | |
|-----------------------------|---------------------------|---|
| (Titel) Naam en voorletters | [redacted] | <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
| Functie | Groepsleider & Hoogleraar | |
| Afdeling | [redacted] | |
| Telefoonnummer | 0 2 0 5 6 6 5 3 5 9 | |
| E-mailadres | [redacted] | |

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 | Groepsleider | |
| Afdeling | [redacted] | |
| Telefoonnummer | 0 2 0 5 6 6 4 5 3 0 | |
| 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 | Groepsleider | |
| Afdeling | [redacted] | |
| Telefoonnummer | 0 2 0 5 6 6 4 5 3 0 | |
| 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 checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
| Functie | |
| Afdeling | |
| Telefoonnummer | |
| E-mailadres | |
- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?
- | |
|---|
| <input type="checkbox"/> Ja > Stuur dan het ingevulde formulier <i>Melding Machtiging</i> mee met deze aanvraag |
| <input checked="" type="checkbox"/> 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 |
| <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 |
- 2.2 Is dit een *wijziging* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor verleend is?
- | |
|--|
| <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 *melding* 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 | 0 1 . 0 5 . 2 0 1 7 |
| Einddatum | 0 1 . 0 5 . 2 0 2 7 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- | |
|--|
| Plasticity in the visual system and its regulation |
|--|
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- | |
|--|
| De werking en regulatie van leren in het visuele systeem |
|--|
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|----------|
| Naam DEC | DEC-KNAW |
| Postadres | |
| E-mailadres | |

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1.827,00 Lege
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.
 Via een eenmalige incasso
 Na ontvangst van de factuur

5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
- Verplicht
- Projectvoorstel
- Niet-technische samenvatting
- Overige bijlagen, indien van toepassing
- Melding Machtiging
- Appendices 5 stuks; bijlage "overview number of animals"; bijlage "Figuren 1-4"


6 Ondertekening


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

Centrale Commissie
 Dierproeven
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondergetekende verklaart:


- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
- dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
- dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
- dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
- dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam 

Functie 

Plaats Amsterdam

Datum 03 - 04 - 2017

Handtekening 



Form Project proposal

- This form should be used to write the project proposal for animal procedures.
- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed.
- For more information on the project proposal, see our website (www.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.

Brain plasticity and its regulation

The brain shows a tremendous ability to adapt to its ever-changing environment. At the root of this adaptation is the formation and refinement of neural circuits (referred to as "plasticity"), allowing our brains to develop, acquire knowledge, learn new skills and recover from injuries.

The goal of this project is to increase our fundamental scientific understanding on how plasticity is accomplished. Our hypothesis is that plasticity in the brain is brought about and modulated by several interrelated mechanisms: i) rearrangements of feedforward connections (dominant at critical periods during development, ii) rearrangements of feedback connections (dominant in adulthood), iii) changes in the influence of interneurons to temporarily enhance plasticity so that it occurs only when necessary (for example: during specific stages of development or upon punishment or reward).

Connectivity of the visual system

To reach this goal, we use the visual system of the mouse as a model. The main reason is that there is a solid understanding of the basic wiring principles of the visual system, allowing us to study where and how changes in connectivity occur during plasticity.

The visual system responds to inputs from the two eyes (Fig. 1A). These feedforward inputs from the eyes first enter the lateral geniculate nucleus of the thalamus. Because a fraction of the axons from the retina do not cross in the optic chiasm, inputs from both eyes will enter the left and right thalamus. Thalamic relay neurons project to the primary visual cortex (V1). Neurons in V1 further process the information and send projections to higher visual cortices and thalamic nuclei in which more complex visual patterns are processed. The eyes also provide input to the superior colliculus which is important for regulating, among others, eye movements. The superior colliculus, in turn, projects to the thalamus. Within the visual system there are also extensive feedback connections (Fig. 1B). Visual cortical areas receive these feedback inputs from higher visual and frontal cortices providing contextual information about the visual scene, the task that is being carried out, the state of the animal, etc. The thalamus and superior colliculus also receive feedback information from the visual cortex. This reiterative connectivity makes it possible for the brain to anticipate and rapidly interpret the flow of information that enters the brain via the eyes.

Visual responses

When visual stimuli are provided to a mouse, neurons in the visual system will respond to it. This can be recorded using electrophysiological or imaging approaches. To what properties of visual stimuli a particular neuron responds depends on the brain region it is in and the specific synaptic inputs it receives. Neurons in the thalamus, for example, mainly respond to small patches on a contrasting background while neurons in V1 respond preferentially to bars moving in a particular direction. Neurons in V1 also have a preference for inputs from the left or right eye. This property is called ocular dominance (OD). It is a direct consequence of the fact that inputs from the two eyes project to both hemispheres. Binocular vision also enables depth perception, as it allows for the comparison of images from the two eyes. Surprisingly, mouse visual cortical areas including V1 do not only respond to visual stimuli but also to motor activity, reward or punishment, anticipation, decision making, etc. This is a consequence of the feedback inputs V1 receives from higher visual and prefrontal cortices and high order thalamic nuclei. In higher visual areas, neurons respond to more complex visual properties. Here, neurons may respond to particular objects or sceneries. Taken together, the responses in the visual system are defined by the circuits that the neurons form through their synaptic connections.

Plasticity in the developing and adult visual system and its regulation

Another reason why the mouse visual system is attractive for studying plasticity is that it is relatively easy to illicit and record responses in the visual cortex and subcortical regions upon visual stimulation and to relate changes in these responses (plasticity) to connectivity changes. Of special importance for our research is that there is a well-defined critical period of development during which plasticity of OD can take place. This allows us to compare the connections that undergo plasticity during this critical period, with the connections that undergo plasticity in adulthood. Moreover, it allows us to investigate the mechanisms that regulate plasticity during the critical period, and those that regulate adult plasticity, and relate these mechanisms to the specific connections that undergo plasticity.

i) Developmental plasticity and critical periods

During development, there are defined periods during which specific brain regions show a heightened plasticity potential. Generally speaking, lower order brain regions (for example those processing sensory inputs) undergo plasticity before higher brain regions (for example those involved in executive functions).

During the critical period of OD plasticity (Fig. 2, left panel) the feedforward connections from the eyes are fine-tuned which is important for the development of normal binocular vision. If misguided, for example by dysfunction or misalignment of one eye, the visual cortex will become less responsive to this eye causing the condition known as amblyopia, or "lazy eye". When in experimental animals one of the eyes is closed during a defined period of postnatal development, V1 will become less responsive to the deprived eye while responses to the non-deprived eye are strengthened. This functional change is accompanied by (and probably caused by) extensive structural changes: thalamic axonal feedforward projections from the deprived eye retract while those of the non-deprived eye expand. Notably, OD plasticity only occurs efficiently and permanently during a critical period of development (postnatal 3-5 weeks in mice). This has made OD plasticity very informative in the study of structure/function relationships during plasticity, and in understanding the mechanisms that regulate plasticity levels – specifically the factors that regulate the onset and closure of critical periods. We have used this model extensively, to identify molecular [1-5] and cellular mechanisms underlying and regulating critical period plasticity [6,7].

ii) Adult plasticity

In the adult visual system, after critical period closure, other mechanisms underlying plasticity become dominant. In adults plasticity is induced when large reductions in sensory input occur over prolonged periods of time. For example plasticity in primary visual cortex occurs after damage to the retina. This results in the "filling in" of the visual field so that one does not experience the lesion as a black spot. This form of plasticity is important, as like OD plasticity, it is induced by visual deprivation (though requiring an almost complete loss of input from (part of) the retina), but in contrast to OD plasticity it occurs readily in adulthood. This experimental model thus allows us to address the question whether it involves rearrangement of feedforward connections like critical period plasticity, or whether it alters feedback connections, as is expected for other forms of adult plasticity. In our laboratories we have employed this form of adult plasticity to study the relationships between the gain and loss of synapses and the trafficking of mitochondria [8].

A more natural type of adult plasticity occurs in association with perceptual learning: an improvement in the ability to detect or discriminate stimuli induced by repeated practice (Fig. 2 right panel). This is the type of learning that enables the trained birdwatcher to spot rare birds in the woods that untrained people miss out on. Perceptual learning takes place in adulthood and involves various brain areas including V1. In contrast to OD plasticity, perceptual learning is strongly modulated by reinforcement signals, such as reward or punishment [9]. With perceptual learning, responses of neurons in the visual system change. Interestingly, not only responses to particular features of trained visual stimuli alter, but neurons in the visual system also start responding to anticipated reward or punishment, choices the mouse makes or task-related behaviour. In our laboratories we have established perceptual learning tasks for mice, in which mice learn to differentiate between different visual stimuli. This lets us monitor, in real time, how the responses of hundreds of neurons change during learning. A related form of reinforcement learning is visual fear learning, during which a particular visual context is associated with an aversive stimulus such as an electric shock. Once the association is made, the animal will show freezing behaviour when the visual stimulus is presented to the mouse. These plasticity paradigms typically tune responses in lower visual brain regions to more complex contextual information. Therefore we believe these forms of plasticity involve plasticity of feedback connections providing such information. Some forms of experience-dependent plasticity that occur readily in adulthood do not require reinforcement. This is called unsupervised learning and involves, for example, reduced responsiveness to repeated stimuli that initially provide a startling or novelty response. In our hands, mice learn not be afraid of objects that unexpectedly fly over or approach quickly, a process likely to involve interaction between the visual cortex and the superior colliculus. Another example is that mice stop paying attention to objects in their cage once they become familiar with them. Unsupervised learning is thus distinct from deprivation-induced plasticity, as it is induced by visual stimuli and not by continuous lack thereof, and from perceptual learning, as it does not require reinforcement. It is therefore important to understand

whether feedforward and feedback connections between thalamus, superior colliculus and V1 rearrange during this form of plasticity, and what the regulatory mechanisms are. Moreover, unsupervised learning will also occur (unintentionally) during reinforcement learning paradigms, as the mice will get used to the handling, the experimental setup, the visual stimuli that are shown repeatedly, etc. It is therefore important to know which changes in connectivity are induced by unsupervised learning in order to isolate those that are induced specifically by reinforcement learning.

Taken together, by studying and comparing how specific feedforward and feedback connections are reorganized during critical period plasticity, adult deprivation-induced plasticity, reinforcement learning and unsupervised learning we will be able to identify overarching principles of experience-dependent connectivity changes.

iii) Regulation of plasticity

From the above it is apparent that plasticity occurs at specific developmental stages, or under particular circumstances, for example upon reward or punishment or after prolonged lack of sensory input. This means that plasticity levels must be under regulatory control allowing the different forms of plasticity, such as critical period plasticity or perceptual learning to occur only when needed. A comprehensive understanding of the fundamental mechanisms of plasticity also encompasses an understanding of these regulatory mechanisms and how they relate to the changes in connections that effectuate plasticity under different circumstances. This can be achieved particularly well in mice, as many powerful approaches for genetic modification have been developed for mice, rapidly advancing our lines of research.

We and others have identified various molecular targets that regulate plasticity levels during the critical period. These include genes that regulate axon growth and retraction, synapse maturation or the formation of the extracellular matrix. Interestingly, many of these genes strongly affect plasticity levels when their expression is modified in a specific subset of inhibitory interneurons: parvalbumin (PV)-expressing basket cells. This strongly supports the idea that these interneurons play an important role in regulating plasticity levels during critical periods [6,7]. Interneurons represent 10-20% of all neurons in the brain. In contrast to excitatory neurons that employ glutamate as a neurotransmitter, interneurons use GABA as a neurotransmitter, through which they inhibit other neurons they contact. The onset of the critical period of OD plasticity involves the development of inhibitory innervation of the cortex [10] and thalamus [redacted] (under revision for Nature Neuroscience). The further increase in the level of inhibition with development then appears to close the critical period, suggesting that a certain balance in inhibition and excitation is required for plasticity. Our work on a mouse model of Neurofibromatosis type 1 (NF1), a monogenetic developmental brain disorder associated with intellectual disability and autism, illustrates the relevance of mechanism. We find that in NF1 mice, cortical interneurons are hyperexcitable. As a consequence, these mice show early closure of the critical period. When these mice develop in an enriched environment, both cortical inhibition and critical period closure normalize. Importantly, PV+ interneurons provide important feedforward inhibition (they receive feedforward input, and inhibit excitatory neurons receiving the same inputs). Our hypothesis is that interneurons that provide feedforward inhibition are the perfect candidates to regulate plasticity of feedforward connections during critical periods.

Importantly, changes in inhibition/excitation balance also occur at the moment that plasticity is induced in adulthood. In the adult visual cortex, for example, inhibitory synapses are lost when the retina is damaged [11]. Moreover, the activity of interneurons in the visual cortex is reduced during perceptual learning [12]. These changes in inhibition appear to be crucial as activating or decreasing inhibition has been shown to reduce or increase plasticity levels [13,14]. Notably, the changes in inhibition that occur in adulthood seem to involve different subsets of interneurons than those regulating plasticity during the critical period (Fig. 2). Especially somatostatin (SST) expressing interneurons appear to be involved, which predominantly inhibit the dendrites of cortical neurons that receive feedback connections. We therefore hypothesize that interneuron subsets that gate feedback inputs are in the best place to regulate these connections in adulthood.

How the changes in the activity of inhibitory neurons or the persistence of their synapses are achieved remain unclear, as are the mechanisms through which disinhibition enhances plasticity during critical

periods or in adulthood. Our experiments have shown that during critical periods, inhibition does not have an instructive role, meaning that disinhibition does not selectively increase learned responses [7]. More likely, inhibition plays a permissive role, setting a level of plasticity. In summary, over the last years it has become clear that a temporary reduction of inhibition (disinhibition) is a critical factor in the enhancement of plasticity levels, not just during development but also in the adult visual cortex. However, this appears to involve different interneuron subsets, depending on the type of plasticity that occurs.

Open questions

Despite the growing knowledge on the anatomy of the visual system, very little is known about how experience-dependent plasticity is achieved through specific rearrangement of these connections. Most progress has been made in understanding the connectivity changes during OD plasticity during the critical period, where it is known that feedforward thalamocortical projections alter their connections to neurons in primary visual cortex. However, we have recently discovered that in contrast to what is generally believed, also within thalamus extensive OD plasticity takes place. This illustrates that even in this well-studied model, the basic principles are still not clear. What connectivity changes underlie perceptual learning, contextual fear learning or unsupervised learning in adulthood is even less well understood.

How plasticity levels are regulated is also not well understood. As explained above, disinhibition enhances plasticity. How disinhibition by specific interneuron subsets enhances plasticity, and how this can be achieved under the relevant circumstances and affect the relevant feedforward or feedback circuits needing adjustment remains unresolved. Moreover, the contribution of other mechanisms than disinhibition in the regulation of plasticity levels, such as axon growth and retraction, synapse maturation or the formation of the extracellular matrix, is unclear and requires further investigation.

The main goal of our research is therefore to gain fundamental scientific understanding on the general principles of how different types of plasticity are achieved through changes in feedforward or feedback connectivity and how these types of plasticity are regulated. We focus on the plasticity of the visual system as model.

This goal is of social relevance (see 3.3 for details). Since maladaptive plasticity mechanisms underlie a number of brain disorders (see below), understanding the overarching principles of plasticity mechanisms provides important future handles for studying the pathophysiology of such disorders. In addition, understanding the mechanisms through which plasticity levels are regulated may ultimately result in the development of approaches to enhance plasticity levels for therapeutic purposes, such as the treatment of neurodevelopmental disorders or improvement of recovery after brain damage.

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?

We aim to increase the knowledge on the general principles of how different types of plasticity in the visual system are achieved through changes in feedforward or feedback connectivity and how these types of plasticity are regulated.

To reach our main goal we formulated the following two sub-aims:

1. How are experience-dependent changes in brain function accomplished by rearrangements of neuronal circuits?

Our goal here is to define overarching principles of how different forms of plasticity (both developmental and adult) are achieved by modification of specific neural circuits. Our working hypothesis is that critical

periods involve rearrangement predominantly of feedforward connections, thus optimizing the circuits to process sensory inputs (Fig. 2). At later stages, associative/feedback connections are the dominant substrates of plasticity, allowing us to make novel associations. To test this hypothesis, we will identify the brain regions involved in critical period plasticity, perceptual learning, fear learning or unsupervised learning based on visual information, study the structural and functional properties of neuronal responses in these brain regions and how these change with learning, and compare the synaptic substrates of plasticity in these different developmental and adult forms of plasticity.

2. What are the cellular and molecular mechanisms that regulate plasticity levels?

Here we aim to understand how regulation of plasticity levels is achieved specifically in those brain regions and synaptic connections relevant for the learned task or function. A major focus will be on the role of disinhibition in this process. Our working hypothesis is that selective regulation of plasticity is achieved by specialized subsets of inhibitory neurons in the visual system. This hypothesis is supported by the finding that cortical (parvalbumin-expressing) interneurons that provide feedforward inhibition regulate plasticity of feedforward connections during the critical periods, while (somatostatin-expressing) interneurons that gate feedback connections regulate perceptual learning in adulthood (Fig. 2). To test this hypothesis, we will induce plasticity using defined plasticity paradigms, and compare how the activity of specific interneuron subsets and/or their synapses in the brain areas undergoing plasticity change. To establish a causal role of these changes in inhibition we will alter the activity of specific interneurons subsets or their synapses and study the effect on information processing and learning. It is also possible that specific signaling pathways are identified that regulate plasticity in defined brain regions or synaptic connections. We will therefore also use genetic or proteomic screening approaches and gene manipulation approaches to study molecular pathways regulating plasticity.

Expected outcome

We anticipate that at the end of this 5-year project we will have clearly defined whether our hypothesis that feedforward connections are the main substrate of critical period plasticity, and feedback connections are the main substrate in plasticity during adulthood is correct or not. We will also have tested whether these rules are limited to the primary visual pathway or whether they can be generalized to other (subcortical) brain regions involved in visual processing. We will also have shown which interneuron subsets regulate plasticity in thalamus and cortex during the critical period and in adulthood. We hope that we can also define roles for interneurons in other brain regions of the visual system, such as the superior colliculus. Finally, we anticipate that we will have identified molecular targets and signaling pathways that specifically affect plasticity of feedforward or feedback connections, or its regulation by specific interneuron subsets and may be relevant for understanding the pathogenesis or developing treatments for neurodevelopmental disorders such as neurofibromatosis type I.

Feasibility

The described research is highly feasible and represents ongoing and future research projects (see appendix "overview DEC proposals" for an overview of the approved DEC proposals that are currently in progress). Our laboratory is experienced and well equipped for performing the research lines. During the last 15 years we have been studying plasticity in the visual system and established a wide range of state-of-the-art experimental approaches enabling us to perform the planned research. These include experimental paradigms to induce plasticity during critical periods (OD plasticity) and in adulthood (lesion-induced plasticity, perceptual learning, habituation), approaches to record neuronal activity in vivo (single- and multiunit recordings, cell-attached recordings, optical imaging of intrinsic signal, in vivo two-photon calcium imaging) or in slices (multi-electrode patch-clamp recordings, field-potential recordings, calcium imaging), two-photon microscopy to chronically image synapse morphology in vivo, gene manipulation approaches (transgenesis, viral vectors, in utero electroporation etc.), immunohistochemistry, tissue clearing techniques, western blotting, etc. All of these techniques have resulted in publications in high impact journals [1,2,5,6,8,15-22]. Our research efforts are embedded in the environment of the NIN, providing excellent infrastructure, technological support and outstanding scientific interactions. Moreover, our research is well-linked within the national and international scientific

community.

The quality of our work is further underscored by the recognition through research funding agencies (e.g. NWO, HBP, EU). The planned research is currently funded by grants from NWO and the EU.

3.3 Relevance

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

Scientific relevance: Uncovering general principles of how neuronal networks can effectively improve their performance through experience will advance our scientific understanding on a fundamental neurobiological mechanism namely the ability of the brain to learn from experience. Our research is not only important for scientists working in the visual system, but for many scientists whose research is related to plasticity mechanisms in other brain regions. Our experiments also have impact on scientists working on artificial intelligence, brain-machine interfaces and neuroinformatics and for software developers making use of these approaches. Our laboratories perform research for the Human Brain Project, in which scientists building brain models rely on experimental information they receive from neuroscience laboratories. Moreover, the Human Brain Project incorporates the knowledge we acquire to develop robots with artificial intelligence.

Social relevance: Our research may, in the long run, have several important therapeutic implications. *First*, critical period plasticity in the visual system is an excellent model for studying the cause of amblyopia ("lazy eye") when vision is impaired during childhood due to misalignment of the optical axes or inequality of refractive power of the two eyes. Amblyopia is the most prevalent (2-4%) visual disorder in young people. Of all amblyopes, 3-18% will become visually impaired in their unaffected eye in the course of their life through injury or illness (like all people), causing binocular visual impairment and severe disability in 1:1000 people. The discovery of novel approaches to reactivate plasticity after critical period closure may result in novel avenues to treat amblyopia in adults. *Second*, various neurodevelopmental disorders such as autism and intellectual disability, have been suggested to be caused by deficits in critical period plasticity. Understanding the principles of regulating plasticity levels may ultimately provide new handles on treating these diseases.

As an example: our work on mice lacking a copy of the Neurofibromatosis type 1 gene, causing autism and intellectual disability in humans, reveals that this deficit increases cortical inhibition and causes precocious critical period closure.

Third, finding approaches to (temporarily) increase cortical plasticity is also important for the development of regenerative and restorative therapeutic approaches. This is especially important for the future treatment of neurodegenerative diseases, improving brain function after physical trauma. In addition, various developments are underway for restoring vision in the blind. This includes reactivation of retinal function using optogenetics, but also implantation of electrode grids in the visual cortex to directly input visual information. These approaches will mostly likely require plastic changes to let the visual system adapt to the new types of the inputs.

The proposed experiments are primarily aimed at answering fundamental scientific questions on visual plasticity and the direct aim is not to develop new treatments. This notwithstanding, we have already found novel approaches to increase adult cortical plasticity and we are testing whether these can be applied to improve brain development in a mouse model of intellectual disability and autism (Neurofibromatosis type 1). This illustrates that our fundamental approach can lead to therapeutically relevant discoveries.

3.4 Research strategy

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

Sub-aim 1. How are experience-dependent changes in brain function accomplished by rearrangements of neuronal circuits?

This issue is addressed in different stages with decision points in between (see Fig. 3). Depending on the current knowledge on a particular form of plasticity or a particular brain region, projects may start at different stages.

A1. To determine how changes in neuronal connectivity result in functional plasticity, an appropriate paradigm is selected for inducing the form of plasticity of interest. The main categories of learning that we address and compare in the visual system are critical period plasticity (by eyelid suture) ([Animal Procedures 3.4.4.1 and 3.4.4.2](#)), lesion induced plasticity (by enucleation or retinal lesioning) ([AP 3.4.4.1 and 3.4.4.2](#)), perceptual learning (using reinforcement to train mice to respond to visual stimuli), contextual fear conditioning (by associating a visual stimulus with an aversive stimulus) and unsupervised learning (by repeatedly providing visual stimuli until the mouse is used to them) ([all AP 3.4.4.3 and 3.4.4.4](#)). The exact paradigm is selected based on the literature or our previous experience. In some cases, novel plasticity paradigms need to be developed, for example to study particular forms of perceptual learning or habituation.

A2. The next steps are aimed at determining the brain region in which the relevant information is processed (A2a) and plasticity occurs (A2b). In most cases, this is known from the literature and the brain region of study is selected together with the plasticity paradigm. However, for some types of plasticity it may be unclear where the relevant information is processed. For example, if a mouse performs a task in which it needs to learn to associate one image with a reward but not another image, one would first need to determine which visual areas are capable of differentiating between the two images. This means that if the function and anatomy of a particular brain region of the visual system is not sufficiently well-documented, we will need to investigate its function in more detail before we can examine its plasticity ([AP 3.4.4.5](#)). It may also be possible that experiments from the lab hint towards plasticity taking place elsewhere than always assumed. Our recent discovery that there is extensive OD plasticity within the thalamus illustrates this. Thus, in cases where the brain region of plasticity is not defined, recordings will need to be performed to identify and characterize regions in which a) the relevant information is processed and b) plasticity takes place. Depending on the brain region and specific plasticity type, our recordings can be done by two-photon microscopy of calcium signals, in vivo electrophysiology approaches or by optical imaging of intrinsic signal ([AP 3.4.4.1, 3.4.4.2, 3.4.4.3, 3.4.4.4, 3.4.4.5](#)).

Only if the relevant brain region is determined, the project is continued to study the nature of the underlying mechanisms leading to plasticity.

A3. We perform experiments to determine where in the circuitry of this brain area plasticity occurs. This analysis can take place at the anatomical or functional level. At the anatomical level this either involves chronic two-photon microscopy of fluorescently labelled neuronal structures, or post-hoc tracing experiments. At the functional level this may involve electrophysiological approaches or imaging approaches to identify the cell types/ synaptic structures that undergo plasticity. The focus will be on understanding whether changes in feedback or feedforward connections dominate and how functional and anatomical changes are related ([AP 3.4.4.1, 3.4.4.2, 3.4.4.3, 3.4.4.4, 3.4.4.5](#)).

A4. Finally, and if an experimental approach is available, we interfere with the observed plasticity in order to study the causal relationship ([AP 3.4.4.1, 3.4.4.2, 3.4.4.3, 3.4.4.4, 3.4.4.5](#)).

An example of our strategy: experiments in the lab suggested that OD plasticity may take place in thalamus. We chose to test this by establishing whether there were binocularly responsive neurons in thalamus. This was confirmed, and the nature of binocular responses was determined. Next it was decided to monocularly deprive mice during the critical period and study changes in binocular responses. We found that binocular neurons in the thalamus become more responsive to the open eye. To determine which inputs have altered (feedback, or feedforward), we plan to repeat the experiment, and measure whether the change in binocularity after deprivation remains the same when the visual cortex (which

provides feedback to thalamus) is silenced. If so, feedforward connections must be altered. Finally, to understand whether plasticity in V1 depends on plasticity in thalamus, we will inactivate plasticity genes (CamKinase II for example) in thalamus and study whether this interferes with plasticity in thalamus and V1

Sub-aim 2. What are the cellular and molecular mechanisms that regulate plasticity levels?

B1. To study how plasticity levels are regulated in a particular brain region, we first select the paradigm and brain region in which we want to address the question. This choice is made based on previous experiments (as described above) or from literature ([AP 3.4.4.1](#), [3.4.4.2](#), [3.4.4.3](#), [3.4.4.4](#), [3.4.4.5](#)).

B2. We will then study how cellular (inhibitory/excitatory balance for example) or molecular (gene/protein expression) properties change under these circumstances. We may study this at the anatomical level (change in synapse number) or functional level (change in synapse function or interneuron activity) or at the protein/gene expression level ([AP 3.4.4.1](#), [3.4.4.2](#), [3.4.4.3](#), [3.4.4.4](#), [3.4.4.5](#)).

B3. Finally, we will interfere with the change in inhibition in order to understand whether there is a causal relationship between the change in inhibition and plasticity and to study the mechanisms by which inhibition regulates plasticity. This will be accomplished by manipulating the activity of specific neuronal populations (opto/chemo-genetics). Candidate genes/proteins may also be selected (from B2) and their function altered in order to test how they regulate functional properties of the relevant brain region ([AP 3.4.4.5](#)) and what their role is in plasticity ([AP 3.4.4.1](#), [3.4.4.2](#), [3.4.4.3](#), [3.4.4.4](#)).

Example: we knew from literature that inhibition regulates OD plasticity. We developed an approach to chronically visualize inhibitory synapses in mice. We used this approach to study the formation and loss of inhibitory synapses in V1 of mice during OD plasticity and discovered that they were rapidly lost during plasticity. To understand whether this relationship is causal, we will now interfere with the stability of inhibitory synapses by molecular intervention to study the causal relationship. We have also interfered with inhibitory interneuron function during the assessment of OD plasticity and found that changes in inhibition do not directly influence OD itself, but only its plasticity.

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 type of experiments we perform to address our research questions are very complex and have many experimental variables although they do not vary much in the degree of discomfort caused to the animals. It is therefore more effective to cluster the experiments based on whether plasticity is induced by visual deprivation ([AP 3.4.4.1](#) and [3.4.4.2](#)) or visual learning ([AP 3.4.4.3](#) and [3.4.4.4](#)), or whether it only involves characterization of the molecular/anatomical or functional properties of a brain region ([AP 3.4.4.5](#)) and on whether the readout is acute ([AP 3.4.4.1](#), [3.4.4.3](#), [3.4.4.5](#)) or involves chronic monitoring of neuronal function or structure and behaviour ([AP 3.4.4.2](#), [3.4.4.4](#)). All our experiments can be characterized by four different components (see Fig. 4):

1. Instrumentalization of the experimental animal.
2. The plasticity paradigm
3. The experimental manipulation
4. The readout

1. Instrumentalization of the experimental animal

Most of our experiments will require some type of gene modification in cells of the brain and/or cranial surgery in order to be able to use the mice for our experiments. Gene modification may be required to alter genes involved in (the regulation of) plasticity, to express proteins required for their visualization (for example by two-photon microscopy) or the modification of their function (for example by optogenetics or chemogenetics). The cranial surgery may be necessary for allowing the visualization of neurons (cranial window implant, or thinning or clearing of the skull), the implantation of a headpost for head-fixation, or the implantation of a recording chamber to allow the insertion of an electrode for

electrophysiological recordings.

Instrumentalization of the experimental animals can therefore involve the following (combination of) procedures:

1a) Breeding of wildtype, inbred and/or genetically modified mice.

1b) In utero electroporation: a limited number of neurons is genetically modified in the brain of embryos. This is achieved by opening the belly of an anesthetized pregnant female mouse, injecting DNA through the uterine wall into the brain ventricles of the embryos, and electroporating the DNA into the cells lining the ventricles. The muscle wall and skin of the belly are sutured closed again and the pups are born several days later, most of them expressing the electroporated DNA in targeted neurons of the brain.

1c) Transduction with viral vectors: a viral vector driving expression of a gene of choice is injected into the brain region to be studied, resulting in the widespread expression of the gene.

1d) Cranial surgery: for imaging experiments, a cranial window may be implanted above the brain region this is to be imaged. The skull can also be made translucent by thinning, or by applying nail polish. In both cases, a head post is attached to the skull allowing fixation of the head. For electrophysiology experiments, a head post and a recording chamber or electrode may be inserted allowing head-fixation and performing recordings.

Combinations of the different genetically modified mouse models are common. In many cases, viral vectors are used that are cre-dependent. These are injected in transgenic mice expressing cre in a particular brain region or cell type. Another example can be the use of in utero electroporation to express a receptor for a virus in a limited number of neurons, followed by transduction using a viral vector later in life that will selectively infect these neurons allowing the tracing of the synaptic inputs these cells receive.

2. Plasticity paradigms:

As explained above, different plasticity paradigms are used.

Visual deprivation paradigms (3.4.4.1 & 3.4.4.2):

2a) OD plasticity is induced by suturing one eyelid closed under anaesthesia. The eye remains closed for several days and is reopened before assessment of visual responses (see below).

2b) Retinal lesions can be made in adult mice. This either involves binocular lesions in the binocular-projecting part of the retinas, or a monocular lesion in the monocularly projecting region (in order to eliminate all retinal input to the cortex responding to a particular region in the visual field). The lesion is made under anesthesia using a powerful laser. Lesion-induced plasticity can also be induced by enucleation under anesthesia.

Visual learning paradigms (3.4.4.3 & 3.4.4.4):

2c) Perceptual learning involves the training of mice in a particular task. The exact task will vary depending on the exact question and experimental readout (see below). In head-fixed tasks, mice first habituate to being head-fixed and in some cases, to walk on a treadmill without being fearful. Then they learn to associate a particular visual stimulus presented to them with a behavioural response (for example, lick left if a square is shown, lick right if a circle is shown). This training involves reinforcement, i.e. reward or in some cases, punishment. Reward usually consists of providing milk through a lickspout. Mice in such paradigms are water-restricted and get most of their fluid intake during the training. Head-fixation is required for many types of imaging or electrophysiology (see below). Head-fixation is not always necessary. In such cases, training may take place in a home cage or specialized environment.

2d) Visual fear learning involves pairing a particular visual context with an aversive stimulus. Upon conditioning, the mouse will show freezing behaviour upon seeing the conditioned visual stimulus.

2e) Unsupervised learning lets mice get used to visual stimuli that are novel or naturally perceived as threatening. A threatening stimulus can be a disc increasing in size projected on the top of the cage or a fly-over stimulus. These stimuli resemble approaching predators.

In many cases the paradigms will be carried out while the mice are head-fixed, allowing us to monitor or manipulate neuronal activity or morphology (see under 4) while plasticity is being induced.

3. The experimental manipulation

In order to causally test the involvement of a particular cell type or protein in the processing of relevant information or (the regulation of) its plasticity we use several approaches to interfere with the function of specific neurons or proteins.

To achieve this we use the following tools:

3a) Focal modulation:

We will locally stimulate or inhibit neural activity using transcranial, local and intracellular electrical stimulation and inactivation, and focal ultrasound delivery.

3b) Activation of designer proteins

We will activate designer proteins that have been expressed in the instrumentalization phase. We use different types of such proteins:

Optogenetics: after expressing light-sensitive proteins in specific neuronal subsets, their activity can be increased, decreased or more selectively modulated by shining light on them.

Chemogenetics: after expressing receptor proteins that bind a ligand that has little or no biological effect on other cells in the body, the ligand can be administered to the mouse resulting in the activation, suppression or more selective modification of neuronal function.

Ultrasound-mediated neuronal modulation: novel approaches for modifying neuronal activity are developing rapidly. One such development is the expression of mechanoreceptors that modify neuronal activity in an ultrasound -manner.

3c) (Opto)pharmacology: Pharmacology will be applied to alter neuronal activity or to target specific receptors. In some instances, Optopharmacology will be used (these are pharmacological agents that are activated by light).

3d) Housing conditions: By changing the conditions under which the mice are housed, plasticity levels can be manipulated. Environmental enrichment is known to alter the inhibition/excitation balance and to affect plasticity (this is illustrated by our finding that environmental enrichment reduces inhibition in NF1 mice and normalizes critical period closure in these animals). It has also been shown that rearing mice in complete darkness can keep the critical period for OD plasticity open. Housing adult mice in complete darkness can reopen the critical period.

4. The readout

The readout of neuronal activity in a particular brain region can be measured by various approaches. Each approach has its strengths and weaknesses, and which approach is used depends on the exact question and the brain region.

Acute assessment of molecular or neuronal properties using electrophysiology, histology or molecular analysis (3.4.4.1, 3.4.4.3, 3.4.4.5):

4a) In vivo probe recordings: this involves the introduction of an (multi-array) electrode into brain of the mouse and record electric activity of neurons, or an electrochemical probe for voltammetry. Before or during the recording session, the mouse is anesthetized, a hole is drilled in the skull and the electrode is inserted (see under 1d). Acute recordings are performed in awake or anesthetized mice and the animal is sacrificed immediately after completion of the recordings.

4b) Acute imaging of intrinsic signal or fluorescent indicators of neuronal activity. Optical imaging of intrinsic signal involves measuring the reflectance of red light shone on the brain. Changes in blood oxygenation and hemodynamics due to neuronal activity alter the light reflectance. For acute imaging, the scalp of the mouse is removed under anesthesia and the mouse is placed in the imaging setup and recordings take place for several hours while visual stimuli are presented.

Two-photon microscopy of neuronal activity: in these experiments two-photon microscopy is employed to detect changes in neuronal activity. To be able to detect neuronal morphology or activity, a fluorescent reporter is required. This can be a chemical reporter, which needs to be loaded into the brain before the onset of the recording. This is achieved by injection of the dye into the brain using a pipet while the mouse is under anesthesia. In most cases, however, genetically encoded reporters are used based on fluorescent proteins. Expression of these proteins thus requires gene transfection using viral vectors or in utero electroporation, and/or the use of transgenic mice. These procedures have to take place well before the measurement takes place. The recordings generally take place in head-fixed mice (see above), under anesthesia or in awake mice in which a cranial window has been implanted. A head stage is also implanted for fixating the head under the microscope or wide field imaging setup. Visual

responses are elicited by presenting visual stimuli to the mouse. Two-photon microscopy of calcium signals allows measuring the activity of hundreds to thousands of individual neurons in real time. Wide field imaging of fluorescent markers for neuronal activity makes use of the same principles as two-photon microscopy, but at a different scale. This approach involves macroscopy and does not allow activity measurements at the single cell level, but at the population level. The advantage is that imaging of a much larger part of the cerebral cortex of the mouse can be imaged. Also for widefield imaging, the skull needs to be made translucent, either by the implantation of a cranial window or by application of agents rendering the skull translucent.

4c) Slice electrophysiology: mice are anesthetized and sacrificed, and the brain is rapidly removed, cooled and sliced. The brain slices can then be used to record neuronal/synaptic activity by electrophysiology or to acutely induce plasticity by electrical stimulation.

4d) Tissue extraction: to isolate RNA, DNA or proteins from tissue the mice are anesthetized and sacrificed, and the tissue is removed. In most cases the tissue is then snap frozen and stored for later extraction of the required molecular components.

4e) Histology: to collect tissue for histology, the mice are anesthetized and perfused with fixative. The tissue is then removed and post-fixed after which it is sliced and stained using immunohistochemistry. This approach is essential for anatomical and molecular assessment of brain tissue.

In many cases, combinations of the above will be used, such as histology after an in vivo electrophysiology experiment.

Chronic recording of neuronal activity and morphology (3.4.4.2, 3.4.4.4).

4f) In vivo probe recordings: (see 4a). Mice undergoing chronic recordings, have been implanted with a recording chamber or electrode (see 1d). The electrode may either be implanted chronically, or, alternatively, a recording chamber is implanted and the electrode is inserted only during the recording after which the whole is closed with bone wax. In both cases, the recording can be done repeatedly in awake, behaving mice or in anesthetized mice. This read-out may be followed by a final (acute) readout session described under 4a through 4e.

4g) Optical imaging of intrinsic signal (see above) can also be performed chronically. In this case skull clearing or cranial window implantation is performed as described above and a head-post needs to be implanted.

Two-photon microscopy of neuronal structure and/or neuronal activity: in these experiments two-photon microscopy is employed in the same way as described in 4b. However, the recording is performed repeatedly in awake or anesthetized animals, allowing us to detect changes in neuronal morphology (such as synapse size or density) or neuronal activity over prolonged periods of time. A cranial window and head-post is inserted as described under 1d. In case repeated imaging in deep structures of the brain is required, a guide tube for a GRIN lens is implanted in the brain, allowing chronic and repeated insertion of the lens.

Finally, wide field imaging of fluorescent markers for neuronal activity (see above) can also be performed chronically, in which case a head-post needs to be implanted. This read-out may be followed by a final (acute) readout session described under 4a through 4e.

Again, combinations of these techniques are often used: for example optical imaging of intrinsic signal to determine the retinotopy of V1 (i.e. how the visual field is processed within V1) followed by two-photon microscopy of fluorescently labelled neurons, or electrophysiological recordings of neurons that are fluorescently labelled for chronic imaging.

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.

This project includes all steps from developing plasticity paradigms, to identifying the relevant brain regions and neural substrates mediating and/or regulating learning, the testing of causal relationships, and investigating errors in neurodevelopmental disorders as described above.

The first subaim (Fig. 3A) is to compare how different forms of plasticity are mediated by changes in neural connectivity. In many cases, we will make use of established plasticity paradigms, such as OD



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'. | 80100-KNAW | |
| 1.2 Provide the name of the licenced establishment. | KNAW | |
| 1.3 List the serial number and type of animal procedure. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i> | Serial number | Type of animal procedure |
| | 3.4.4.1 | Readout after visual deprivation: acute in vivo or ex vivo assessment of neuronal function or anatomical/molecular make-up in control mice and mice after plasticity induction by visual deprivation. |

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 aim of this procedure is to measure the effect on neural structure and function by an experimental manipulation in mice after plasticity induced by visual deprivation.

The general design has the following components:

1. Instrumentalization of the experimental animal
2. Plasticity paradigm - visual deprivation
3. Experimental manipulation
4. Readout - acute session

We will first describe the specific aims of these components. The procedural details are given later following this section.

1. Instrumentalization of the experimental animal

Our experiments will use mice as experimental animal. We will use wild type animals (e.g. C57Bl/6), mouse strains carrying spontaneous genetic mutations (e.g. albino mice) and genetically modified mice to allow optical recording or to disturb the system. The genetic manipulation can have several aims:

- To express proteins, such as genetically encoded calcium indicators, that allow optical recording of neural activity
- To express fluorescent proteins, such as GFP, to label neurons for optical identification.
- To express light or ligand activated proteins, such as channelrhodopsin, halorhodopsin and DREADD, to influence neural function

- To knock-out, alter or express proteins that allow us to understand their role in information processing or plasticity in health and disease

We will use three ways to introduce genetic alterations.

1a. Transgenic mouse lines, without any additional experimental procedure.

1b. In utero electroporation, i.e. using animals in which vectors (including viral vectors) have been injected while they were embryos.

1c. Viral expression, i.e. using virus injections (juveniles – adults)

Procedures 1b and 1c may be happening in transgenic animals. To restrict the expression of genes to specific brain area, cell-types or period, we will make use of conditional expression techniques such as the cre-lox system. In addition to restrict the temporal expression we may use delivery of agents such as doxycycline. Any combination of procedures 1a, b and c may occur.

For most of our experiments it is necessary to do

1d. Cranial surgery to apply a head fixation post and create a cranial recording window or chamber.

We will head-fix the mice during some of the plasticity paradigms and recording of neural activity, because the presentation of sensory input, like visual stimuli, is easiest to control in a head-fixed animal. For this reason, under anaesthesia, we will attach a head-fixation device directly to the animal's skull and perform cranial surgery if necessary. The aim of this procedure is to allow painless and strong head-fixation of an anesthetized or awake animal and to allow insertion of probes or allow optical recording.

This procedure can involve a combination of the following sub-procedures:

- Attachment of head fixation post
- Making a cranial window for optical recordings
- Making the skull transparent for optical recordings
- Making a cranial chamber for probe recordings
- Permanent insertion of a fibre, cannula or probe into the brain.

This procedure may take place before the visual deprivation and experimental manipulation, or at the start of the acute in vivo readout session.

2. Plasticity paradigm – Visual deprivation

We study the mechanisms of plasticity in the visual system. With this aim, we use the following common manipulations to induce plasticity by visual deprivation:

2a. Monocular deprivation, by eyelid suture or intraocular injection.

2b. Retinal lesion, by laser photocoagulation, injections or enucleation.

3. Experimental manipulation

We will perturb the brain by modulating signal processing using a variety of non-physiological means.

The specific aim of these manipulation is one or more of the following

- To study the role of a class of neurons or area of the brain
- To study the role of a gene, protein or molecule
- To alter brain development and function

For modulating neural processing, we will use one or more of the following techniques

3a. Focal modulation

3b. Activation of designer proteins

3c. (Opto)pharmacology

3d. Non-standard housing conditions

4. Readout – Acute

The readout in these animals can involve measurements in a single acute in vivo experiment and a series of ex vivo analyses. These consist of a combination of the following procedures:

4a. Acute in vivo probe recording, measurements in awake or anaesthetised mice using a recording probe, e.g. an extracellular electrode, an intracellular pipette, or an electrochemical probe.

4b. Acute in vivo imaging, optical measurements in awake or anaesthetised mice of brain structure and activity. Examples are imaging of GFP or genetically coded calcium indicators in a selection of neurons, or wide-field intrinsic signal imaging.

4c. Slice physiology, where after euthanizing the mouse, its brain is sliced and used for electrophysiological and optical measurements of cellular activity and connectivity.

4d. Molecular analysis, where after euthanizing, the brain is processed to measure the molecular content in specific brain areas or cell types.

4e. Histology, where after euthanizing, the brain is sliced and possibly stained using immunohistochemistry or in situ hybridization and subsequently imaged.

The primary outcome of the experiments is the role of specific classes of neurons, brain areas, molecular, genes or proteins in visual processing. The primary outcome parameters for the recording and imaging experiments are the neuronal spiking or synaptic activity, or measurements of field potential or neurotransmitter release of specific groups of neurons. For the molecular analysis, this will be mainly the expression levels of specific genes or proteins in defined brain areas and specific neuronal groups. For the histology, this will be expression levels and connectivity of specific brain areas and neuronal populations. The histology may also be used to determine the success of the experimental manipulation, especially during the phase of the experiments that we are introducing and optimizing a (novel) technique.

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

1. Instrumentalization

We need to instrumentalize the mouse by using genetic manipulation and cranial surgery to make it possible to record from the brain or to perturb its function. Using genetic manipulation, we will express different classes of proteins:

Fluorescent proteins. Among these are proteins that constitutively fluorescent like the XFP family (such as eGFP, tdTomato and others), activity dependent fluorescent proteins (like GCaMPx and voltage-sensitive fluorescent proteins) and proteins that fluoresce if specific signal-cascades are activated (like Glu-sniffer or cAMP-dependent fluorescent proteins).

Designer signalling proteins to manipulate the responses and signalling in cells. Among these are proteins that can be activated by light (optogenetic proteins) or other means (such as sound) to allow ion flow (like ChR2 and variants), produce ion transport (like halorhodopsin, Arch, Shark and variants) or initiate a signalling cascade. A second subgroup are designer proteins, which allow ion flow, produce ion transport or initiate signalling cascade when activated by a ligand, such as CNO.

Variants of endogenous signalling proteins. We will also study the role of specific naturally occurring proteins in sensorimotor transformations. To study these proteins, we will overexpress the proteins themselves or altered versions of them (like constitutively active variants or dominant negative version). Among the proteins that we study in this way are BDNF, NF1 and GABA receptors.

The expression of these proteins will be done by three procedures listed below.

The percentage behind all the procedures is our estimate of the fraction of mice described in this appendix that will undergo the particular procedure. In these percentages we leave the in utero electroporation mothers out of the consideration. In the calculation of the number of mice, we do include these mothers.

Procedure 1a. Mouse lines. (instrumentalization for 100 % of the mice)

We will use wild type, spontaneous mutant and inbred mice and transgenic and knock-out/knock-in mouse lines.

Wild type, spontaneous mutant and inbred lines. For many experiments we can use standard inbred (or outbred) lines, such as C57Bl/6 which are commonly used for mouse vision and plasticity research. For some experiments, it is beneficial to use different inbred lines, such as CBA for in utero electroporation. In addition, we use inbred lines which have a naturally occurring mutation with an effect on plasticity in the visual system, such as ocular albino strains or slow-Wallerian degeneration mice; these lines have no affected phenotype causing discomfort.

Transgenic and knock-out/knock-in mice. In many cases we make use of genetically modified mouse lines. These mouse lines may express proteins to assess neuronal morphology or -function, designer proteins to alter neuronal function, or mutant forms of endogenous proteins. Cell-type- or brain-region-specific expression and temporal control is achieved by the use of appropriate promoters driving these genes, or making use of conditional gene expression systems. This may involve inducible promoters such as the tetO/tTA system or DNA-recombinases such as cre- or dre-recombinases or flippase. For conditional mutant mice, interbreeding of two or more mouse lines is required in order to achieve the required gene modification in the appropriate cell type or brain region.

Procedure 1b. In utero electroporation. (instrumentalization for 40% of the mice)

To express fluorescent proteins, designer signalling proteins or variants of endogenous signalling proteins we will use in utero electroporation where DNA or virus is injected into one of the brain ventricles of an

embryo and voltage pulses are used to transfect neurons and glial cells lining the ventricles.

Pregnant mice around two weeks of gestation (dependent on the targeted area or cell type) are anaesthetised. A midline abdominal incision is made to expose the uterine horns. A solution of the encoding plasmid and a colouring agent (like Fast Green) is injected in of the brain ventricles of the embryos through a capillary pipette. Electroporation is done with a series of pulses with a pulse generator. After electroporation the uterine horns are placed back in the abdominal cavity and abdomen is sutured, and the animal recovers from surgery. During the surgery care embryos are kept moist with warm saline, and handling is kept to a minimum. Animals are kept on a euthermic pad during the surgery, and receive postoperative analgesia.

Procedure 1c. Viral expression. (instrumentalization for 50% of the mice: all ages)

To express fluorescent proteins, designer signalling proteins or variants of endogenous signalling proteins we will use injections of different viruses, which each have specific advantages:

Viral vectors to obtain broad expression, such as AAV vectors. Serotypes will include AAV2/1, AAV2/5 and AAV2/9 and possibly others depending on the targeted area and cell classes. Viral transfections depends on the combination of serotype, area, and cell classes and are made into the brain or eye.

Retroviral vectors when integration of the plasmid is necessary for lineage studies, such as lentiviruses.

Retrograde viral vectors for connectivity studies, such as CAV viruses and some AAV serotypes.

Transsynaptic viral vectors for cell-specific connectivity studies, such as EnvA-pseudotyped rabies viruses. To comply with GGO rules it may be necessary to obtain a blood sample from a viral injected animal to assess the viral load in the circulation; maximally 100 ul from tail of facial vein.

For viral injections, mice are anesthetized. Pups (P0-P5) are sedated by hypothermia. For intracranial injections, one or more small craniotomies are made to allow insertion of a micropipette to the targeted brain area. Using a micro-volume injector small amounts of a solution containing the viral particles are inserted (less than 1 microliter) into the brain or eye. After the injections, the skin is sutured if necessary and the animal is allowed to recover. Analgesia is given if necessary. The virus is allowed to express for several days or weeks depending on the type. For the majority of the experiments, an injection session suffices, but for transsynaptic tracing such as those involving EnvA-pseudotyped rabies virus and a helper virus, two sessions are necessary.

Procedure 1d. Cranial surgery. (instrumentalization for 80% of the mice: all ages)

For recording neural activity and for delivering reproducible stimuli, it is often necessary to head fix the animal. For optical recording it is necessary to remove the skin and place a cranial (glass) window or make the skull transparent. For repeated electrical recordings it may be necessary to make a cranial chamber. For later manipulation or recording brain activity, it may be necessary to implant a fibre or probe into the brain and attach it to the skull. The surgical procedures below all require surgical anaesthesia and can be combined into a single surgical session for the majority of mice, and will maximally be done in two sessions. The entire surgery takes between 15 minutes and 4 hours.

Surgical procedure. The mouse is anesthetized and placed in a stereotact. The scalp is incised and possibly partially removed. After one or more of the procedures below, the skin is sutured, if necessary, for juvenile and mature animals. For pups, natural healing is expected to occur unassisted. Next, the animal allowed to recover. Analgesia is given if necessary. The animal is on a feedback-controlled heating pad during the procedure and recovers in a warm environment.

Attachment of head fixation post. Part of the scalp is removed and a metal handle is attached to the skull by glue and/or dental cement to allow later fixation to the setup.

For all experiments where mice will later be head-fixed while awake, the surgery is followed by a period of handling the animal and letting it become accustomed to being head-fixed.

Making a cranial window for optical recordings. First a small craniotomy is made. For imaging of individual cells and subcellular structures, the craniotomy is covered by a glass coverslip, permanently secured by glue and/or dental cement.

Making the skull transparent for optical recordings. The skull is covered by a layer of acrylic glue and polishing factor (such as nail polish). After drying, the skull is polished. This allows wide-field imaging of neural populations.

Making a cranial chamber for probe recordings. A small part of the scalp is removed. A small wall of dental cement is applied surrounding a small craniotomy. The craniotomy is covered with a removable substance (like silicon or bone wax) and which is possibly covered by another, but also removable, layer of harder material (like dental cement or epoxy). For added stability, miniscrews could be screwed into the skull after drilling to anchor the head fixation post. These screws may also be used as ground or reference contact points for electrophysiology.

Insertion of a probe, cannula, fibre or imaging accessories into the brain. A small craniotomy is made and a (electrode) probe, cannula, fibre or imaging accessories (such as a GRIN lens or microprism) or is inserted into the brain using a micromanipulator. The top of the probe, cannula, fibre or imaging accessory is then attached to the skull, and possibly covered.

2. Plasticity paradigm – Visual deprivation

For inducing plasticity by visual deprivation, we use two procedures. We have experience with both procedures and there is already an extensive literature using both procedures.

Procedure 2a. Monocular deprivation. (procedure for 95% of the mice)

The mouse is anesthetized and its temperature is maintained. One eyelid is sutured closed. Alternatively, an inactivating drug may be injected intraocularly to obtain silencing of retinal responses. After the procedure, the mouse recovers from anaesthesia. Perioperative analgesia is applied if necessary. The surgery takes about 30 minutes. The lid suture procedure may be followed by a later session under anaesthesia to reopen the sutured lid. In a minority of the experiments, this could be followed by another session of monocular deprivation of the same or the other eye.

Procedure 2b. Retinal lesion. (procedure for 5% of the mice)

The mouse is anesthetized and its temperature is maintained. The mouse is placed under a microscope. Monocular or binocular retinal lesions are made by laser photocoagulation or drug injection. Alternatively, one or both eyes are enucleated. For enucleation, post-surgical analgesia is given. After the procedure, the mouse recovers from anaesthesia. This procedure happens only once per animal. The surgery takes about 15 minutes.

3. Experimental manipulation

We may perturb the brain acutely or chronically to manipulate information processing and plasticity, using the following methods, mostly applied alone but also in combination (estimated less than 10%).

Procedure 3a. Focal modulation (experimental manipulation for 10% of the mice)

We will locally stimulate or inhibit neural activity using transcranial, local and intracellular electrical stimulation and inactivation, and focal ultrasound delivery. Focal modulation is typically applied for short intervals in the order of seconds, but these intervals can be repeated for several minutes. Typically focal modulation is done during readout, and will have a similar frequency.

Procedure 3b. Activation of designer proteins. (experimental manipulation for 30% of the mice)

Following the expression of designer proteins, we will activate them. This can be using non-invasive means such as the applying light (for optogenetic proteins) through the air or through a fibre, or sound (for mechanogenetic proteins) onto the skull, or by injecting or supplying the ligand (such as CNO in the case of DREADDs) to the animal. The ligand delivery can be by food or liquid supplements, systemic i.p. injections, local delivery through a cannula in the awake animal, or local delivery during the readout session. The effect of activation will depend on the specific designer protein expressed, but could be a change in the membrane polarization or the (de)activation of an intracellular signalling cascade. The activation should have little side effects apart from activating the designer proteins. Light or sound are typically applied for short intervals in the order of seconds, but these intervals can be repeated for several minutes. The application is usually done during readout, and will have a similar frequency. Supplying a ligand using food or liquid supplements, systemically or via a cannula will usually be only during one single period in the experiment, but this period can last a number of days. We will choose the administration route that causes the least discomfort while providing a delivery of a sufficient and consistent dose.

Procedure 3c. (Opto)pharmacology. (experimental manipulation for 20% of the mice)

We will administer or focally apply drugs and control substances. The drugs will target the nervous system and modulate synaptic transmission (for instance NMDA-receptor antagonists and GABAR agonists), neuromodulation (e.g. cholinergic, serotonergic, dopaminergic) or other neural functions, but also include silencers and excitotoxins (like ibotenic acid). Furthermore, we use drugs preventing or inducing the expression of genes (inserted through procedure 1) such as doxycycline or tamoxifen. The drugs could also be photoactivatable, where the extent of activation will be controlled by light-activation. Control substances could be regular saline, or saline with the same solvent, or non-active compound that is used for the drug delivery. Administration routes will generally be one or more intraperitoneal injections, food or liquid supplements, or local delivery through a cannula in awake animals or local delivery during readout. Supplying a ligand using food or liquid supplements, systemically or via a

cannula will usually be only during one single period in the experiment, but this period can last a number of days. We will choose the administration route that causes the least discomfort while providing a delivery of a sufficient and consistent dose.

Procedure 3d. Non-standard housing conditions. (experimental manipulation for 20% of the mice)
Housing can have an influence on brain development and function. Commonly we will use standard housing conditions, but we will also use non-standard housing conditions. In particular, we will use three common procedures, with which we have previous experience.

Dark rearing. Pregnant mothers are placed in a completely dark environment. Pups are born and raised in this dark environment. Cage changing and food and water delivery will be done in dim red-light conditions, which should be not visible to mice. Dark rearing has been shown to delay maturation of the visual system.

Dark housing. Animals are housed in a completely dark environment for several days. Cage changing and food and water delivery will be done in dim red-light conditions, which should be not visible to mice. Dark housing has been shown to enhance plasticity in the visual system.

Environmental enrichment. Animals are housed in large enriched environment providing ladders, boxes, wheels and other accessories. Environmental enrichment has previously been shown to have a positive effect on visual plasticity.

4. Readout – Acute

To determine the effects of visual deprivation, we make a number of physiological measurements using common procedures for which we have much experience. The measurements can be combined, and therefore the percentages for frequency of the procedures add up to above 100%.

Procedure 4a. Acute in vivo probe recording. (readout for 50% of the mice)

In a single head-fixed session, directly followed by euthanasia, we will record brain activity using an invasive probe, such as an extracellular microelectrode, intracellular pipet or electrochemical probe. The recording session can start with induction of anaesthesia, but may also be in an awake animal. For most awake experiments, the cranial surgery will have taken place multiple days or weeks before this recording session. For experiments, that only require recording under anaesthesia, the cranial surgery as described in procedure 1d may be performed at the start of this acute session. The recording probe may already be in place at the start of the session or will otherwise be inserted through the craniotomy that was made as described in procedure 1d.

Procedure 4b. Acute in vivo imaging. (readout for 50% of the mice)

In a single head-fixed session (possibly combined with procedure 4a), directly followed by euthanasia, we will use a microscope or a macroscope (low magnification imaging setup) to image structure and activity of the brain using, for instance, intrinsic signal, flavoprotein, fluorescent dyes or fluorescent proteins. The imaging session can start with induction of anaesthesia, but may also be in an awake animal. For most awake experiments, the cranial surgery will have taken place multiple days or weeks before this recording session. For experiments that only require recording under anaesthesia, the cranial surgery as described in procedure 1d may be performed at the start of this acute session. We will use the cover slip or other imaging accessories (such as GRIN lens or microprism) that have been placed during the instrumentalization procedure of the animal. To image deeper than a few hundred microns, we may also remove part of the overlying brain structures in experiments under anaesthesia.

Procedure 4c. Slice physiology. (readout for 10% of the mice)

Mice are anesthetized (possibly following procedures 4a-b) and euthanized by decapitation. The brains will then be dissected and sliced for acute slice physiology experiments. In the slices we will measure activity at the network, cellular and synaptic levels using electrophysiology and imaging.

Procedure 4d. Molecular analysis. (readout for 10% of the mice)

Mice are anesthetized (possibly following procedures 4a-b) and euthanized by decapitation. The brains will then be dissected and processed to determine protein, DNA, RNA or biochemical content.

Procedure 4e. Histology. (readout for 50% of the mice)

The animal will euthanized with an overdose of anaesthetic and when it is sufficiently deeply anesthetized, it will be transcardially perfused with PBS and fixative (such as 4% PFA in PBS). After the perfusion the brain is removed from the skull and kept for a period to enhance fixation. Typically, the brain is then sliced and stained using standard immunohistochemistry protocols. The stained slices are then mounted on microscope slides and imaged using a microscope. We will also use tissue clearing

methods on whole brains or large tissue sections, before staining.

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

Pilot experiments

Statistical methods do not apply. Establishing new manipulations requires testing and adaptation based on obtained results. Adapted procedures are then tested in new groups, until the full procedure is established and formal experiments can start.

Initial qualitative analysis

When experience with a certain test is limited to pilot experiments or indicates high variability, the number is based on pilot studies and on literature data.

Quantitative analysis

When experience allows the calculation of numbers of animals to obtain a certain effect with statistical significance, we perform a power analysis to ensure that we use the minimum number of animals per group that will be statistically sound and biologically relevant.

B. The animals

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

Species and origin

We will use mice (*Mus musculus*) in these experiments. This choice is based on the amount of fundamental knowledge that exists about the anatomy and physiology of the mouse brain and the availability of sophisticated technologies for investigating brain mechanisms, including a variety of genetically engineered strains. We include different mouse lines, including wild-type (e.g. C57Bl6) and genetically modified animals. The choice of transgenic animals depends on the specific research question. For example, if we need to measure activity of specific neurons, we can make use of transgenic mouse line that expresses, for example, a calcium indicator in a specific subclass of interneurons. We will carefully consider the best mouse model for every research question separately, taking latest developments into account. All mice are derived from the NIN, an establishment licensed by the NVWA, or from a registered commercial company.

In the animals in which variants of endogenous proteins are expressed or knocked-out it may be possible that there is discomfort as a result of an affected phenotype, but no discomfort is reported for any of the lines that we intend to use. For this protocol we assume that there is no congenic discomfort for the breeding of any of the lines. New lines will be monitored for two generations and the outcome will be presented to the IVD. In the unlikely event we want to use a strain with congenital discomfort we will add an addendum for such a mouse line to the CCD protocol.

Sex

For readout, we will use both males and females from the animal lines that are bred in-house, to reduce the number of surplus animals. For most of our questions in our line of research (plasticity in the visual system) we do not expect any differences between genders. However, we will document the gender and investigate if there are any gender differences that are relevant for our research questions. If so, we will ask for approval of the IVD to only use mice of the appropriate sex for such experiments.

Life stages

We will only do experiments involving visual stimulation in animals after eye opening. Mice open their eyes not before postnatal day P10, but manipulations may need to be done earlier, e.g. transfection takes several days after viral injection. The majority of mice will consist of adults and juveniles after weaning at P21. In mice, vision deteriorates with age, so most experiments will be in mice that are less than 1 year old. In utero electroporation will take place in embryos not younger than E10. Mothers used for in utero electroporation will be adult.

Animal number

The estimate of the total number of experimental groups is primarily based on our experience over the past years performing very similar experiments. There are about a dozen researchers in our laboratories.

We expect them together to do about 5 separate experiments (e.g. the role of a specific gene in plasticity in a visual area) with this procedure per year. Based on previous experiments over the last decade, we estimate that we need about 50 animals for the readout per experiment. This would amount to $50 * 5 * 5$ (animals/experiment * experiments/year * years) = **1250 animals**. We estimate that 1 out of 5 experiment use in utero electroporation, i.e. 250 animals. Based on previous experience, we obtain about 3 usable electroporated pups per mother. We would thus require $250 / 3 =$ **83 mothers**. The requested number of animals is thus $1250 + 83 =$ **total 1333**.

When possible, we will at the start of an experiment carefully determine the number of animals needed with a power-analysis, or we will start with a pilot-experiment. We will stop the experiments once the aims of the experiment have been achieved and not use further mice.

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

To disentangle the brain mechanisms that underlie plasticity in the mammalian visual system, we cannot use cell cultures or animal species with a very different visual system such as other vertebrates that lack a cerebral cortex. Intact brains of awake animals need to be studied to understand how brain activity underlies visual perception and learning. We can only study the cellular level and, in particular, the contribution of specific cells types (e.g. the interneurons) and changes in the connectivity that result from plasticity in mice due to the powerful methods that exist in this animal model (e.g. calcium imaging, 2-photon imaging, optogenetics, transgenic animals). The possibilities for invasive measurements in the human brain are limited. Furthermore, there are no models available with enough level of accurate detail to answer the same questions. Hence, the replacement of the mice needed for these experiments, is not possible.

Reduction

We reduce the number of animals to the minimum possible. First, we will calculate the number of animals needed to achieve a certain statistical power beforehand, in case we know the effect size. If the effect size is unknown, we will first do a pilot experiment using only a few animals to determine the expected effect size. Second, we will use both male and female mice whenever possible to reduce the number of surplus animals. Third, whenever possible we use animals for both in vivo and ex vivo studies.

Refinement

We use a collection of the newest genetic techniques to make our experimental manipulations as specific as possible. Furthermore, all surgeries will be carried out by persons who are well trained. Animals are housed in cages with cage enrichment in order to keep them engaged which we believe to reduce discomfort of living in a cage and improve cognitive capabilities.

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

Animals will be housed socially, unless it is impossible because of the risk of damage to a specific cranial implant or eye suture. Our experience shows that mice with simple cranial windows and head posts can continue to be housed socially.

During surgeries, analgesics and anaesthesia are used to minimize pain and suffering. Breathing and temperature will be registered and level of anaesthesia and warmth of heating-pad will be adjusted as such. Peri-surgical analgesics will be administered if necessary and animals will wake up in a warm environment. Care will be taken to facilitate easy access to food and water. Mice will be allowed to recover for at least two days following surgery. Behaviour, wound area, weight and appearance will be monitored daily at least for 3 days post-surgery and longer for surgeries that would have a longer chance of complications.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

The proposed experiments are fundamental research, and are not legally required.

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.

For some cranial implants, it may be necessary to house mice solitarily after a surgery or brain injection to prevent cage mates damaging surgical wounds or the implants. In such solitary housing, although animals will be physically separated, they will be able to see, smell, and hear other animals in the stable. Mice cage will be enriched by bedding material and also running wheels, pipes and/or shelters when possible.

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.

During surgery we will use adequate anaesthesia and analgesia. Also post-surgery analgesics will be administered. Furthermore, before killing any mice, they will be deeply anesthetized.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Infections.

In rare cases there is a possibility of infection around the wound area. In these cases, we will apply additional analgesics and/or antibiotics. Visible signs of pathogenesis will be monitored. The following will be considered as signs of an unhealthy state of the animal: aberrant behaviour, dehydration, weight loss, nose and mouth discharge.

Insufficient recovery after surgery.

Applicable if an animal shows weight loss (more than 15% of its post-surgery weight within two days, or more than 20% in total). This occurs infrequently (<2%).

Head post detachment.

If the head post breaks off, the animal is immediately anesthetized to allow assessment of the discomfort level. If the head post becomes loose/detached due to bad adhesion to the skull we are able to reattach the head post in an immediate repair surgery. The repair surgery is performed under anaesthesia and with analgesia in an identical fashion to the original attachment surgery, with the exception that the skin does not need to be cut, this makes the repair surgery both shorter in duration and less invasive than the original implantation surgery. We estimate the discomfort to be moderate during recovery from the anaesthesia (1 day) becoming mild for 1-2 days. In the rare case (<2%) that the detachment of the head post damages the skull, the mouse is immediately euthanized under anaesthesia.

Reopening of craniotomy.

In rare cases (<5%), the craniotomy is reopened causing moderate discomfort. In these cases the mouse is immediately euthanized under anaesthesia.

Explain why these effects may emerge.

Mild to moderate discomfort due to unintended effects as described above can occur in a small percentage of mice. The head post can become loose due to the forces exerted by the mouse on the head post while fixed in the set-up.

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

We monitor the animal's behaviour, wound area and physiology in these days after surgery. The surgeries are performed using adequate surgical procedures in semi-sterile conditions and without unnecessary delays to minimize the amount of time the animal is under anaesthesia. Animals will be monitored daily and if adverse effects are present, this will be discussed with the IVD and/or veterinary officer. If necessary, treatment will be initiated (topically or systemically applied medication).

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.

Each animal that undergoes surgery will be monitored for clinical parameters. The mice will be monitored for their general appearance and activity level. If a mouse has an appearance that gives cause for concern (e.g. signs of infection around the wound, hair standing up or sunken flanks, reduction in activity level) then we will notify the IVD. Similarly, if the animal does not recover well from anaesthesia we will evaluate the animal together with the IVD.

In addition, the weight of the animal will be monitored and if the animal loses 15% of their weight in two consecutive days or if the animal loses more than 20% of their weight throughout the course of the experiment then the IVD will be contacted and a decision will be made whether a humane endpoint has been reached. If the headpost breaks off damages the skull or reopening of the craniotomy occurs, the mouse will be immediately euthanized.

Indicate the likely incidence.

Humane endpoints are expected to be met in 0-5% of the animals tested within time frame of the experiments.

K. Classification of severity of procedures

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

The cumulative discomfort for all mice, including mothers, in this appendix is **moderate**.

The discomfort levels of individual procedures is as follows:

1a. Transgenic mouse lines.

No discomfort is expected.

1b. In utero electroporation.

Moderate discomfort from surgery is expected for all mothers. Mild discomfort is expected for the embryos.

1c. Viral expression.

Moderate discomfort (for 1-2 days) becoming mild (for 2-3 days) is expected for intracranial viral injections. The procedure is combined with 1d whenever possible.

1d. Cranial surgery.

Moderate discomfort (for 1-2 days) becoming mild (for 2-3 days) is expected for intracranial viral injections. The procedure is combined with 1c whenever possible.

2a. Monocular deprivation, by eyelid suture or intraocular injection.

Moderate discomfort (for 1 day) from surgery.

2b. Retinal lesion, by laser photocoagulation or enucleation.

Mild or maximally moderate discomfort (for 1 day) from surgery.

3a. Focal modulation.

No discomfort when applied during anesthetized readout or after slicing.

Mild discomfort when applied to awake animal, due to disoriented feeling due to focal brain modulation.

3b. Activation of designer proteins.

No discomfort when applied during anesthetized readout or after slicing.

Mild discomfort when applied to awake animal, due to disoriented feeling due to brain activation, or stress due to drug delivery.

3c. (Opto)pharmacology

No discomfort when applied during anesthetized readout or after slicing.

Mild discomfort when applied to awake animal, due to disoriented feeling due to brain activation, or stress due to drug delivery.

3d. Non-standard housing condition

Mild discomfort due to change of housing conditions for enrichment.

Moderate discomfort in dark housing is possible because of lack of vision and disturbed circadian rhythm.

4a. Acute in vivo probe recording

Mild discomfort due to induction of anaesthesia for recording under anaesthesia.

Moderate discomfort due to head fixation in awake recording.

4b. Acute in vivo imaging

Mild discomfort due to induction of anaesthesia for imaging under anaesthesia.

Moderate discomfort due to head fixation in awake imaging.

4c. Slice physiology

Mild discomfort due to induction of anaesthesia if the mouse was not already anaesthetized for 4a or 4b.

4d. Molecular analysis

Mild discomfort due to induction of anaesthesia if the mouse was not already anaesthetized for any of procedure 4a-c.

4e. Histology

Mild discomfort due to induction of anaesthesia if the mouse was not already anaesthetized for any of procedure 4a-c.

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.

For ex vivo histology or molecular analysis, or for slice physiology it is necessary to kill the animal and extract the brain.

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

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

Yes



Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

| | | |
|---|------------------------------|--|
| 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. | 80100-KNAW | |
| 1.2 Provide the name of the licenced establishment. | KNAW | |
| 1.3 List the serial number and type of animal procedure. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i> | Serial number 3.4.4.2 | Type of animal procedure Readout during visual deprivation: Chronic in vivo assessment of neuronal function or anatomy in control mice and mice during plasticity induction by visual deprivation. |

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 aim of this procedure is to measure the effect on neural structure and function by an experimental manipulation in mice during and after plasticity induced by visual deprivation.

The general design has the following components:

1. Instrumentalization of the experimental animal
2. Plasticity paradigm - visual deprivation
3. Experimental manipulation
4. Readout – chronic and terminal

These components are described in detail in Appendix 3.4.4.1, and are not repeated here.

Added for this appendix are the chronic readout components:

4. Readout – Chronic

We want to observe the changes in the brain while plasticity takes places. For this reason we would like to record and image the structure and functioning of visual system during plasticity. To obtain a baseline of the dynamics will we commence measuring before plasticity induction and continue measuring after the period of visual plasticity. Chronic readout consist of one or both of the following procedures:

4f. Chronic in vivo probe recording, repeated measurements in awake or anaesthetised mice using a recording probe, e.g. an extracellular electrode, an intracellular pipet, or an electrochemical probe taking

place over multiple sessions.

4g. Chronic in vivo imaging, repeated optical measurements in awake or anaesthetised mice of brain structure and activity over multiple sessions. Examples are imaging of GFP in a selection of neurons, genetically coded calcium indicators, or wide-field intrinsic signal imaging.

The primary outcome parameters of these chronic recording and imaging experiments are the dynamics in the changes in neuronal structure and spiking or synaptic activity of specific groups of neurons induced by the visual plasticity induction paradigm while manipulation the brain.

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

The procedures are described in detail in Appendix 3.4.4.1, and are not repeated here. Two readout procedures are added:

For all experiments, the cranial surgery will have taken place multiple days or weeks before the first recording and imaging session. Typically, we will record or image for less than 10 sessions. In some cases, however, it may be that plasticity continues to change the visual system. In these cases, we may record more sessions, but we do not expect that ever more than 20 sessions will be useful. Typical experiments would have no more than 1 session per day. If, however, changes occur during a day but take longer than a single session could last, it may be necessary in exceptional cases to measure during multiple sessions on a single day. We will discuss the necessity of this with the IvD.

Procedure 4f. Chronic in vivo probe recording (readout for 75% of the mice)

In multiple sessions, we will record brain activity using an invasive probe, such as an extracellular microelectrode, intracellular pipet or electrochemical probe. The recording session can start with induction of anaesthesia, but in the majority of cases will be in an awake animal. Awake recordings may be necessary to witness the brain during normal function. Under anaesthesia, information processing and plasticity mechanisms are reduced or altered. Awake recording can be done in head-fixed animals or freely moving animals using a tethered or wireless connection. For head-fixed awake sessions, mice will have been habituated to being head-fixed as part of the cranial surgery procedure 1d.

Procedure 4g. Chronic in vivo imaging. (readout for 75% of the mice)

In multiple sessions (possibly combined with procedure 4f), we will a microscope or a macroscope (low magnification imaging setup) to image structure and activity of the brain using, for instance, intrinsic signal, flavoprotein, fluorescent dyes or fluorescent proteins. The imaging session can start with induction of anaesthesia, especially for structural imaging, but can also be in an awake animal, especially for functional imaging. Under anaesthesia, information processing and plasticity mechanisms are reduced or altered. Awake imaging can be done in head-fixed animals or freely moving animals using optical fibres or miniature microscopes. For head-fixed awake sessions, mice will have been habituated to being head-fixed as part of the cranial surgery procedure 1d.

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

(Text in black is identical to Appendix 3.4.4.1. In red are the differences.)

Pilot experiments

Statistical methods do not apply. Establishing new manipulations requires testing and adaptation based on obtained results. Adapted procedures are then tested in new groups, until the full procedure is established and formal experiments can start.

Initial qualitative analysis

When experience with a certain test is limited to pilot experiments or indicates high variability, the number is based on pilot studies and on literature data.

Quantitative analysis

When experience allows the calculation of numbers of animals to obtain a certain effect with statistical significance, we perform a power analysis to ensure that we use the minimum number of animals per group that will be statistically sound and biologically relevant. **By taking multiple longitudinal measurements in the same mice, we can do paired statistics which will have more power than comparing**

visually deprived mice with other non-deprived control animals.

B. The animals

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

(Text in black is identical to Appendix 3.4.4.1. In red are the differences.)

Species and origin

We will use mice (*Mus musculus*) in these experiments. This choice is based on the amount of fundamental knowledge that exists about the anatomy and physiology of the mouse brain and the availability of sophisticated technologies for investigating brain mechanisms, including a variety of genetically engineered strains. We include different mouse lines, including wild-type (e.g. C57Bl6) and genetically modified animals. The choice of transgenic animals depends on the specific research question. For example, if we need to measure activity of specific neurons, we can make use of transgenic mouse line that expresses, for example, a calcium indicator in a specific subclass of interneurons. We will carefully consider the best mouse model for every research question separately, taking latest developments into account. All mice are derived from the NIN, an establishment licensed by the NVWA, or from a registered commercial company.

In the animals in which variants of endogenous proteins are expressed or knocked-out it may be possible that there is discomfort as a result of an affected phenotype, but no discomfort is reported for any of the lines that we intend to use. For this protocol we assume that there is no congenic discomfort for the breeding of any of the lines. New lines will be monitored for two generations and the outcome will be presented to the IvD. In the unlikely event we want to use a strain with congenital discomfort we will add an addendum for such a mouse line to the CCD protocol.

Sex

For readout, we will use both males and females from the animal lines that are bred in-house, to reduce the number of surplus animals. For most of our questions in our line of research (plasticity in the visual system) we do not expect any differences between genders. However, we will document the gender and investigate if there are any gender differences that are relevant for our research questions. If so, we will ask for approval of the IVD to only use mice of the appropriate sex for such experiments.

Life stages

We will only do experiments involving visual stimulation in animals after eye opening. Mice open their eyes not before postnatal day P10, but manipulations may need to be done earlier, e.g. transfection takes several days after viral injection. The majority of mice will consist of adults and juveniles after weaning at P21. In mice, vision deteriorates with age, so most experiments will be in mice that are less than 1 year old. In utero electroporation will take place in embryos not younger than E10. Mothers used for in utero electroporation will be adult.

Animal number

The estimate of the total number of experimental groups is primarily based on our experience over the past years performing very similar experiments. There are about a dozen researchers in our laboratories. We expect them together to do about 5 separate experiments (e.g. the role of a specific gene in plasticity in a visual area) with this procedure per year. Based on previous experiments over the last decade, we estimate that we need about 30 animals for the readout per experiment. This is less than for a typical experiment where we only take a terminal measurement, because the longitudinal measurements have more power in a significance calculation. This would amount to $30 * 5 * 5$ (animals/experiment * experiments/year * years) = **750 animals**. We estimate that 1 out of 5 experiments use in utero electroporation, i.e. 150 animals. Based on previous experience, we obtain about 3 usable electroporated pups per mother. We would thus require $150 / 3 =$ **50 mothers**. The requested number of animals is thus $750 + 50 =$ **total 800**.

At the start of an experiment, we will carefully determine the number of animals needed with a power-analysis, or we will start with a pilot-experiment. We will stop the experiments once the aims of the experiment have been achieved and not use further mice.

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.

(Text in black is identical to Appendix 3.4.4.1. In red are the differences.)

Replacement

To disentangle the brain mechanisms that underlie plasticity in the mammalian visual system, we cannot use cell cultures or animal species with a very different visual system such as other vertebrates that lack a cerebral cortex. Intact brains of awake animals need to be studied to understand how brain activity underlies visual perception and learning. We can only study the cellular level and, in particular, the contribution of specific cells types (e.g. the interneurons) and changes in the connectivity that result from plasticity in mice due to the powerful methods that exist in this animal model (e.g. calcium imaging, 2-photon imaging, optogenetics, transgenic animals). The possibilities for invasive measurements in the human brain are limited. Furthermore, there are no models available with enough level of accurate detail to answer the same questions. Hence, the replacement of the mice needed for these experiments, is not possible.

Reduction

We reduce the number of animals to the minimum possible. First, we will calculate the number of animals needed to achieve a certain statistical power beforehand, in case we know the effect size. If the effect size is unknown, we will first do a pilot experiment using only a few animals to determine the expected effect size. Second, we will use both male and female mice whenever possible to reduce the number of surplus animals. Third, whenever possible we use animals for both in vivo and ex vivo studies. **Fourth, by taking repeated longitudinal measurements in one animal, we reduce the number of animals needed.**

Refinement

We use a collection of the newest genetic techniques to make our experimental manipulations as specific as possible. Furthermore, all surgeries will be carried out by persons who are well trained. Animals are housed in cages with cage enrichment in order to keep them engaged which we believe to reduce discomfort of living in a cage and improve cognitive capabilities.

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

(Text is identical to Appendix 3.4.4.1.)

Animals will be housed socially, unless it is impossible because of the risk of damage to a specific cranial implant or eye suture. Our experience shows that mice with simple cranial windows and head posts can continue to be housed socially.

During surgeries, analgesics and anaesthesia are used to minimize pain and suffering. Breathing and temperature will be registered and level of anaesthesia and warmth of heating-pad will be adjusted as such. Peri-surgical analgesics will be administered if necessary and animals will wake up in a warm

environment. Care will be taken to facilitate easy access to food and water. Mice will be allowed to recover for at least two days following surgery. Behaviour, wound area, weight and appearance will be monitored daily at least for 3 days post-surgery and longer for surgeries that would have a longer chance of complications.

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.

(Text is identical to Appendix 3.4.4.1.)

The proposed experiments are fundamental research, and are not legally required.

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.

(Text is identical to Appendix 3.4.4.1.)

For some cranial implants, it may be necessary to house mice solitarily after a surgery or brain injection to prevent cage mates damaging surgical wounds or the implants. In such solitary housing, although animals will be physically separated, they will be able to see, smell, and hear other animals in the stable. Mice cage will be enriched by bedding material and also running wheels, pipes and/or shelters when possible.

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.

(Text is identical to Appendix 3.4.4.1)

During surgery, **we will use adequate anaesthesia and analgesia**. Also post-surgery analgesics will be administered. Furthermore, before killing any mice, they will be deeply anesthetized.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

(Text is identical to Appendix 3.4.4.1.)

Infections.

In rare cases there is a possibility of infection around the wound area. In these cases, we will apply additional analgesics and/or antibiotics. Visible signs of pathogenesis will be monitored. The following will be considered as signs of an unhealthy state of the animal: aberrant behaviour, dehydration, weight loss, nose and mouth discharge.

Insufficient recovery after surgery.

Applicable if an animal shows weight loss (more than 15% of its post-surgery weight within two days, or more than 20% in total). This occurs infrequently (<2%).

Head post detachment.

If the head post breaks off, the animal is immediately anesthetized to allow assessment of the discomfort level. If the head post becomes loose/detached due to bad adhesion to the skull we are able to reattach the head post in an immediate repair surgery. The repair surgery is performed under anaesthesia and with analgesia in an identical fashion to the original attachment surgery, with the exception that the skin does not need to be cut, this makes the repair surgery both shorter in duration and less invasive than the original implantation surgery. We estimate the discomfort to be moderate during recovery from the anaesthesia (1 day) becoming mild for 1-2 days. In the rare case (<2%) that the detachment of the head post damages the skull, the mouse is immediately euthanized under anaesthesia.

Reopening of craniotomy.

In rare cases (<5%), the craniotomy is reopened causing moderate discomfort. In these cases the mouse is immediately euthanized under anaesthesia.

Explain why these effects may emerge.

(Text is identical to Appendix 3.4.4.1.)

Mild to moderate discomfort due to unintended effects as described above can occur in a small percentage of mice. The head post can become loose due to the forces exerted by the mouse on the head post while fixed in the set-up.

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

(Text is identical to Appendix 3.4.4.1.)

We monitor the animal's behaviour, wound area and physiology in these days after surgery. The surgeries are performed using adequate surgical procedures in semi-sterile conditions and without unnecessary delays to minimize the amount of time the animal is under anaesthesia. Animals will be monitored daily and if adverse effects are present, this will be discussed with the IVD and/or veterinary officer. If necessary, treatment will be initiated (topically or systemically applied medication).

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.

(Text is identical to Appendix 3.4.4.1.)

Each animal that undergoes surgery will be monitored for clinical parameters. The mice will be monitored for their general appearance and activity level. If a mouse has an appearance that gives cause for concern (e.g. signs of infection around the wound, hair standing up or sunken flanks, reduction in activity level) then we will notify the IVD. Similarly, if the animal does not recover well from anaesthesia we will evaluate the animal together with the IVD.

In addition, the weight of the animal will be monitored and if the animal loses 15% of their weight in two consecutive days or if the animal loses more than 20% of their weight throughout the course of the experiment then the IVD will be contacted and a decision will be made whether a humane endpoint has

been reached. If the headpost breaks off damages the skull or reopening of the craniotomy occurs, the mouse will be immediately euthanized.

Indicate the likely incidence.

(Text is identical to Appendix 3.4.4.1.)

Humane endpoints are expected to be met in 0-5% of the animals tested within time frame of the experiments.

K. Classification of severity of procedures

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

Cumulative discomfort for all animals, including the mothers, is classified as **moderate**

The classification of severity of the individual procedures is described in detail in Appendix 3.4.4.1, and is not repeated here. Two classifications are added below:

4f. Chronic in vivo probe recording

Moderate discomfort due to repeated recovery from anaesthesia for recording under anaesthesia.
Moderate discomfort due to head fixation in awake recording.

4g. Chronic in vivo imaging

Moderate discomfort due to repeated recovery from anaesthesia for recording under anaesthesia.
Moderate discomfort due to head fixation in awake imaging.

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.

As in Appendix 3.4.4.1.

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

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

Yes



Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

| | | |
|---|------------------------------|---|
| 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. | 80100-KNAW | |
| 1.2 Provide the name of the licenced establishment. | KNAW | |
| 1.3 List the serial number and type of animal procedure. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i> | Serial number 3.4.4.3 | Type of animal procedure Readout after visual learning: Acute in vivo or ex vivo assessment of neuronal function or anatomical/molecular make-up in control mice and mice after plasticity induction by visual learning |

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 aim of this procedure is to measure the effect on neural structure and function by an experimental manipulation in mice after plasticity induced by visual learning.

The general design has the following components:

1. Instrumentalization of the experimental animal
2. Plasticity paradigm - visual learning
3. Experimental manipulation
4. Readout - acute

These components are described in detail in Appendix 3.4.4.1, and are not repeated here.

Added here are visual learning paradigms:

2. Plasticity paradigm – Visual learning

We study the mechanisms of plasticity in the visual system. With this aim, we use the following common manipulations to induce plasticity by visual learning:

2c. Perceptual learning, where visual stimuli are coupled to behavioural output by positive reinforcement training

2d. Fear learning, where visual stimuli and context are coupled to a fear response

2e. Unsupervised learning, where repeated visual stimuli change neural response and behaviour without reinforcement.

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

The procedures are described in detail in Appendix 3.4.4.1, and are not repeated here. Three visual learning procedures are added:

2. Plasticity paradigm – Visual Learning

For inducing plasticity by visual learning, we will use the following procedures, with which we already have experience. In the majority of cases, plasticity is induced using only one of these procedures, but it may sometimes be useful to combine the procedures. Therefore, the percentages for frequency of the procedures add up to above 100%.

Procedure 2c. Perceptual learning. (visual learning for 50% of the mice)

During perceptual learning, the mouse is trained to associate specific visual stimuli with specific actions. Examples of stimuli could be gratings with a certain orientation, or pictures of objects. Examples of actions could be licking from a specific lick spout, button/lever push or turning a decision wheel/ball. The training is coupled with a positive reward when the mouse performs to right action for the presented stimulus. The positive reward will in an estimated 90% of the perceptual learning experiments of a liquid reward. Other possible rewards are food or sensory stimulus that has been associated to food or liquid reward. To enhance the value of a liquid reward, the animals will be held in a water control regime. On working days, they obtain water as a reward in performing the task correctly. On non-working days they receive a limited amount of water. The literature and previous experience (from another laboratory at the NIN and our own laboratory) suggests that this is better than providing ad libitum access on non-working days. When the mouse is under fluid control we monitor its appearance and behaviour every day. If signs of possible dehydration are observed (explained in detail in section I), the animal is temporarily removed from the trial and given ad libitum access to water. An individual training session on one day typically last 30 minutes to 2 hours, and can involve several hundred stimulus presentations. The whole learning can take up to 50 sessions, but we aim for perceptual learning paradigms that can be trained in less than 14 days. The performance of the mouse is monitored throughout the training period. The animals will be head-fixed in an estimated 90% of the perceptual learning experiments and freely moving in the remaining 10%.

Procedure 2d. Fear learning. (visual learning for 20% of the mice)

Animals will learn to fear a particular visual stimulus or context, by its association with a noxious stimulus. The noxious stimulus could be a light (foot / tail shock), strong sound, or an air puff. The animals will be head-fixed in an estimated 30% of the perceptual learning experiments. The fear learning typically is short period of several minutes in which the visual stimulus is paired to the noxious stimulus, and the response to the paired or another unpaired visual stimulus or context is measured during the same sessions or sessions in later days. The number of sessions in which a noxious stimulus is delivered is kept to a minimum. For the shock stimulus, we will never use more than five condition sessions.

Procedure 2e. Unsupervised learning (visual learning for 50% of the mice)

Seeing can also lead to changes in behaviour when it is not coupled to a reinforcement. Examples are the freezing and fleeing behaviour to bird-like stimuli flying overhead, and the approach behaviour to novel visual stimuli. We will present visual stimuli and observe behavioural response changing over multiple sessions.

For all the visual learning paradigms observe the mouse behaviour by video camera. For head-fixed sessions, we will also monitor the animal's physiology by pupil recordings (in most cases) and for some cases the heart rate and muscle activity.

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

(Text is identical to Appendix 3.4.4.1.)

Pilot experiments

Statistical methods do not apply. Establishing new manipulations requires testing and adaptation based on obtained results. Adapted procedures are then tested in new groups, until the full procedure is established and formal experiments can start.

Initial qualitative analysis

When experience with a certain test is limited to pilot experiments or indicates high variability, the number is based on pilot studies and on literature data.

Quantitative analysis

When experience allows the calculation of numbers of animals to obtain a certain effect with statistical significance, we perform a power analysis to ensure that we use the minimum number of animals per group that will be statistically sound and biologically relevant.

B. The animals

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

(Text in black is identical to Appendix 3.4.4.1; in red are the differences)

Species and origin

We will use mice (*Mus musculus*) in these experiments. This choice is based on the amount of fundamental knowledge that exists about the anatomy and physiology of the mouse brain and the availability of sophisticated technologies for investigating brain mechanisms, including a variety of genetically engineered strains. We include different mouse lines, including wild-type (e.g. C57Bl6) and genetically modified animals. The choice of transgenic animals depends on the specific research question. For example, if we need to measure activity of specific neurons, we can make use of transgenic mouse line that expresses, for example, a calcium indicator in a specific subclass of interneurons. We will carefully consider the best mouse model for every research question separately, taking latest developments into account. All mice are derived from the NIN, an establishment licensed by the NVWA, or from a registered commercial company.

In the animals in which variants of endogenous proteins are expressed or knocked-out it may be possible that there is discomfort **as a result of an affected phenotype**, but no discomfort is reported for any of the lines that we intend to use. For this protocol we assume that there is no congenic discomfort for the breeding of any of the lines. New lines will be monitored for two generations and the outcome will be presented to the IVD. In the unlikely event we want to use a strain with congenital discomfort we will add an addendum for such a mouse line to the CCD protocol.

Sex

For readout, we will use both males and females from the animal lines that are bred in-house, to reduce the number of surplus animals. For most of our questions in our line of research (plasticity in the visual system) we do not expect any differences between genders. However, we will document the gender and investigate if there are any gender differences that are relevant for our research questions. If so, we will ask for approval of the IVD to only use mice of the appropriate sex for such experiments.

Life stages

We will only do experiments involving visual stimulation in animals after eye opening. Mice open their eyes not before postnatal day P10, but manipulations may need to be done earlier, e.g. transfection takes several days after viral injection. The majority of mice will consist of adults and juveniles after weaning at P21. In mice, vision deteriorates with age, so most experiments will be in mice that are less than 1 year old. In utero electroporation will take place in embryos not younger than E10. Mothers used for in utero electroporation will be adult.

Animal number

The estimate of the total number of experimental groups is primarily based on our experience over the past years performing very similar experiments. There are about a dozen researchers in our laboratories. We expect them together to do about 5 separate experiments (e.g. the role of a specific gene in plasticity in a visual area) with this procedure per year. Based on previous experiments over the last decade, we estimate that we need about 50 animals for the readout per experiment. This would amount to $50 * 5 * 5$ (animals/experiment * experiments/year * years) = **1250 animals**. We estimate that 1 out of 5

experiments use in utero electroporation, i.e. 250 animals. Based on previous experience, we obtain

about 3 usable electroporated pups per mother. We would thus require $250 / 3 = 83$ mothers. The requested number of animals is thus $1250 + 83 = \text{total } 1333$.

At the start of an experiment, we will carefully determine the number of animals needed with a power-analysis, or we will start with a pilot-experiment. We will stop the experiments once the aims of the experiment have been achieved and not use further mice.

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.

(Text is identical to Appendix 3.4.4.1.)

Replacement

To disentangle the brain mechanisms that underlie plasticity in the mammalian visual system, we cannot use cell cultures or animal species with a very different visual system such as other vertebrates that lack a cerebral cortex. Intact brains of awake animals need to be studied to understand how brain activity underlies visual perception and learning. We can only study the cellular level and, in particular, the contribution of specific cells types (e.g. the interneurons) and changes in the connectivity that result from plasticity in mice due to the powerful methods that exist in this animal model (e.g. calcium imaging, 2-photon imaging, optogenetics, transgenic animals). The possibilities for invasive measurements in the human brain are limited. Furthermore, there are no models available with enough level of accurate detail to answer the same questions. Hence, the replacement of the mice needed for these experiments, is not possible.

Reduction

We reduce the number of animals to the minimum possible. First, we will calculate the number of animals needed to achieve a certain statistical power beforehand, in case we know the effect size. If the effect size is unknown, we will first do a pilot experiment using only a few animals to determine the expected effect size. Second, we will use both male and female mice whenever possible to reduce the number of surplus animals. Third, whenever possible we use animals for both in vivo and ex vivo studies.

Refinement

We use a collection of the newest genetic techniques to make our experimental manipulations as specific as possible. Furthermore, all surgeries will be carried out by persons who are well trained. Animals are housed in cages with cage enrichment in order to keep them engaged which we believe to reduce discomfort of living in a cage and improve cognitive capabilities.

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

(Text in black is identical to Appendix 3.4.4.1. except for addition in red)

Animals will be housed socially, unless it is impossible because of the risk of damage to a specific cranial

implant or eye suture. Our experience shows that mice with simple cranial windows and head posts can continue to be housed socially.

During surgeries, analgesics and anaesthesia are used to minimize pain and suffering. Breathing and temperature will be registered and level of anaesthesia and warmth of heating-pad will be adjusted as such. Peri-surgical analgesics will be administered if necessary and animals will wake up in a warm environment. Care will be taken to facilitate easy access to food and water. Mice will be allowed to recover for at least two days following surgery. Behaviour, wound area, weight and appearance will be monitored daily at least for 3 days post-surgery and longer for surgeries that would have a longer chance of complications.

Animals under fluid control are monitored very closely as described in more detail in section I.

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.

(Text is identical to Appendix 3.4.4.1.)

The proposed experiments are fundamental research, and are not legally required.

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.

(Text is identical to Appendix 3.4.4.1)

For some cranial implants, it may be necessary to house mice solitarily after a surgery or brain injection to prevent cage mates damaging surgical wounds or the implants. In such solitary housing, although animals will be physically separated, they will be able to see, smell, and hear other animals in the stable. Mice cage will be enriched by bedding material and also running wheels, pipes and/or shelters when possible.

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.

(As in Appendix 3.4.4.1)

During surgery, we will use adequate anaesthesia and analgesia. Also post-surgery analgesics will be administered. Furthermore, before killing any mice, they will be deeply anesthetized.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

(Text in black is identical to Appendix 3.4.4.1., in red are additions)

Infections.

In rare cases there is a possibility of infection around the wound area. In these cases, we will apply additional analgesics and/or antibiotics. Visible signs of pathogenesis will be monitored. The following will be considered as signs of an unhealthy state of the animal: aberrant behaviour, dehydration, weight loss, nose and mouth discharge.

Insufficient recovery after surgery.

Applicable if an animal shows weight loss (more than 15% of its post-surgery weight within two days, or more than 20% in total). This occurs infrequently (<2%).

Head post detachment.

If the head post breaks off, the animal is immediately anesthetized to allow assessment of the discomfort level. If the head post becomes loose/detached due to bad adhesion to the skull we are able to reattach the head post in an immediate repair surgery. The repair surgery is performed under anaesthesia and with analgesia in an identical fashion to the original attachment surgery, with the exception that the skin does not need to be cut, this makes the repair surgery both shorter in duration and less invasive than the original implantation surgery. We estimate the discomfort to be moderate during recovery from the anaesthesia (1 day) becoming mild for 1-2 days. In the rare case (<2%) that the detachment of the head post damages the skull, the mouse is immediately euthanized under anaesthesia.

Reopening of craniotomy.

In rare cases (<5%), the craniotomy is reopened causing moderate discomfort. In these cases the mouse is immediately euthanized under anaesthesia.

Dehydration.

Animals undergoing perceptual learning do not get water ad libitum. This could result in signs of dehydration.

Explain why these effects may emerge.

(Text in black is identical to Appendix 3.4.4.1., in red are additions)

Mild to moderate discomfort due to unintended effects as described above can occur in a small percentage of mice. The head post can become loose due to the forces exerted by the mouse on the head post while fixed in the set-up. Dehydration can occur when the mouse performs poorly during training and the amount of fluid gained during training or given on non-working days is less than what is naturally lost.

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

(Text in black is identical to Appendix 3.4.4.1., in red are additions)

Each animal that undergoes surgery will be monitored for clinical parameters. The mice will be monitored for their general appearance and activity level. If a mouse has an appearance that gives cause for concern (e.g. signs of infection around the wound, hair standing up or sunken flanks, reduction in activity level) then we will notify the Animal Welfare Board and evaluate the animal together with the

veterinarian of the NIN or the animal welfare officer. Similarly, if the animal does not recover well from anesthesia we will evaluate the animal together with the veterinarian or the animal welfare officer. In addition, the weight of the animal will be monitored and if the animal loses 15% of their weight in two consecutive days or if the animal loses more than 20% of their weight throughout the course of the experiment then the veterinarian or animal welfare officer will be contacted and a decision will be made whether a humane endpoint has been reached. If the headpost breaks off damages the skull or reopening of the craniotomy occurs, the mouse will be immediately euthanized.

While an animal is under fluid control we monitor its appearance and behaviour every day. We weigh the mouse before and after training and compare the weight to the average weight during the last week. Should the weight decrease below 90% of this weekly average we take the mouse off fluid control and give it ad libitum access to water. The weight is also checked over longer intervals to prevent a slow loss of weight. Should we notice such a slow loss we will make sure the mouse drinks more fluid by adapting task difficulty and/or substituting with gel. Additionally, we check the mouse for its general appearance and its behaviour. In our experience, the measures described do not cause any signs of dehydration such as reduced skin tension, sunken eyes or either increased or reduced activity. If any of these welfare criteria are abnormal the mouse is taken out of training and provided with ad libitum access to fluid until it has recovered. In that case, the IvD will be informed so that they can check the animal. All criteria (weight, fluid consumed per day, appearance) are logged for each individual mouse so that the history is always accessible.

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.

(Text is identical to Appendix 3.4.4.1.)

Each animal that undergoes surgery will be monitored for clinical parameters. The mice will be monitored for their general appearance and activity level. If a mouse has an appearance that gives cause for concern (e.g. signs of infection around the wound, hair standing up or sunken flanks, reduction in activity level) then we will notify the IvD. Similarly, if the animal does not recover well from anesthesia we will evaluate the animal together with the IvD.

In addition, the weight of the animal will be monitored and if the animal loses 15% of their weight in two consecutive days or if the animal loses more than 20% of their weight throughout the course of the experiment then the IvD will be contacted and a decision will be made whether a humane endpoint has been reached. If the head post breaks off damages the skull or reopening of the craniotomy occurs, the mouse will be immediately euthanized.

Indicate the likely incidence.

(Text is identical to Appendix 3.4.4.1.)

Humane endpoints are expected to be met in 0-5% of the animals tested within time frame of the experiments.

K. Classification of severity of procedures

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

The cumulative discomfort for the animals that have only undergone the unsupervised learning paradigm with no further discomfort except acute readout is **mild**. We expect that one of the five estimated experiments per year involves only unsupervised learning (250 mice = 20%)

For all other mice in this appendix (1000 mice = 80%) and for the mothers the cumulative discomfort is **moderate**.

The classification of severity of the individual procedures is described in detail in Appendix 3.4.4.1, and is

not repeated here. Three classifications are added below.

2c. Perceptual learning

Mild discomfort (entire period) due to fluid control. The discomfort is mild given that many measures are taken (described above) that ensure that the mice will receive their daily need for water.
Mild discomfort (training sessions) for head-fixation.

2d. Fear learning

Mild discomfort for sessions with noxious stimuli or with visual stimuli that have been associated with noxious stimuli.
Mild discomfort (training sessions) for head-fixation.

2e. Unsupervised learning

Mild discomfort if visual stimuli are shown that lead to a freezing or fleeing response, such as looming objects.
Mild discomfort (training sessions) for head-fixation.

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.

(As in Appendix 3.4.4.1.)

For ex vivo histology or molecular analysis, or for slice physiology it is necessary to kill the animal and extract the brain.

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

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

Yes



Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

| | | |
|---|------------------------------|---|
| 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. | 80100-KNAW | |
| 1.2 Provide the name of the licenced establishment. | KNAW | |
| 1.3 List the serial number and type of animal procedure. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i> | Serial number 3.4.4.4 | Type of animal procedure Readout during visual learning: Chronic in vivo assessment of neuronal function or anatomy in control mice and mice undergoing plasticity induction by visual learning |

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 aim of this procedure is to measure the effect on neural structure and function by an experimental manipulation in mice during and after plasticity induced by visual learning.

The general design has the following components:

1. Instrumentalization of the experimental animal
2. Plasticity paradigm - visual learning
3. Experimental manipulation
4. Readout – chronic and acute

These components are described in detail in Appendix 3.4.4.3, and are not repeated here.

Added here is chronic readout:

4. Readout – Chronic

We want to observe the changes in the brain while plasticity takes places. For this reason we would like to record and image the structure and functioning of visual system during plasticity. To obtain a baseline of the dynamics will we commence measuring before plasticity induction and continue measuring after the period of visual plasticity. Chronic readout consist of one or both of the following procedures:

4f. Chronic in vivo probe recording, repeated measurements in awake or anaesthetised mice using a recording probe, e.g. an extracellular electrode, an intracellular pipet, or an electrochemical probe taking place over multiple sessions.

4g. Chronic in vivo imaging, repeated optical measurements in awake or anaesthetised mice of brain structure and activity over multiple sessions. Examples are imaging of GFP in a selection of neurons, genetically coded calcium indicators, or wide-field intrinsic signal imaging.

The primary outcome parameters of these chronic recording and imaging experiments are the dynamics in the changes in neuronal spiking or synaptic activity of specific groups of neurons induced by the visual plasticity induction paradigm while manipulation the brain.

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

The procedures are described in detail in Appendix 3.4.4.1, and are not repeated here. Two procedures are added:

For all experiments, the cranial surgery will have taken place multiple days or weeks before the first recording and imaging session. Typically, we will record or image for less than 10 sessions. In some cases, however, it may be that plasticity continues to change the visual system. In these cases, we may record more sessions, but we do not expect that ever more than 20 sessions will be useful. The measurements can be combined, and therefore the percentages for frequency of the procedures add up to above 100%.

Procedure 4f. Chronic in vivo probe recording (procedure for 75% of the mice)

In multiple sessions, we will record brain activity using an invasive probe, such as an extracellular microelectrode, intracellular pipet or electrochemical probe. The recording session can start with induction of anaesthesia, but in the majority of cases will be in an awake animal. Awake recording can be done in head-fixed animals or freely moving animals using a tethered or wireless connection. For head-fixed awake sessions, mice will have been habituated to being head-fixed as part of the cranial surgery procedure 1d.

Procedure 4g. Chronic in vivo imaging. (procedure for 75% of the mice)

In multiple sessions (possibly combined with procedure 4f), we will use a microscope or a macroscope (low magnification imaging setup) to image structure and activity of the brain using, for instance, intrinsic signal, flavoprotein, fluorescent dyes or fluorescent proteins. The imaging session can start with induction of anaesthesia, especially for structural imaging, but can also be in an awake animal, especially for functional imaging. Awake imaging can be done in head-fixed animals or freely moving animals using optical fibres or miniature microscopes. For head-fixed awake sessions, mice will have been habituated to being head-fixed as part of the cranial surgery procedure 1d.

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

(Text in black is identical to Appendix 3.4.4.1. In red are the differences.)

Pilot experiments

Statistical methods do not apply. Establishing new manipulations requires testing and adaptation based on obtained results. Adapted procedures are then tested in new groups, until the full procedure is established and formal experiments can start.

Initial qualitative analysis

When experience with a certain test is limited to pilot experiments or indicates high variability, the number is based on pilot studies and on literature data.

Quantitative analysis

When experience allows the calculation of numbers of animals to obtain a certain effect with statistical significance, we perform a power analysis to ensure that we use the minimum number of animals per group that will be statistically sound and biologically relevant. **By taking multiple longitudinal measurements in the same mice, we can do paired statistics which will have more power than comparing mice undergoing visual plasticity with other mice not undergoing plasticity.**

B. The animals

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

(Text in black is identical to Appendix 3.4.4.2. In red are the differences.)

Species and origin

We will use mice (*Mus musculus*) in these experiments. This choice is based on the amount of fundamental knowledge that exists about the anatomy and physiology of the mouse brain and the availability of sophisticated technologies for investigating brain mechanisms, including a variety of genetically engineered strains. We include different mouse lines, including wild-type (e.g. C57Bl6) and genetically modified animals. The choice of transgenic animals depends on the specific research question. For example, if we need to measure activity of specific neurons, we can make use of transgenic mouse line that expresses, for example, a calcium indicator in a specific subclass of interneurons. We will carefully consider the best mouse model for every research question separately, taking latest developments into account. All mice are derived from the NIN, an establishment licensed by the NVWA, or from a registered commercial company.

In the animals in which variants of endogenous proteins are expressed or knocked-out it may be possible that there is discomfort **as a result of an affected phenotype**, but no discomfort is reported for any of the lines that we intend to use. For this protocol we assume that there is no congenic discomfort for the breeding of any of the lines. New lines will be monitored for two generations and the outcome will be presented to the IvD. In the unlikely event we want to use a strain with congenital discomfort we will add an addendum for such a mouse line to the CCD protocol.

Sex

For readout, we will use both males and females from the animal lines that are bred in-house, to reduce the number of surplus animals. For most of our questions in our line of research (plasticity in the visual system) we do not expect any differences between genders. However, we will document the gender and investigate if there are any gender differences that are relevant for our research questions. If so, we will ask for approval of the IVD to only use mice of the appropriate sex for such experiments.

Life stages

We will only do experiments involving visual stimulation in animals after eye opening. Mice open their eyes not before postnatal day P10, but manipulations may need to be done earlier, e.g. transfection takes several days after viral injection. The majority of mice will consist of adults and juveniles after weaning at P21. In mice, vision deteriorates with age, so most experiments will be in mice that are less than 1 year old. In utero electroporation will take place in embryos not younger than E10. Mothers used for in utero electroporation will be adult.

Animal number

The estimate of the total number of experimental groups is primarily based on our experience over the past years performing very similar experiments. There are about a dozen researchers in our laboratories. We expect them together to do about 5 separate experiments (e.g. the role of a specific gene in plasticity in a visual area) with this procedure per year. Based on previous experiments over the last decade, we estimate that we need about 30 animals for the readout per experiment. This is less than for a typical experiment where we only take an acute measurement, because the longitudinal measurements have more power in a significance calculation. This would amount to $30 * 5 * 5$ (animals/experiment * experiments/year * years) = **750 animals**. We estimate that 1 out of 5 experiments use in utero electroporation, i.e. 150 animals. Based on previous experience, we obtain about 3 usable electroporated pups per mother. We would thus require $150 / 3 =$ **50 mothers**. The requested number of animals is thus $750 + 50 =$ **total 800**.

At the start of an experiment, we will carefully determine the number of animals needed with a power-analysis, or we will start with a pilot-experiment. We will stop the experiments once the aims of the experiment have been achieved and not use further mice.

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.

(Text in black is identical to Appendix 3.4.4.1. In red are the differences.)

Replacement

To disentangle the brain mechanisms that underlie plasticity in the mammalian visual system, we cannot use cell cultures or animal species with a very different visual system such as other vertebrates that lack a cerebral cortex. Intact brains of awake animals need to be studied to understand how brain activity underlies visual perception and learning. We can only study the cellular level and, in particular, the contribution of specific cells types (e.g. the interneurons) and changes in the connectivity that result from plasticity in mice due to the powerful methods that exist in this animal model (e.g. calcium imaging, 2-photon imaging, optogenetics, transgenic animals). The possibilities for invasive measurements in the human brain are limited. Furthermore, there are no models available with enough level of accurate detail to answer the same questions. Hence, the replacement of the mice needed for these experiments, is not possible.

Reduction

We reduce the number of animals to the minimum possible. First, we will calculate the number of animals needed to achieve a certain statistical power beforehand, in case we know the effect size. If the effect size is unknown, we will first do a pilot experiment using only a few animals to determine the expected effect size. Second, we will use both male and female mice whenever possible to reduce the number of surplus animals. Third, whenever possible we use animals for both in vivo and ex vivo studies. **Fourth, by taking repeated longitudinal measurements in one animal, we reduce the number of animals needed.**

Refinement

We use a collection of the newest genetic techniques to make our experimental manipulations as specific as possible. Furthermore, all surgeries will be carried out by persons who are well trained. Animals are housed in cages with cage enrichment in order to keep them engaged which we believe to reduce discomfort of living in a cage and improve cognitive capabilities.

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

(Text is identical to Appendix 3.4.4.3.)

Animals will be housed socially, unless it is impossible because of the risk of damage to a specific cranial implant or eye suture. Our experience shows that mice with simple cranial windows and head posts can continue to be housed socially.

During surgeries, analgesics and anaesthesia are used to minimize pain and suffering. Breathing and temperature will be registered and level of anaesthesia and warmth of heating-pad will be adjusted as such. Peri-surgical analgesics will be administered if necessary and animals will wake up in a warm environment. Care will be taken to facilitate easy access to food and water. Mice will be allowed to

recover for at least two days following surgery. Behaviour, wound area, weight and appearance will be monitored daily at least for 3 days post-surgery and longer for surgeries that would have a longer chance of complications.

Animals under fluid control are monitored very closely as described in more detail in section I.

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.

(Text is identical to Appendix 3.4.4.1.)

The proposed experiments are fundamental research, and are not legally required.

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.

(Text is identical to Appendix 3.4.4.1.)

For some cranial implants, it may be necessary to house mice solitarily after a surgery or brain injection to prevent cage mates damaging surgical wounds or the implants. In such solitary housing, although animals will be physically separated, they will be able to see, smell, and hear other animals in the stable. Mice cage will be enriched by bedding material and also running wheels, pipes and/or shelters when possible.

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.

(Text is identical to Appendix 3.4.4.1.)

During surgery, we will use adequate anaesthesia and analgesia. Also post-surgery analgesics will be

administered. Furthermore, before killing any mice, they will be deeply anesthetized.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

(Text is identical to Appendix 3.4.4.3.)

Infections.

In rare cases there is a possibility of infection around the wound area. In these cases, we will apply additional analgesics and/or antibiotics. Visible signs of pathogenesis will be monitored. The following will be considered as signs of an unhealthy state of the animal: aberrant behaviour, dehydration, weight loss, nose and mouth discharge.

Insufficient recovery after surgery.

Applicable if an animal shows weight loss (more than 15% of its post-surgery weight within two days, or more than 20% in total). This occurs infrequently (<2%).

Head post detachment.

If the head post breaks off, the animal is immediately anesthetized to allow assessment of the discomfort level. If the head post becomes loose/detached due to bad adhesion to the skull we are able to reattach the head post in an immediate repair surgery. The repair surgery is performed under anaesthesia and with analgesia in an identical fashion to the original attachment surgery, with the exception that the skin does not need to be cut, this makes the repair surgery both shorter in duration and less invasive than the original implantation surgery. We estimate the discomfort to be moderate during recovery from the anaesthesia (1 day) becoming mild for 1-2 days. In the rare case (<2%) that the detachment of the head post damages the skull, the mouse is immediately euthanized under anaesthesia.

Reopening of craniotomy.

In rare cases (<5%), the craniotomy is reopened causing moderate discomfort. In these cases the mouse is immediately euthanized under anaesthesia.

Dehydration.

Animals undergoing perceptual learning do not get water ad libitum. This could result in signs of dehydration.

Explain why these effects may emerge.

(Text is identical to Appendix 3.4.4.3.)

Mild to moderate discomfort due to unintended effects as described above can occur in a small percentage of mice. The head post can become loose due to the forces exerted by the mouse on the head post while fixed in the set-up. Dehydration can occur when the mouse performs poorly during training and the amount of fluid gained during training or given on non-working days is less than what is naturally lost.

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

(Text is identical to Appendix 3.4.4.3.)

Each animal that undergoes surgery will be monitored for clinical parameters. The mice will be monitored for their general appearance and activity level. If a mouse has an appearance that gives cause for concern (e.g. signs of infection around the wound, hair standing up or sunken flanks, reduction in activity level) then we will notify the Animal Welfare Board and evaluate the animal together with the veterinarian of the NIN or the animal welfare officer. Similarly, if the animal does not recover well from anaesthesia we will evaluate the animal together with the veterinarian or the animal welfare officer. In addition, the weight of the animal will be monitored and if the animal loses 15% of their weight in two consecutive days or if the animal loses more than 20% of their weight throughout the course of the experiment then the veterinarian or animal welfare officer will be contacted and a decision will be made whether a humane endpoint has been reached. If the head post breaks off damages the skull or reopening of the craniotomy occurs, the mouse will be immediately euthanized.

While an animal is under fluid control we monitor its appearance and behaviour every day. We weigh the mouse before and after training and compare the weight to the average weight during the last week. Should the weight decrease below 90% of this weekly average we take the mouse off fluid control and give it ad libitum access to water. The weight is also checked over longer intervals to prevent a slow loss of weight. Should we notice such a slow loss we will make sure the mouse drinks more fluid by adapting task difficulty and/or substituting with gel. Additionally, we check the mouse for its general appearance and its behaviour. In our experience, the measures described do not cause any signs of dehydration such as reduced skin tension, sunken eyes or either increased or reduced activity. If any of these welfare criteria are abnormal the mouse is taken out of training and provided with ad libitum access to fluid until it has recovered. In that case, the Animal Welfare Board will be informed so that they can check the animal. All criteria (weight, fluid consumed per day, appearance) are logged for each individual mouse so that the history is always accessible.

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.

(Text is identical to Appendix 3.4.4.1.)

Each animal that undergoes surgery will be monitored for clinical parameters. The mice will be monitored for their general appearance and activity level. If a mouse has an appearance that gives cause for concern (e.g. signs of infection around the wound, hair standing up or sunken flanks, reduction in activity level) then we will notify the IvD. Similarly, if the animal does not recover well from anesthesia we will evaluate the animal together with the IvD.

In addition, the weight of the animal will be monitored and if the animal loses 15% of their weight in two consecutive days or if the animal loses more than 20% of their weight throughout the course of the experiment then the IvD will be contacted and a decision will be made whether a humane endpoint has been reached. If the headpost breaks off damages the skull or reopening of the craniotomy occurs, the mouse will be immediately euthanized.

Indicate the likely incidence.

(Text is identical to Appendix 3.4.4.1.)

Humane endpoints are expected to be met in 0-5% of the animals tested within time frame of the experiments.

K. Classification of severity of procedures

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

Cumulative discomfort for all animals, including the mothers, is classified as **moderate**

The classification of severity of the individual procedures are described in detail in Appendix 3.4.4.3, and are not repeated here. Two classifications are added below:

4f. Chronic in vivo probe recording

Moderate discomfort due to repeated recovery from anaesthesia for recording under anaesthesia.
Moderate discomfort due to head fixation in awake recording.

4g. Chronic in vivo imaging

Moderate discomfort due to repeated recovery from anaesthesia for recording under anaesthesia.
Moderate discomfort due to head fixation in awake imaging.

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.

As in Appendix 3.4.4.3.

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

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

Yes



Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

| | | |
|---|------------------------------|--|
| 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. | 80100-KNAW | |
| 1.2 Provide the name of the licenced establishment. | KNAW | |
| 1.3 List the serial number and type of animal procedure. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i> | Serial number 3.4.4.5 | Type of animal procedure Readout in naïve mouse: Acute in vivo or ex vivo assessment of neuronal function or anatomical/molecular make-up in mice without plasticity induction |

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 aim of this procedure is to measure neural structure and function and the effect of an experimental manipulation thereon in naïve mice. The goal of this can be to investigate the function of particular brain regions that processes visual information (subaim A2a of the Research strategy). The knowledge obtained with these experiments can guide our experiments for the plasticity paradigms of appendices 3.4.4.1-3.4.4.4. The measurements from this procedure can also be used as control for experiments with plasticity paradigms and acute readout (described in appendices 3.4.4.1 and 3.4.4.3).

The general design has the following components:

1. Instrumentalization of the experimental animal
2. Experimental manipulation
3. Readout – acute

These components are described in detail in Appendix 3.4.4.1. excluding the visual deprivation paradigms. Overlapping texts are not repeated here.

In addition, this group of procedures can be used for the introduction, training, and optimization of the (novel) techniques used for the instrumentalization, manipulation and read out.

The primary outcome parameters of the acute readout are the structure and function of the brain at areal, cellular and subcellular level.

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

The procedures are described in detail in Appendix 3.4.4.1, and are not repeated here.

Visual deprivation procedures are not included here.

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

(Text is identical to Appendix 3.4.4.1)

Pilot experiments

Statistical methods do not apply. Establishing new manipulations requires testing and adaptation based on obtained results. Adapted procedures are then tested in new groups, until the full procedure is established and formal experiments can start.

Initial qualitative analysis

When experience with a certain test is limited to pilot experiments or indicates high variability, the number is based on pilot studies and on literature data.

Quantitative analysis

When experience allows the calculation of numbers of animals to obtain a certain effect with statistical significance, we perform a power analysis to ensure that we use the minimum number of animals per group that will be statistically sound and biologically relevant.

B. The animals

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

Text in black is identical to Appendix 3.4.4.2. In red are the differences.)

Species and origin

We will use mice (*Mus musculus*) in these experiments. This choice is based on the amount of fundamental knowledge that exists about the anatomy and physiology of the mouse brain and the availability of sophisticated technologies for investigating brain mechanisms, including a variety of genetically engineered strains. We include different mouse lines, including wild-type (e.g. C57Bl6) and genetically modified animals. The choice of transgenic animals depends on the specific research question. For example, if we need to measure activity of specific neurons, we can make use of transgenic mouse line that expresses, for example, a calcium indicator in a specific subclass of interneurons. We will carefully consider the best mouse model for every research question separately, taking latest developments into account. All mice are derived from the NIN, an establishment licensed by the NVWA, or from a registered commercial company.

In the animals in which variants of endogenous proteins are expressed or knocked-out it may be possible that there is discomfort **as a result of an affected phenotype**, but no discomfort is reported for any of the lines that we intend to use. For this protocol we assume that there is no congenic discomfort for the breeding of any of the lines. New lines will be monitored for two generations and the outcome will be presented to the IvD. In the unlikely event we want to use a strain with congenital discomfort we will add an addendum for such a mouse line to the CCD protocol.

Sex

For readout, we will use both males and females from the animal lines that are bred in-house, to reduce the number of surplus animals. For most of our questions in our line of research (plasticity in the visual system) we do not expect any differences between genders. However, we will document the gender and investigate if there are any gender differences that are relevant for our research questions. If so, we will ask for approval of the IVD to only use mice of the appropriate sex for such experiments.

Life stages

We will only do experiments involving visual stimulation in animals after eye opening. Mice open their eyes not before postnatal day P10, but manipulations may need to be done earlier, e.g. transfection takes several days after viral injection. The majority of mice will consist of adults and juveniles after weaning at P21. In mice, vision deteriorates with age, so most experiments will be in mice that are less than 1 year old. In utero electroporation will take place in embryos not younger than E10. Mothers used for in utero electroporation will be adult.

Animal number

The animals in this group can act as controls for the plasticity paradigms with acute readout (appendices 3.4.4.1 and 3.4.4.3). The total number for these groups is **2500 readout animals** and **167 mothers** for in utero electroporation. The motivation of this number (**2667 mice**) is given in 3.4.4.1. and 3.4.4.3.

In addition, we also expect to do about 4 separate experiments each year, with only acute readout after anaesthesia induction or with only ex vivo analysis, and where we do not need in utero electroporation or procedures with moderate discomfort. Based on previous experiments over the last decade, we estimate that we need about 30 animals for the readout per experiment. This would amount to $30 * 4 * 5$ (animals/experiment * experiments/year * years) = **600 animals**.

> For appendix 3.4.4.5 **total 3267 animals**

At the start of an experiment, we will carefully determine the number of animals needed with a power-analysis, or we will start with a pilot-experiment. We will stop the experiments once the aims of the experiment have been achieved and not use further mice.

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.

(Text is identical to Appendix 3.4.4.1.)

Replacement

To disentangle the brain mechanisms that underlie plasticity in the mammalian visual system, we cannot use cell cultures or animal species with a very different visual system such as other vertebrates that lack a cerebral cortex. Intact brains of awake animals need to be studied to understand how brain activity underlies visual perception and learning. We can only study the cellular level and, in particular, the contribution of specific cells types (e.g. the interneurons) and changes in the connectivity that result from plasticity in mice due to the powerful methods that exist in this animal model (e.g. calcium imaging, 2-photon imaging, optogenetics, transgenic animals). The possibilities for invasive measurements in the human brain are limited. Furthermore, there are no models available with enough level of accurate detail to answer the same questions. Hence, the replacement of the mice needed for these experiments, is not possible.

Reduction

We reduce the number of animals to the minimum possible. First, we will calculate the number of animals needed to achieve a certain statistical power beforehand, in case we know the effect size. If the effect size is unknown, we will first do a pilot experiment using only a few animals to determine the expected effect size. Second, we will use both male and female mice whenever possible to reduce the number of surplus animals. Third, whenever possible we use animals for both in vivo and ex vivo studies.

Refinement

We use a collection of the newest genetic techniques to make our experimental manipulations as specific as possible. Furthermore, all surgeries will be carried out by persons who are well trained. Animals are housed in cages with cage enrichment in order to keep them engaged which we believe to reduce discomfort of living in a cage and improve cognitive capabilities.

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

(Text is identical to Appendix 3.4.4.1.)

Animals will be housed socially, unless it is impossible because of the risk of damage to a specific cranial implant or eye suture. Our experience shows that mice with simple cranial windows and head posts can continue to be housed socially.

During surgeries, analgesics and anaesthesia are used to minimize pain and suffering. Breathing and temperature will be registered and level of anaesthesia and warmth of heating-pad will be adjusted as such. Peri-surgical analgesics will be administered if necessary and animals will wake up in a warm environment. Care will be taken to facilitate easy access to food and water. Mice will be allowed to recover for at least two days following surgery. Behaviour, wound area, weight and appearance will be monitored daily at least for 3 days post-surgery and longer for surgeries that would have a longer chance of complications.

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.

(Text is identical to Appendix 3.4.4.1.)

The proposed experiments are fundamental research, and are not legally required.

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.

(Text is identical to Appendix 3.4.4.1.)

For some cranial implants, it may be necessary to house mice solitarily after a surgery or brain injection to prevent cage mates damaging surgical wounds or the implants. In such solitary housing, although animals will be physically separated, they will be able to see, smell, and hear other animals in the stable. Mice cage will be enriched by bedding material and also running wheels, pipes and/or shelters when possible.

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.

(Text is identical to Appendix 3.4.4.1.)

During surgery, we will use adequate anaesthesia and analgesia. Also post-surgery analgesics will be administered. Furthermore, before killing any mice, they will be deeply anesthetized.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

(Text is identical to Appendix 3.4.4.1.)

Infections.

In rare cases there is a possibility of infection around the wound area. In these cases, we will apply additional analgesics and/or antibiotics. Visible signs of pathogenesis will be monitored. The following will be considered as signs of an unhealthy state of the animal: aberrant behaviour, dehydration, weight loss, nose and mouth discharge.

Insufficient recovery after surgery.

Applicable if an animal shows weight loss (more than 15% of its post-surgery weight within two days, or more than 20% in total). This occurs infrequently (<2%).

Head post detachment.

If the head post breaks off, the animal is immediately anesthetized to allow assessment of the discomfort level. If the head post becomes loose/detached due to bad adhesion to the skull we are able to reattach the head post in an immediate repair surgery. The repair surgery is performed under anaesthesia and with analgesia in an identical fashion to the original attachment surgery, with the exception that the skin does not need to be cut, this makes the repair surgery both shorter in duration and less invasive than the original implantation surgery. We estimate the discomfort to be moderate during recovery from the anaesthesia (1 day) becoming mild for 1-2 days. In the rare case (<2%) that the detachment of the head post damages the skull, the mouse is immediately euthanized under anaesthesia.

Reopening of craniotomy.

In rare cases (<5%), the craniotomy is reopened causing moderate discomfort. In these cases the mouse is immediately euthanized under anaesthesia.

Explain why these effects may emerge.

(Text is identical to Appendix 3.4.4.1.)

Mild to moderate discomfort due to unintended effects as described above can occur in a small percentage of mice. The head post can become loose due to the forces exerted by the mouse on the head post while fixed in the set-up.

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

(Text is identical to Appendix 3.4.4.1.)

We monitor the animal's behaviour, wound area and physiology in these days after surgery. The surgeries are performed using adequate surgical procedures in semi-sterile conditions and without unnecessary delays to minimize the amount of time the animal is under anaesthesia. Animals will be monitored daily and if adverse effects are present, this will be discussed with the IVD and/or veterinary officer. If necessary, treatment will be initiated (topically or systemically applied medication).

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.

(Text is identical to Appendix 3.4.4.1.)

Each animal that undergoes surgery will be monitored for clinical parameters. The mice will be monitored for their general appearance and activity level. If a mouse has an appearance that gives cause for concern (e.g. signs of infection around the wound, hair standing up or sunken flanks, reduction in activity level) then we will notify the IVD. Similarly, if the animal does not recover well from anaesthesia we will evaluate the animal together with the IVD.

In addition, the weight of the animal will be monitored and if the animal loses 15% of their weight in two consecutive days or if the animal loses more than 20% of their weight throughout the course of the experiment then the IVD will be contacted and a decision will be made whether a humane endpoint has been reached. If the headpost breaks off damages the skull or reopening of the craniotomy occurs, the mouse will be immediately euthanized.

Indicate the likely incidence.

(Text is identical to Appendix 3.4.4.1.)

Humane endpoints are expected to be met in 0-5% of the animals tested within time frame of the experiments.

K. Classification of severity of procedures

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

The cumulative discomfort for the animals that have only acute readout is **mild** (600 mice).
For all other mice in this appendix (2667, including mothers) the cumulative discomfort is **moderate**.

The classification of severity of the individual procedures is described in detail in Appendix 3.4.4.1, and is not repeated here.

Plasticity paradigm procedures are not included in this Appendix.

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.

(Text is identical to Appendix 3.4.4.1.)

For ex vivo histology or molecular analysis, or for slice physiology it is necessary to kill the animal and extract the brain.

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

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

Yes

Format DEC-advies

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: [AVD80100 2017 1045](#)
2. Titel van het project: [Plasticity in the visual system and its regulation](#)
3. Titel van de NTS: [De werking en regulatie van leren in het visuele systeem](#)
4. Type aanvraag:
 - [nieuwe aanvraag projectvergunning](#)
 - wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: [KNAW](#)
 - telefoonnummer contactpersoon: XXXXXXXXXX
 - e-mailadres contactpersoon: XXXXXXXXXX
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: [15-02-2017](#)
 - aanvraag compleet: [15-03-2017](#)
 - in vergadering besproken: [23-02-2017](#) en [23-03-2017](#)
 - anderszins behandeld: [niet van toepassing](#)
 - termijnonderbreking(en) van [27-02-2017](#) tot [15-03-2017](#)
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen: [niet van toepassing](#)
 - aanpassing aanvraag: [finale herziene versie ontvangen op 15-03-2017](#)
 - advies aan CCD: [04-04-2017](#)
7. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.
[De IvD geeft aan dat de aanvrager de aanvraag met de IvD heeft afgestemd en dat de aanvraag de instemming heeft van de IvD](#) XXXXXXXXXX

Bij de punten 8 t/m 10 kan worden volstaan met 'n.v.t.' wanneer de betreffende acties niet aan de orde zijn geweest. Bij vragen die gericht zijn op het compleet maken van de aanvraag (aanvullingen achtergrond informatie etc) kan bij punten 8 en 9 worden volstaan met de vermelding van het type vragen en de vermelding dat de aanvraag op de desbetreffende onderdelen is aangepast of dat de antwoorden in de aanvraag zijn verwerkt. Bij vragen die gericht zijn op het verkrijgen van verklaringen voor keuzes die door de aanvrager gemaakt worden, kan niet worden volstaan met het weergeven van de strekking van de antwoorden tenzij de antwoorden volledig in de aanvraag zijn opgenomen. Als dat het geval is, moet dat in het DEC advies worden benoemd en in de aanvraag inzichtelijk worden gemaakt.

8. Eventueel horen van aanvrager:
 - Datum: [23-02-2017](#)
 - Plaats: Amsterdam
 - Aantal aanwezige DEC-leden: [6](#)
 - Aanwezige (namens) aanvrager: [de hoofdaanvrager](#)
 - Gestelde vraag / vragen: [de mondeling gestelde vragen zijn later tevens schriftelijk aan de aanvrager gestuurd en hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag](#)
 - Verstrekt(e) antwoord(en): [zie onder vraag 9](#)
Het horen van de aanvrager heeft wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag: [wel; zie onder vraag 9](#)

9. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum: [27-02-2017](#); n.a.v. [de bespreking van de eerste versie van de aanvraag](#)
 - Gestelde vraag/vragen: [Aanvullende vragen ter completering van de aanvraag. De vragen waren voornamelijk gericht om meer duidelijkheid te verkrijgen over de relatie van de verschillende plasticiteitsmodellen en de doelstelling van het project. Gezien de aard van de vragen was de DEC van mening dat de herziene versie van het project opnieuw moest worden besproken tijdens de volgende DEC vergadering op 23-03-2017.](#)
 - Datum antwoord: [15-03-2017](#)
 - Verstrekt(e) antwoord(en): [De aanvrager heeft de aanvraag gecomplementeerd en de gevraagde aanpassingen zijn doorgevoerd in de finale versie. Deze versie en de antwoorden zijn besproken door de DEC op 23-03-2017 en de initiële zorgen van de DEC zijn weggenomen in de finale versie.](#)

 - De antwoorden hebben wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag: [wel](#)

10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC): [niet van toepassing](#)
 - 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.
Indien niet vergunningplichtig, ga verder met onderdeel E. Advies.
[Het project is vergunningplichtig.](#)

2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag / een wijziging op een bestaande vergunning.
[Nieuwe aanvraag – Zie A4](#)

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.
[Er zijn geen DEC-leden uitgesloten van de behandeling en het opstellen van het advies.](#)

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 en duidelijke hoofddoelstelling, te weten: het verkrijgen van inzichten hoe verschillende types plasticiteit in het visueel systeem tot stand komen via veranderingen in feedforward en feedback verbindingen en hoe deze veranderingen zijn gereguleerd. Het hoofddoel zal worden bereikt door het verrichten van studies naar de manier waarop ervarings-afhankelijke veranderingen van hersenfuncties, plasticiteit, worden bewerkstelligd door herschikkingen van neuronale verbindingen (subdoel 1) en wat de cellulaire en moleculaire mechanismen zijn die de mate van plasticiteit reguleren (subdoel 2).

De twee subdoelen van het project bestaan uit verschillende opeenvolgende fases die elk in voldoende mate zijn uitgewerkt in de beschrijving van de strategie onder 3.4.1 van het voorstel. De DEC komt tot de conclusie dat de aanvraag overeen komt met voorbeeld 1 van de handreiking 'Invulling definitie project'. De proeven voor de individuele subdoelen vertonen een logische tijds- en uitkomstafhankelijke opeenvolging en zijn verbonden door duidelijke go/no go momenten. Het bereiken van de subdoelen leidt uiteindelijk tot het bereiken van het hoofddoel. De aanvraag is naar de mening van de DEC te typeren als een project. De aanvraag omvat een hoofddoel en twee subdoelen die elk in voldoende mate zijn uitgewerkt. De subdoelen hebben geen onderlinge relatie of tijdsafhankelijkheid en zullen onafhankelijk en parallel aan elkaar uitgevoerd worden. De DEC is van mening dat de aanvraag overeen komt met voorbeeld 4B van de handreiking 'Invulling definitie project' en dus voldoet aan de definitie Project.

Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. 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.

Gezien het bovenstaande komt de DEC tot de conclusie dat de aanvraag voldoende samenhang heeft en daarmee toetsbaar is.

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 Wet Natuurbescherming).
Dit valt buiten de taakstelling van de DEC als beschreven in artikel 18a.2.b van de Wod. Naar deze specifieke informatie wordt in het aanvraagformulier en de bijbehorende toelichting niet gevraagd en de aanvrager heeft deze informatie dan ook niet verstrekt. Het is voor de DEC daarom niet mogelijk om op dit punt een onderbouwde uitspraak te doen. De DEC wil erop wijzen dat mocht dit in sommige omstandigheden wel het geval zijn dat de CCD in een procedure voorziet waarin de aanvrager inzage krijgt en verweer kan voeren.
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* van het project is het verkrijgen van inzichten hoe verschillende types plasticiteit in het visueel systeem tot stand komen via veranderingen in feedforward en feedback verbindingen en hoe deze veranderingen zijn gereguleerd. De nieuwe inzichten zullen kunnen bijdragen aan het verbeteren van therapieën van ziektebeelden die het resultaat zijn van abnormaliteiten in neuronale plasticiteit gedurende kritische fases van ontwikkeling van het brein (amblyopia – autisme – verstandelijke beperking). Verder kunnen de nieuwe inzichten van belang zijn om in het volwassen stadium plasticiteit tijdelijk te verhogen in het kader van regeneratieve hersteltherapieën in de context van neurodegeneratie of hersentrauma.

De DEC is ervan overtuigd dat het doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld. De aanvrager heeft duidelijk gemaakt wat de status van het onderzoeksveld is, wat de bijdrage van het al verrichte werk van de onderzoeksgroep is geweest, en wat de bijdrage van dit project aan het onderzoeksveld naar verwachting zal zijn. Uit de aanvraag blijkt dat de fundamenteel wetenschappelijke kennis over plasticiteit, en de regulatie daarvan, nog beperkt is.

Het directe wetenschappelijke belang van de resultaten is naar opvatting van de DEC groot.

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 onderzoeksproject zijn: (i) *De proefdieren*. De integriteit van de dieren zal in geringe mate worden aangetast. Het merendeel van de dieren (89%) zal matig ongerief ondervinden door de proeven en een kleiner deel (11%) licht ongerief. In het kader van de proeven zullen de dieren worden gedood. De dieren hebben er belang bij om gevrijwaard te blijven van ongerief en doding. (ii) *De bij de uitvoering van het project betrokken onderzoekers*. De onderzoekers zullen een substantiële toename in kennis en vaardigheden verkrijgen. De carrièremogelijkheden van de onderzoekers zullen verbeteren door publicaties. Ook de kans op het behouden en verkrijgen van nieuwe onderzoeksmogelijkheden, veelal deels gebaseerd op een goede wetenschappelijke reputatie, zal toenemen. Deze waarden zijn naar opvatting van de DEC echter van gering gewicht in de ethische afweging. (iii) *Onderzoekers in veld van de neurobiologie*. Dit onderzoek is in de eerste plaats fundamenteel van aard. Het zal resulteren in een toename van de neurobiologische inzichten hoe verschillende types plasticiteit in het visueel systeem tot stand komen via veranderingen in feedforward en feedback verbindingen en hoe deze veranderingen zijn gereguleerd. (iv) *De doelgroepen in de maatschappij*. Deze kennis draagt bij aan inzichten in het ontstaan van ziektebeelden ten gevolge van afwijkingen in neuronale plasticiteit gedurende kritische fases van ontwikkeling van het brein (amblyopia – autisme – verstandelijke beperking) en tevens wordt inzicht gekregen over de manieren waarop in het volwassen brein het niveau van plasticiteit is beperkt hetgeen herstel bij neurodegeneratieve ziektes en na hersentrauma verhindert. Op basis van de nieuw verworven kennis kunnen nieuwe of verbeterde therapieën worden opgesteld met vooruitzichten op een succesvol herstel

Is er aanleiding voor de DEC om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken?

Nee

Proefopzet en haalbaarheid

6. 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).*

De DEC is ervan overtuigd dat de aanvrager over voldoende expertise en de geschikte voorzieningen beschikt om de projectdoelstelling met de gekozen strategie/aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren. De DEC is er van overtuigd dat de aanvrager voldoende expertise heeft om gedurende het project te kunnen blijven voldoen aan de 3V's.

7. 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 van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen van het project en bij recente wetenschappelijke inzichten. 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 fundamenteel wetenschappelijke kennis zal worden verkregen en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak zal leiden tot het behalen van de doelstelling van het project. De gevraagde looptijd van 5 jaar acht de DEC reëel gezien de opbouw, de grootte van de onderzoeksgroep en de financiële ondersteuning van NWO en de Europese Unie.

Tijdens de uitvoering van het project zullen de in de aanvraag beschreven kaders, inclusief de kaders van ongerief, nauwgezet door de IvD bewaakt worden.

De keuze voor het gebruik van de muis als proefdier en het gebruik van de vijf verschillende Type Dierproeven is duidelijk en in goed onderbouwd.

Daarnaast zijn de gegevens uit het vooronderzoek verkregen in de muis en biedt de continuering van het onderzoek aan dezelfde proefdiersoort een grotere kans op het behalen van de doelstellingen.

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 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).*

- 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 categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren.

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 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 dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de richtlijn.
10. 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 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.
Het ongerief is door de onderzoekers ingeschat als matig ongerief voor het merendeel (89%) van de in totaal 7533 muizen en licht ongerief voor 11% van de dieren. De dieren ondervinden maximaal matig ongerief voornamelijk door chirurgische ingrepen en door meerdere meetsessies in wakkere dieren waarbij de kop van het dier is vastgezet. De dieren worden aan het einde van de proef gedood en het weefsel wordt ex vivo onderzocht (slice fysiologie - histologie-moleculaire samenstelling).
- Gegeven de zorgvuldige beschrijving van de procedures in de verschillende bijlagen Type Dierproeven is de DEC van mening dat het genoemde ongerief en het cumulatieve ongerief een realistische inschatting is.
11. 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 de dieren zal in meer of mindere mate worden aangetast tijdens de uitvoering van de proeven. De opgelegde –tijdelijke- beperking van de bewegingsvrijheid en de monoculaire deprivatie zijn de belangrijkste factoren in de aantasting van de integriteit.
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 beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).
De humane eindpunten zijn duidelijk gedefinieerd. De DEC is het met de aanvrager eens dat de kans klein is dat de dieren ten gevolge van de procedures een humaan eindpunt zullen bereiken.

3V's

13. 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 DEC is van mening dat de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen vervangingsalternatieven zijn. Om de fundamenteel wetenschappelijke kennis te vergroten over hoe verschillende types plasticiteit in het visueel systeem tot stand komen via veranderingen in feedforward en feedback verbindingen en hoe deze veranderingen zijn gereguleerd, is het noodzakelijk om proefdieren te gebruiken omdat leertaken en gedrag een belangrijke uitleesparameter zijn. Hiervoor bestaan geen alternatieven op basis van (stam)cellijnen of computermodellen.
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. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

De DEC is van mening dat het maximale aantal van 7533 muizen te gebruiken dieren realistisch is geraamd en proportioneel is ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd. Er is sprake van een sequentiële gefaseerde aanpak van de subdoelen waarbij iedere volgende stap wordt afgewogen op basis van de verkregen resultaten.

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 beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

De DEC heeft zich ervan verzekerd dat de aanvrager al het mogelijke heeft gedaan om het eventuele ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen. De verwachting is dat humane eindpunten zelden zullen worden bereikt.

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. Licht uw beoordeling toe.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

Er is geen sprake van wettelijk vereist onderzoek. Alle dieren in proef worden na afloop gedood en het weefsel wordt voor ex-vivo studies gebruikt.

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. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3; zie bijlage I voor voorbeeld*).

De aanvrager gebruikt zowel mannelijke als vrouwelijke dieren behalve wanneer er vooraf redenen zijn om aan te nemen dat het gebruik van beide geslachten zal resulteren in een hoger aantal proefdieren. Dit zal altijd vooraf met de IvD worden besproken.

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 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*).

De aanvrager geeft aan dat het noodzakelijk is om dieren te doden in het kader van het project. Het weefsel wordt voor ex-vivo studies gebruikt en de verkregen gegevens dragen bij aan het behalen van het doel. De aanvrager gebruikt voor het doden een methode die beschreven is in bijlage IV van de richtlijn en waarvoor geen aanvullende voorwaarden gelden.

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.

Niet van toepassing.

NTS

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

begrijpelijk geformuleerd?

De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

1. Benoem de centrale morele vraag (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.A*).
Rechtvaardigt het vergroten van de neurobiologische inzichten hoe verschillende types plasticiteit in het visueel systeem tot stand komen via veranderingen in feedforward en feedback verbindingen en hoe deze veranderingen zijn gereguleerd het merendeels matig ongerief dat dieren wordt aangedaan in het voorliggende 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*).
De volgende waarden/belangen zijn in het geding (zie onderdeel C5): Waarden/belangen met betrekking tot de proefdieren: de dieren ondervinden *maximaal matig ongerief* dit wordt door de DEC beschouwd als *veel nadeel*. De belangen voor de uitvoerende onderzoekers: *veel voordeel*. De belangen met betrekking tot de doelgroepen binnen het veld van de neurobiologie: de kennisvergroting wordt door de DEC gezien als *zwaarwegend en veel voordeel*. De belangen met betrekking tot de maatschappij (patiëntengroepen): op korte termijn *gering voordeel* maar op lange termijn *mogelijk veel 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 is van mening dat de benoemde belangen van de wetenschap en samenleving in dit project zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de proefdieren. De volgende overwegingen hebben bijgedragen tot deze conclusie:
 - Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit resulteren in een aanmerkelijke toename van de neurobiologische inzichten hoe verschillende types plasticiteit in het visueel systeem tot stand komen via veranderingen in feedforward en feedback verbindingen en hoe deze veranderingen zijn gereguleerd. Deze mechanismen zijn ook betrokken bij het ontstaan van ernstige ziektebeelden zoals amblyopie, autisme en verstandelijke beperking en de verkregen inzichten in neuronale plasticiteit kunnen bijdragen aan mogelijke behandelingen. Daarnaast bieden de resultaten ook een mogelijkheid om met kennis van de regulatie van plasticiteit neuroregeneratieve therapieën op te stellen.
 - De DEC is van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en

recente wetenschappelijke inzichten. De gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.

- Het is aannemelijk dat de doelstellingen behaald zullen worden. Om dit doel te bereiken is het nodig proefdieren te gebruiken. De onderzoekers doen er echter alles aan om het lijden van de dieren te beperken waardoor het uiteindelijk ongerief van elk individueel dier, naar verwachting, beperkt blijft tot maximaal matig ongerief.
- De DEC is overtuigd van het belang van de wetenschappelijke doelstelling en het belang van de nieuwe kennis.
- De DEC is er van overtuigd dat de aanvrager voldoende kennis en kunde heeft om de doelstellingen te behalen, en tijdens de uitvoering van het project te kunnen voldoen aan de 3V-beginselen.
- De DEC is van mening dat de aanvrager bij de uitvoering van het project alle mogelijke maatregelen treft om het ongerief van de dieren te beperken en het aantal dieren tot een minimum te beperken.

Gezien bovenstaande overwegingen is de DEC van opvatting dat het bereiken van de doelstelling, op de wijze zoals beschreven in deze projectaanvraag, 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: **geen**.
- 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 unaniem

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*).

De DEC heeft geen dilemma's gesignaleerd die binnen of buiten de context van het project vallen.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Kon. Ned. Academie van Wetenschappen (KNAW)

Postbus 19121

1000 GC 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
AVD8010020171045

Bijlagen

2

Datum 5 april 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED],

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 4 april 2017. Het gaat om uw project "Plasticity in the visual system and its regulation". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD8010020171045. 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:

5 april 2017

Aanvraagnummer:

AVD8010020171045

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
5 april 2017
Aanvraagnummer:
AVD8010020171045

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 80100
Naam instelling of organisatie: Kon. Ned. Academie van Wetenschappen (KNAW)
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 54667089
Postbus: 19121
Postcode en plaats: 1000GC AMSTERDAM
IBAN: NL33DEUT0546900054
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: [REDACTED]

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Datum:
5 april 2017
Aanvraagnummer:
AVD8010020171045

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]

Functie: Groepsleider

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 mei 2017
Geplande einddatum: 1 mei 2027
Titel project: Plasticity in the visual system and its regulation
Titel niet-technische samenvatting: De werking en regulatie van leren in het visuele systeem
Naam DEC: DEC-KNAW
Postadres DEC: [REDACTED]
E-mailadres DEC: [REDACTED]

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1.727,-
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: 4 april 2017

Datum:

5 april 2017

Aanvraagnummer:

AVD8010020171045



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Kon. Ned. Academie van Wetenschappen (KNAW)

Postbus 19121

1000 GC 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
AVD8010020171045

Bijlagen

2

Datum 5 april 2017

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 5 april 2017

Vervaldatum: 5 mei 2017

Factuurnummer: 171045

| Omschrijving | Bedrag |
|---|------------|
| Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD8010020171045 | € 1.727,00 |

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.

[REDACTED]

Van: secretariaat DEC [REDACTED]
Verzonden: maandag 24 april 2017 17:17
Aan: 'info@zbo-ccd.nl'
Onderwerp: FW: AVD8010020171045 Aanvullende informatie t.a.v. [REDACTED]
Categorieën: Dossier: [REDACTED]

Beste [REDACTED]

Ik heb vandaag namens de indieners / onderzoekers de gevraagde aanvullende informatie via NetFTP aangeleverd. De projectduur is inderdaad 5 jaar.

Misschien goed om te weten dat de KNAW [REDACTED] een mevrouw is..

Groet [REDACTED]
DEC-KNAW

From: [REDACTED]
Sent: woensdag 19 april 2017 9:44
To: secretariaat DEC [REDACTED]
Subject: FW: AVD8010020171045 Aanvullende informatie

Van: [REDACTED]
Verzonden: woensdag 19 april 2017 8:10
Aan: [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: AVD8010020171045 Aanvullende informatie

Geachte meneer [REDACTED]

Op 4 april 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'Plasticity in the visual system and its regulation' met aanvraagnummer AVD8010020171045. Wij hebben nog een aantal vragen over uw aanvraag. In deze e-mail leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

- U wordt verzocht informatie te verstrekken over de leeftijd van de pups die een head fixation post krijgen en de duur van de proef. Jonge pups zullen namelijk nog behoorlijk groeien. Bij langdurige bevestiging kan een head fixation post of loskomen en bloedingen veroorzaken of ongerief induceren door het blokkeren van een groeiende schedel.

-In het aanvraagformulier geeft u aan dat de gewenste duur van de vergunning 10 jaar is. Wij gaan er van uit dat dit een verschrijving is en dat u de vergunning aanvraagt voor een periode van 5 jaar. U wordt verzocht dit te bevestigen.

Opsturen binnen veertien dagen

U heeft veertien dagen de tijd om de ontbrekende informatie aan te leveren. U kunt dit aanleveren via NetFTP.

Wanneer een beslissing

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

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 www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl (Let op: nieuw e-mail adres)

De Rijksdienst voor Ondernemend Nederland (RVO.nl) stimuleert Duurzaam, Agrarisch, Innovatief en Internationaal ondernemen.

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

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

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

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

24 april 2017

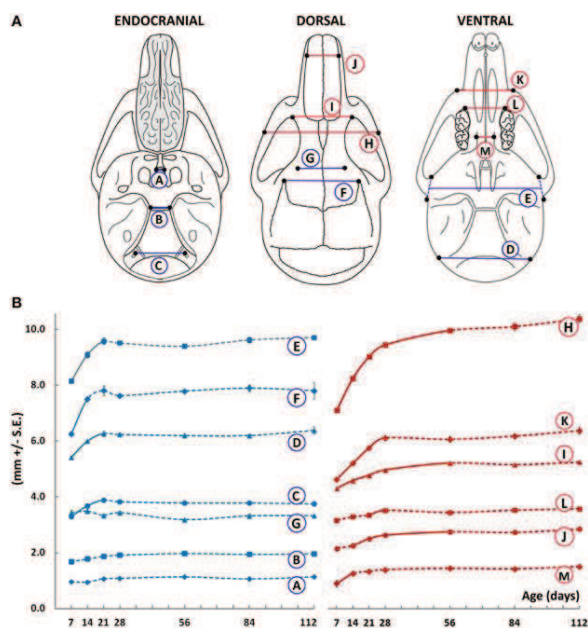
AVD8010020171045.
project 'Plasticity in the visual system and its regulation'

Geachte CCD,

1. De vergunning wordt inderdaad voor een periode van 5 jaar aangevraagd.
2. In antwoord op uw vraag: "U wordt verzocht informatie te verstrekken over de leeftijd van de pups die een head fixation post krijgen en de duur van de proef. Jonge pups zullen namelijk nog behoorlijk groeien. Bij langdurige bevestiging kan een head fixation post of loskomen en bloedingen veroorzaken of ongerief induceren door het blokkeren van een groeiende schedel.", kunnen wij het volgende zeggen:

Het vastmaken van een permanente head fixation post doen wij bij muizen vanaf postnatale dag 21 (P21) of ouder. De achterkant (posterieur) van de schedel, waar we de head post plaatsen, is dan volgroeid, zoals de blauwe lijnen uit onderstaande figuur uit Vora et al. (Frontiers in Physiology, 12 January 2016) laten zien. Het vastmaken van de head fixation post bij dieren tussen P21 en P35 gebeurt voor proeven die betrekking hebben op de kritische periode voor plasticiteit in de visuele cortex. Deze proeven zullen niet langer dan 2 maanden duren. Voor experimenten in muizen na de kritische periode, dat wil zeggen ouder dan P35, kan de periode tot een jaar duren maar zal doorgaans korter zijn.

Hoewel het deel van de schedel waar de head fixation post aan vast zit dus niet meer groeit nadat de head fixation post is vastgemaakt, is het nog steeds mogelijk dat de post loslaat door andere oorzaken, zoals we in de appendices in sectie I hadden aangegeven. De meest waarschijnlijke oorzaak hiervan is slechte hechting van de lijm aan de schedel. In onze aanvraag is in de appendices al beschreven hoe we met het loslaten van de post om zullen gaan wanneer dit toch gebeurt.



Met vriendelijk groet,

██████████

██████████

PS. Twee leden van de IvD ██████ hebben bovenstaande aanvullende informatie bekeken en stemmen in met de antwoorden.



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.

Brain plasticity and its regulation

The brain shows a tremendous ability to adapt to its ever-changing environment. At the root of this adaptation is the formation and refinement of neural circuits (referred to as "plasticity"), allowing our brains to develop, acquire knowledge, learn new skills and recover from injuries.

The goal of this project is to increase our fundamental scientific understanding on how plasticity is accomplished. Our hypothesis is that plasticity in the brain is brought about and modulated by several interrelated mechanisms: i) rearrangements of feedforward connections (dominant at critical periods during development, ii) rearrangements of feedback connections (dominant in adulthood), iii) changes in the influence of interneurons to temporarily enhance plasticity so that it occurs only when necessary (for example: during specific stages of development or upon punishment or reward).

Connectivity of the visual system

To reach this goal, we use the visual system of the mouse as a model. The main reason is that there is a solid understanding of the basic wiring principles of the visual system, allowing us to study where and how changes in connectivity occur during plasticity.

The visual system responds to inputs from the two eyes (Fig. 1A). These feedforward inputs from the eyes first enter the lateral geniculate nucleus of the thalamus. Because a fraction of the axons from the retina do not cross in the optic chiasm, inputs from both eyes will enter the left and right thalamus. Thalamic relay neurons project to the primary visual cortex (V1). Neurons in V1 further process the information and send projections to higher visual cortices and thalamic nuclei in which more complex visual patterns are processed. The eyes also provide input to the superior colliculus which is important for regulating, among others, eye movements. The superior colliculus, in turn, projects to the thalamus. Within the visual system there are also extensive feedback connections (Fig. 1B). Visual cortical areas receive these feedback inputs from higher visual and frontal cortices providing contextual information about the visual scene, the task that is being carried out, the state of the animal, etc. The thalamus and superior colliculus also receive feedback information from the visual cortex. This reiterative connectivity makes it possible for the brain to anticipate and rapidly interpret the flow of information that enters the brain via the eyes.

Visual responses

When visual stimuli are provided to a mouse, neurons in the visual system will respond to it. This can be recorded using electrophysiological or imaging approaches. To what properties of visual stimuli a particular neuron responds depends on the brain region it is in and the specific synaptic inputs it receives. Neurons in the thalamus, for example, mainly respond to small patches on a contrasting background while neurons in V1 respond preferentially to bars moving in a particular direction. Neurons in V1 also have a preference for inputs from the left or right eye. This property is called ocular dominance (OD). It is a direct consequence of the fact that inputs from the two eyes project to both hemispheres. Binocular vision also enables depth perception, as it allows for the comparison of images from the two eyes. Surprisingly, mouse visual cortical areas including V1 do not only respond to visual stimuli but also to motor activity, reward or punishment, anticipation, decision making, etc. This is a consequence of the feedback inputs V1 receives from higher visual and prefrontal cortices and high order thalamic nuclei. In higher visual areas, neurons respond to more complex visual properties. Here, neurons may respond to particular objects or sceneries. Taken together, the responses in the visual system are defined by the circuits that the neurons form through their synaptic connections.

Plasticity in the developing and adult visual system and its regulation

Another reason why the mouse visual system is attractive for studying plasticity is that it is relatively easy to illicit and record responses in the visual cortex and subcortical regions upon visual stimulation and to relate changes in these responses (plasticity) to connectivity changes. Of special importance for our research is that there is a well-defined critical period of development during which plasticity of OD can take place. This allows us to compare the connections that undergo plasticity during this critical period, with the connections that undergo plasticity in adulthood. Moreover, it allows us to investigate the mechanisms that regulate plasticity during the critical period, and those that regulate adult plasticity, and relate these mechanisms to the specific connections that undergo plasticity.

i) Developmental plasticity and critical periods

During development, there are defined periods during which specific brain regions show a heightened plasticity potential. Generally speaking, lower order brain regions (for example those processing sensory inputs) undergo plasticity before higher brain regions (for example those involved in executive functions).

During the critical period of OD plasticity (Fig. 2, left panel) the feedforward connections from the eyes are fine-tuned which is important for the development of normal binocular vision. If misguided, for example by dysfunction or misalignment of one eye, the visual cortex will become less responsive to this eye causing the condition known as amblyopia, or "lazy eye". When in experimental animals one of the eyes is closed during a defined period of postnatal development, V1 will become less responsive to the deprived eye while responses to the non-deprived eye are strengthened. This functional change is accompanied by (and probably caused by) extensive structural changes: thalamic axonal feedforward projections from the deprived eye retract while those of the non-deprived eye expand. Notably, OD plasticity only occurs efficiently and permanently during a critical period of development (postnatal 3-5 weeks in mice). This has made OD plasticity very informative in the study of structure/function relationships during plasticity, and in understanding the mechanisms that regulate plasticity levels – specifically the factors that regulate the onset and closure of critical periods. We have used this model extensively, to identify molecular [1-5] and cellular mechanisms underlying and regulating critical period plasticity [6,7].

ii) Adult plasticity

In the adult visual system, after critical period closure, other mechanisms underlying plasticity become dominant. In adults plasticity is induced when large reductions in sensory input occur over prolonged periods of time. For example plasticity in primary visual cortex occurs after damage to the retina. This results in the "filling in" of the visual field so that one does not experience the lesion as a black spot. This form of plasticity is important, as like OD plasticity, it is induced by visual deprivation (though requiring an almost complete loss of input from (part of) the retina), but in contrast to OD plasticity it occurs readily in adulthood. This experimental model thus allows us to address the question whether it involves rearrangement of feedforward connections like critical period plasticity, or whether it alters feedback connections, as is expected for other forms of adult plasticity. In our laboratories we have employed this form of adult plasticity to study the relationships between the gain and loss of synapses and the trafficking of mitochondria [8].

A more natural type of adult plasticity occurs in association with perceptual learning: an improvement in the ability to detect or discriminate stimuli induced by repeated practice (Fig. 2 right panel). This is the type of learning that enables the trained birdwatcher to spot rare birds in the woods that untrained people miss out on. Perceptual learning takes place in adulthood and involves various brain areas including V1. In contrast to OD plasticity, perceptual learning is strongly modulated by reinforcement signals, such as reward or punishment [9]. With perceptual learning, responses of neurons in the visual system change. Interestingly, not only responses to particular features of trained visual stimuli alter, but neurons in the visual system also start responding to anticipated reward or punishment, choices the mouse makes or task-related behaviour. In our laboratories we have established perceptual learning tasks for mice, in which mice learn to differentiate between different visual stimuli. This lets us monitor, in real time, how the responses of hundreds of neurons change during learning. A related form of reinforcement learning is visual fear learning, during which a particular visual context is associated with an aversive stimulus such as an electric shock. Once the association is made, the animal will show freezing behaviour when the visual stimulus is presented to the mouse. These plasticity paradigms typically tune responses in lower visual brain regions to more complex contextual information. Therefore we believe these forms of plasticity involve plasticity of feedback connections providing such information. Some forms of experience-dependent plasticity that occur readily in adulthood do not require reinforcement. This is called unsupervised learning and involves, for example, reduced responsiveness to repeated stimuli that initially provide a startling or novelty response. In our hands, mice learn not be afraid of objects that unexpectedly fly over or approach quickly, a process likely to involve interaction between the visual cortex and the superior colliculus. Another example is that mice stop paying attention to objects in their cage once they become familiar with them. Unsupervised learning is thus distinct from deprivation-induced plasticity, as it is induced by visual stimuli and not by continuous lack thereof, and from perceptual learning, as it does not require reinforcement. It is therefore important to understand

whether feedforward and feedback connections between thalamus, superior colliculus and V1 rearrange during this form of plasticity, and what the regulatory mechanisms are. Moreover, unsupervised learning will also occur (unintentionally) during reinforcement learning paradigms, as the mice will get used to the handling, the experimental setup, the visual stimuli that are shown repeatedly, etc. It is therefore important to know which changes in connectivity are induced by unsupervised learning in order to isolate those that are induced specifically by reinforcement learning.

Taken together, by studying and comparing how specific feedforward and feedback connections are reorganized during critical period plasticity, adult deprivation-induced plasticity, reinforcement learning and unsupervised learning we will be able to identify overarching principles of experience-dependent connectivity changes.

iii) Regulation of plasticity

From the above it is apparent that plasticity occurs at specific developmental stages, or under particular circumstances, for example upon reward or punishment or after prolonged lack of sensory input. This means that plasticity levels must be under regulatory control allowing the different forms of plasticity, such as critical period plasticity or perceptual learning to occur only when needed. A comprehensive understanding of the fundamental mechanisms of plasticity also encompasses an understanding of these regulatory mechanisms and how they relate to the changes in connections that effectuate plasticity under different circumstances. This can be achieved particularly well in mice, as many powerful approaches for genetic modification have been developed for mice, rapidly advancing our lines of research.

We and others have identified various molecular targets that regulate plasticity levels during the critical period. These include genes that regulate axon growth and retraction, synapse maturation or the formation of the extracellular matrix. Interestingly, many of these genes strongly affect plasticity levels when their expression is modified in a specific subset of inhibitory interneurons: parvalbumin (PV)-expressing basket cells. This strongly supports the idea that these interneurons play an important role in regulating plasticity levels during critical periods [6,7]. Interneurons represent 10-20% of all neurons in the brain. In contrast to excitatory neurons that employ glutamate as a neurotransmitter, interneurons use GABA as a neurotransmitter, through which they inhibit other neurons they contact. The onset of the critical period of OD plasticity involves the development of inhibitory innervation of the cortex [10] and thalamus (Sommeijer et al, under revision for Nature Neuroscience). The further increase in the level of inhibition with development then appears to close the critical period, suggesting that a certain balance in inhibition and excitation is required for plasticity. Our work on a mouse model of Neurofibromatosis type 1 (NF1), a monogenetic developmental brain disorder associated with intellectual disability and autism, illustrates the relevance of mechanism. We find that in NF1 mice, cortical interneurons are hyperexcitable. As a consequence, these mice show early closure of the critical period. When these mice develop in an enriched environment, both cortical inhibition and critical period closure normalize. Importantly, PV+ interneurons provide important feedforward inhibition (they receive feedforward input, and inhibit excitatory neurons receiving the same inputs). Our hypothesis is that interneurons that provide feedforward inhibition are the perfect candidates to regulate plasticity of feedforward connections during critical periods.

Importantly, changes in inhibition/excitation balance also occur at the moment that plasticity is induced in adulthood. In the adult visual cortex, for example, inhibitory synapses are lost when the retina is damaged [11]. Moreover, the activity of interneurons in the visual cortex is reduced during perceptual learning [12]. These changes in inhibition appear to be crucial as activating or decreasing inhibition has been shown to reduce or increase plasticity levels [13,14]. Notably, the changes in inhibition that occur in adulthood seem to involve different subsets of interneurons than those regulating plasticity during the critical period (Fig. 2). Especially somatostatin (SST) expressing interneurons appear to be involved, which predominantly inhibit the dendrites of cortical neurons that receive feedback connections. We therefore hypothesize that interneuron subsets that gate feedback inputs are in the best place to regulate these connections in adulthood.

How the changes in the activity of inhibitory neurons or the persistence of their synapses are achieved remain unclear, as are the mechanisms through which disinhibition enhances plasticity during critical

periods or in adulthood. Our experiments have shown that during critical periods, inhibition does not have an instructive role, meaning that disinhibition does not selectively increase learned responses [7]. More likely, inhibition plays a permissive role, setting a level of plasticity. In summary, over the last years it has become clear that a temporary reduction of inhibition (disinhibition) is a critical factor in the enhancement of plasticity levels, not just during development but also in the adult visual cortex. However, this appears to involve different interneuron subsets, depending on the type of plasticity that occurs.

Open questions

Despite the growing knowledge on the anatomy of the visual system, very little is known about how experience-dependent plasticity is achieved through specific rearrangement of these connections. Most progress has been made in understanding the connectivity changes during OD plasticity during the critical period, where it is known that feedforward thalamocortical projections alter their connections to neurons in primary visual cortex. However, we have recently discovered that in contrast to what is generally believed, also within thalamus extensive OD plasticity takes place. This illustrates that even in this well-studied model, the basic principles are still not clear. What connectivity changes underlie perceptual learning, contextual fear learning or unsupervised learning in adulthood is even less well understood.

How plasticity levels are regulated is also not well understood. As explained above, disinhibition enhances plasticity. How disinhibition by specific interneuron subsets enhances plasticity, and how this can be achieved under the relevant circumstances and affect the relevant feedforward or feedback circuits needing adjustment remains unresolved. Moreover, the contribution of other mechanisms than disinhibition in the regulation of plasticity levels, such as axon growth and retraction, synapse maturation or the formation of the extracellular matrix, is unclear and requires further investigation.

The main goal of our research is therefore to gain fundamental scientific understanding on the general principles of how different types of plasticity are achieved through changes in feedforward or feedback connectivity and how these types of plasticity are regulated. We focus on the plasticity of the visual system as model.

This goal is of social relevance (see 3.3 for details). Since maladaptive plasticity mechanisms underlie a number of brain disorders (see below), understanding the overarching principles of plasticity mechanisms provides important future handles for studying the pathophysiology of such disorders. In addition, understanding the mechanisms through which plasticity levels are regulated may ultimately result in the development of approaches to enhance plasticity levels for therapeutic purposes, such as the treatment of neurodevelopmental disorders or improvement of recovery after brain damage.

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?

We aim to increase the knowledge on the general principles of how different types of plasticity in the visual system are achieved through changes in feedforward or feedback connectivity and how these types of plasticity are regulated.

To reach our main goal we formulated the following two sub-aims:

1. How are experience-dependent changes in brain function accomplished by rearrangements of neuronal circuits?

Our goal here is to define overarching principles of how different forms of plasticity (both developmental and adult) are achieved by modification of specific neural circuits. Our working hypothesis is that critical

periods involve rearrangement predominantly of feedforward connections, thus optimizing the circuits to process sensory inputs (Fig. 2). At later stages, associative/feedback connections are the dominant substrates of plasticity, allowing us to make novel associations. To test this hypothesis, we will identify the brain regions involved in critical period plasticity, perceptual learning, fear learning or unsupervised learning based on visual information, study the structural and functional properties of neuronal responses in these brain regions and how these change with learning, and compare the synaptic substrates of plasticity in these different developmental and adult forms of plasticity.

2. What are the cellular and molecular mechanisms that regulate plasticity levels?

Here we aim to understand how regulation of plasticity levels is achieved specifically in those brain regions and synaptic connections relevant for the learned task or function. A major focus will be on the role of disinhibition in this process. Our working hypothesis is that selective regulation of plasticity is achieved by specialized subsets of inhibitory neurons in the visual system. This hypothesis is supported by the finding that cortical (parvalbumin-expressing) interneurons that provide feedforward inhibition regulate plasticity of feedforward connections during the critical periods, while (somatostatin-expressing) interneurons that gate feedback connections regulate perceptual learning in adulthood (Fig. 2). To test this hypothesis, we will induce plasticity using defined plasticity paradigms, and compare how the activity of specific interneuron subsets and/or their synapses in the brain areas undergoing plasticity change. To establish a causal role of these changes in inhibition we will alter the activity of specific interneurons subsets or their synapses and study the effect on information processing and learning. It is also possible that specific signaling pathways are identified that regulate plasticity in defined brain regions or synaptic connections. We will therefore also use genetic or proteomic screening approaches and gene manipulation approaches to study molecular pathways regulating plasticity.

Expected outcome

We anticipate that at the end of this 5-year project we will have clearly defined whether our hypothesis that feedforward connections are the main substrate of critical period plasticity, and feedback connections are the main substrate in plasticity during adulthood is correct or not. We will also have tested whether these rules are limited to the primary visual pathway or whether they can be generalized to other (subcortical) brain regions involved in visual processing. We will also have shown which interneuron subsets regulate plasticity in thalamus and cortex during the critical period and in adulthood. We hope that we can also define roles for interneurons in other brain regions of the visual system, such as the superior colliculus. Finally, we anticipate that we will have identified molecular targets and signaling pathways that specifically affect plasticity of feedforward or feedback connections, or its regulation by specific interneuron subsets and may be relevant for understanding the pathogenesis or developing treatments for neurodevelopmental disorders such as neurofibromatosis type I.

Feasibility

The described research is highly feasible and represents ongoing and future research projects (see appendix "overview DEC proposals" for an overview of the approved DEC proposals that are currently in progress). Our laboratory is experienced and well equipped for performing the research lines. During the last 15 years we have been studying plasticity in the visual system and established a wide range of state-of-the-art experimental approaches enabling us to perform the planned research. These include experimental paradigms to induce plasticity during critical periods (OD plasticity) and in adulthood (lesion-induced plasticity, perceptual learning, habituation), approaches to record neuronal activity in vivo (single- and multiunit recordings, cell-attached recordings, optical imaging of intrinsic signal, in vivo two-photon calcium imaging) or in slices (multi-electrode patch-clamp recordings, field-potential recordings, calcium imaging), two-photon microscopy to chronically image synapse morphology in vivo, gene manipulation approaches (transgenesis, viral vectors, in utero electroporation etc.), immunohistochemistry, tissue clearing techniques, western blotting, etc. All of these techniques have resulted in publications in high impact journals [1,2,5,6,8,15-22]. Our research efforts are embedded in the environment of the NIN, providing excellent infrastructure, technological support and outstanding scientific interactions. Moreover, our research is well-linked within the national and international scientific

community.

The quality of our work is further underscored by the recognition through research funding agencies (e.g. NWO, HBP, EU). The planned research is currently funded by grants from NWO and the EU.

3.3 Relevance

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

Scientific relevance: Uncovering general principles of how neuronal networks can effectively improve their performance through experience will advance our scientific understanding on a fundamental neurobiological mechanism namely the ability of the brain to learn from experience. Our research is not only important for scientists working in the visual system, but for many scientists whose research is related to plasticity mechanisms in other brain regions. Our experiments also have impact on scientists working on artificial intelligence, brain-machine interfaces and neuroinformatics and for software developers making use of these approaches. Our laboratories perform research for the Human Brain Project, in which scientists building brain models rely on experimental information they receive from neuroscience laboratories. Moreover, the Human Brain Project incorporates the knowledge we acquire to develop robots with artificial intelligence.

Social relevance: Our research may, in the long run, have several important therapeutic implications. *First*, critical period plasticity in the visual system is an excellent model for studying the cause of amblyopia ("lazy eye") when vision is impaired during childhood due to misalignment of the optical axes or inequality of refractive power of the two eyes. Amblyopia is the most prevalent (2-4%) visual disorder in young people. Of all amblyopes, 3-18% will become visually impaired in their unaffected eye in the course of their life through injury or illness (like all people), causing binocular visual impairment and severe disability in 1:1000 people. The discovery of novel approaches to reactivate plasticity after critical period closure may result in novel avenues to treat amblyopia in adults. *Second*, various neurodevelopmental disorders such as autism and intellectual disability, have been suggested to be caused by deficits in critical period plasticity. Understanding the principles of regulating plasticity levels may ultimately provide new handles on treating these diseases.

As an example: our work on mice lacking a copy of the Neurofibromatosis type 1 gene, causing autism and intellectual disability in humans, reveals that this deficit increases cortical inhibition and causes precocious critical period closure.

Third, finding approaches to (temporarily) increase cortical plasticity is also important for the development of regenerative and restorative therapeutic approaches. This is especially important for the future treatment of neurodegenerative diseases, improving brain function after physical trauma. In addition, various developments are underway for restoring vision in the blind. This includes reactivation of retinal function using optogenetics, but also implantation of electrode grids in the visual cortex to directly input visual information. These approaches will mostly likely require plastic changes to let the visual system adapt to the new types of the inputs.

The proposed experiments are primarily aimed at answering fundamental scientific questions on visual plasticity and the direct aim is not to develop new treatments. This notwithstanding, we have already found novel approaches to increase adult cortical plasticity and we are testing whether these can be applied to improve brain development in a mouse model of intellectual disability and autism (Neurofibromatosis type 1). This illustrates that our fundamental approach can lead to therapeutically relevant discoveries.

3.4 Research strategy

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

Sub-aim 1. How are experience-dependent changes in brain function accomplished by rearrangements of neuronal circuits?

This issue is addressed in different stages with decision points in between (see Fig. 3). Depending on the current knowledge on a particular form of plasticity or a particular brain region, projects may start at different stages.

A1. To determine how changes in neuronal connectivity result in functional plasticity, an appropriate paradigm is selected for inducing the form of plasticity of interest. The main categories of learning that we address and compare in the visual system are critical period plasticity (by eyelid suture) ([Animal Procedures 3.4.4.1 and 3.4.4.2](#)), lesion induced plasticity (by enucleation or retinal lesioning) ([AP 3.4.4.1 and 3.4.4.2](#)), perceptual learning (using reinforcement to train mice to respond to visual stimuli), contextual fear conditioning (by associating a visual stimulus with an aversive stimulus) and unsupervised learning (by repeatedly providing visual stimuli until the mouse is used to them) ([all AP 3.4.4.3 and 3.4.4.4](#)). The exact paradigm is selected based on the literature or our previous experience. In some cases, novel plasticity paradigms need to be developed, for example to study particular forms of perceptual learning or habituation.

A2. The next steps are aimed at determining the brain region in which the relevant information is processed (A2a) and plasticity occurs (A2b). In most cases, this is known from the literature and the brain region of study is selected together with the plasticity paradigm. However, for some types of plasticity it may be unclear where the relevant information is processed. For example, if a mouse performs a task in which it needs to learn to associate one image with a reward but not another image, one would first need to determine which visual areas are capable of differentiating between the two images. This means that if the function and anatomy of a particular brain region of the visual system is not sufficiently well-documented, we will need to investigate its function in more detail before we can examine its plasticity ([AP 3.4.4.5](#)). It may also be possible that experiments from the lab hint towards plasticity taking place elsewhere than always assumed. Our recent discovery that there is extensive OD plasticity within the thalamus illustrates this. Thus, in cases where the brain region of plasticity is not defined, recordings will need to be performed to identify and characterize regions in which a) the relevant information is processed and b) plasticity takes place. Depending on the brain region and specific plasticity type, our recordings can be done by two-photon microscopy of calcium signals, in vivo electrophysiology approaches or by optical imaging of intrinsic signal ([AP 3.4.4.1, 3.4.4.2, 3.4.4.3, 3.4.4.4, 3.4.4.5](#)).

Only if the relevant brain region is determined, the project is continued to study the nature of the underlying mechanisms leading to plasticity.

A3. We perform experiments to determine where in the circuitry of this brain area plasticity occurs. This analysis can take place at the anatomical or functional level. At the anatomical level this either involves chronic two-photon microscopy of fluorescently labelled neuronal structures, or post-hoc tracing experiments. At the functional level this may involve electrophysiological approaches or imaging approaches to identify the cell types/ synaptic structures that undergo plasticity. The focus will be on understanding whether changes in feedback or feedforward connections dominate and how functional and anatomical changes are related ([AP 3.4.4.1, 3.4.4.2, 3.4.4.3, 3.4.4.4, 3.4.4.5](#)).

A4. Finally, and if an experimental approach is available, we interfere with the observed plasticity in order to study the causal relationship ([AP 3.4.4.1, 3.4.4.2, 3.4.4.3, 3.4.4.4, 3.4.4.5](#)).

An example of our strategy: experiments in the lab suggested that OD plasticity may take place in thalamus. We chose to test this by establishing whether there were binocularly responsive neurons in thalamus. This was confirmed, and the nature of binocular responses was determined. Next it was decided to monocularly deprive mice during the critical period and study changes in binocular responses. We found that binocular neurons in the thalamus become more responsive to the open eye. To determine which inputs have altered (feedback, or feedforward), we plan to repeat the experiment, and measure whether the change in binocularity after deprivation remains the same when the visual cortex (which

provides feedback to thalamus) is silenced. If so, feedforward connections must be altered. Finally, to understand whether plasticity in V1 depends on plasticity in thalamus, we will inactivate plasticity genes (CamKinase II for example) in thalamus and study whether this interferes with plasticity in thalamus and V1

Sub-aim 2. What are the cellular and molecular mechanisms that regulate plasticity levels?

B1. To study how plasticity levels are regulated in a particular brain region, we first select the paradigm and brain region in which we want to address the question. This choice is made based on previous experiments (as described above) or from literature ([AP 3.4.4.1](#), [3.4.4.2](#), [3.4.4.3](#), [3.4.4.4](#), [3.4.4.5](#)).

B2. We will then study how cellular (inhibitory/excitatory balance for example) or molecular (gene/protein expression) properties change under these circumstances. We may study this at the anatomical level (change in synapse number) or functional level (change in synapse function or interneuron activity) or at the protein/gene expression level ([AP 3.4.4.1](#), [3.4.4.2](#), [3.4.4.3](#), [3.4.4.4](#), [3.4.4.5](#)).

B3. Finally, we will interfere with the change in inhibition in order to understand whether there is a causal relationship between the change in inhibition and plasticity and to study the mechanisms by which inhibition regulates plasticity. This will be accomplished by manipulating the activity of specific neuronal populations (opto/chemo-genetics). Candidate genes/proteins may also be selected (from B2) and their function altered in order to test how they regulate functional properties of the relevant brain region ([AP 3.4.4.5](#)) and what their role is in plasticity ([AP 3.4.4.1](#), [3.4.4.2](#), [3.4.4.3](#), [3.4.4.4](#)).

Example: we knew from literature that inhibition regulates OD plasticity. We developed an approach to chronically visualize inhibitory synapses in mice. We used this approach to study the formation and loss of inhibitory synapses in V1 of mice during OD plasticity and discovered that they were rapidly lost during plasticity. To understand whether this relationship is causal, we will now interfere with the stability of inhibitory synapses by molecular intervention to study the causal relationship. We have also interfered with inhibitory interneuron function during the assessment of OD plasticity and found that changes in inhibition do not directly influence OD itself, but only its plasticity.

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 type of experiments we perform to address our research questions are very complex and have many experimental variables although they do not vary much in the degree of discomfort caused to the animals. It is therefore more effective to cluster the experiments based on whether plasticity is induced by visual deprivation ([AP 3.4.4.1](#) and [3.4.4.2](#)) or visual learning ([AP 3.4.4.3](#) and [3.4.4.4](#)), or whether it only involves characterization of the molecular/anatomical or functional properties of a brain region ([AP 3.4.4.5](#)) and on whether the readout is acute ([AP 3.4.4.1](#), [3.4.4.3](#), [3.4.4.5](#)) or involves chronic monitoring of neuronal function or structure and behaviour ([AP 3.4.4.2](#), [3.4.4.4](#)). All our experiments can be characterized by four different components (see Fig. 4):

1. Instrumentalization of the experimental animal.
2. The plasticity paradigm
3. The experimental manipulation
4. The readout

1. Instrumentalization of the experimental animal

Most of our experiments will require some type of gene modification in cells of the brain and/or cranial surgery in order to be able to use the mice for our experiments. Gene modification may be required to alter genes involved in (the regulation of) plasticity, to express proteins required for their visualization (for example by two-photon microscopy) or the modification of their function (for example by optogenetics or chemogenetics). The cranial surgery may be necessary for allowing the visualization of neurons (cranial window implant, or thinning or clearing of the skull), the implantation of a headpost for head-fixation, or the implantation of a recording chamber to allow the insertion of an electrode for

electrophysiological recordings.

Instrumentalization of the experimental animals can therefore involve the following (combination of) procedures:

1a) Breeding of wildtype, inbred and/or genetically modified mice.

1b) In utero electroporation: a limited number of neurons is genetically modified in the brain of embryos. This is achieved by opening the belly of an anesthetized pregnant female mouse, injecting DNA through the uterine wall into the brain ventricles of the embryos, and electroporating the DNA into the cells lining the ventricles. The muscle wall and skin of the belly are sutured closed again and the pups are born several days later, most of them expressing the electroporated DNA in targeted neurons of the brain.

1c) Transduction with viral vectors: a viral vector driving expression of a gene of choice is injected into the brain region to be studied, resulting in the widespread expression of the gene.

1d) Cranial surgery: for imaging experiments, a cranial window may be implanted above the brain region this is to be imaged. The skull can also be made translucent by thinning, or by applying nail polish. In both cases, a head post is attached to the skull allowing fixation of the head. For electrophysiology experiments, a head post and a recording chamber or electrode may be inserted allowing head-fixation and performing recordings.

Combinations of the different genetically modified mouse models are common. In many cases, viral vectors are used that are cre-dependent. These are injected in transgenic mice expressing cre in a particular brain region or cell type. Another example can be the use of in utero electroporation to express a receptor for a virus in a limited number of neurons, followed by transduction using a viral vector later in life that will selectively infect these neurons allowing the tracing of the synaptic inputs these cells receive.

2. Plasticity paradigms:

As explained above, different plasticity paradigms are used.

Visual deprivation paradigms (3.4.4.1 & 3.4.4.2):

2a) OD plasticity is induced by suturing one eyelid closed under anaesthesia. The eye remains closed for several days and is reopened before assessment of visual responses (see below).

2b) Retinal lesions can be made in adult mice. This either involves binocular lesions in the binocular-projecting part of the retinas, or a monocular lesion in the monocularly projecting region (in order to eliminate all retinal input to the cortex responding to a particular region in the visual field). The lesion is made under anesthesia using a powerful laser. Lesion-induced plasticity can also be induced by enucleation under anesthesia.

Visual learning paradigms (3.4.4.3 & 3.4.4.4):

2c) Perceptual learning involves the training of mice in a particular task. The exact task will vary depending on the exact question and experimental readout (see below). In head-fixed tasks, mice first habituate to being head-fixed and in some cases, to walk on a treadmill without being fearful. Then they learn to associate a particular visual stimulus presented to them with a behavioural response (for example, lick left if a square is shown, lick right if a circle is shown). This training involves reinforcement, i.e. reward or in some cases, punishment. Reward usually consists of providing milk through a lickspout. Mice in such paradigms are water-restricted and get most of their fluid intake during the training. Head-fixation is required for many types of imaging or electrophysiology (see below). Head-fixation is not always necessary. In such cases, training may take place in a home cage or specialized environment.

2d) Visual fear learning involves pairing a particular visual context with an aversive stimulus. Upon conditioning, the mouse will show freezing behaviour upon seeing the conditioned visual stimulus.

2e) Unsupervised learning lets mice get used to visual stimuli that are novel or naturally perceived as threatening. A threatening stimulus can be a disc increasing in size projected on the top of the cage or a fly-over stimulus. These stimuli resemble approaching predators.

In many cases the paradigms will be carried out while the mice are head-fixed, allowing us to monitor or manipulate neuronal activity or morphology (see under 4) while plasticity is being induced.

3. The experimental manipulation

In order to causally test the involvement of a particular cell type or protein in the processing of relevant information or (the regulation of) its plasticity we use several approaches to interfere with the function of specific neurons or proteins.

To achieve this we use the following tools:

3a) Focal modulation:

We will locally stimulate or inhibit neural activity using transcranial, local and intracellular electrical stimulation and inactivation, and focal ultrasound delivery.

3b) Activation of designer proteins

We will activate designer proteins that have been expressed in the instrumentalization phase. We use different types of such proteins:

Optogenetics: after expressing light-sensitive proteins in specific neuronal subsets, their activity can be increased, decreased or more selectively modulated by shining light on them.

Chemogenetics: after expressing receptor proteins that bind a ligand that has little or no biological effect on other cells in the body, the ligand can be administered to the mouse resulting in the activation, suppression or more selective modification of neuronal function.

Ultrasound-mediated neuronal modulation: novel approaches for modifying neuronal activity are developing rapidly. One such development is the expression of mechanoreceptors that modify neuronal activity in an ultrasound -manner.

3c) (Opto)pharmacology: Pharmacology will be applied to alter neuronal activity or to target specific receptors. In some instances, Optopharmacology will be used (these are pharmacological agents that are activated by light).

3d) Housing conditions: By changing the conditions under which the mice are housed, plasticity levels can be manipulated. Environmental enrichment is known to alter the inhibition/excitation balance and to affect plasticity (this is illustrated by our finding that environmental enrichment reduces inhibition in NF1 mice and normalizes critical period closure in these animals). It has also been shown that rearing mice in complete darkness can keep the critical period for OD plasticity open. Housing adult mice in complete darkness can reopen the critical period.

4. The readout

The readout of neuronal activity in a particular brain region can be measured by various approaches. Each approach has its strengths and weaknesses, and which approach is used depends on the exact question and the brain region.

Acute assessment of molecular or neuronal properties using electrophysiology, histology or molecular analysis (3.4.4.1, 3.4.4.3, 3.4.4.5):

4a) In vivo probe recordings: this involves the introduction of an (multi-array) electrode into brain of the mouse and record electric activity of neurons, or an electrochemical probe for voltammetry. Before or during the recording session, the mouse is anesthetized, a hole is drilled in the skull and the electrode is inserted (see under 1d). Acute recordings are performed in awake or anesthetized mice and the animal is sacrificed immediately after completion of the recordings.

4b) Acute imaging of intrinsic signal or fluorescent indicators of neuronal activity. Optical imaging of intrinsic signal involves measuring the reflectance of red light shone on the brain. Changes in blood oxygenation and hemodynamics due to neuronal activity alter the light reflectance. For acute imaging, the scalp of the mouse is removed under anesthesia and the mouse is placed in the imaging setup and recordings take place for several hours while visual stimuli are presented.

Two-photon microscopy of neuronal activity: in these experiments two-photon microscopy is employed to detect changes in neuronal activity. To be able to detect neuronal morphology or activity, a fluorescent reporter is required. This can be a chemical reporter, which needs to be loaded into the brain before the onset of the recording. This is achieved by injection of the dye into the brain using a pipet while the mouse is under anesthesia. In most cases, however, genetically encoded reporters are used based on fluorescent proteins. Expression of these proteins thus requires gene transfection using viral vectors or in utero electroporation, and/or the use of transgenic mice. These procedures have to take place well before the measurement takes place. The recordings generally take place in head-fixed mice (see above), under anesthesia or in awake mice in which a cranial window has been implanted. A head stage is also implanted for fixating the head under the microscope or wide field imaging setup. Visual

responses are elicited by presenting visual stimuli to the mouse. Two-photon microscopy of calcium signals allows measuring the activity of hundreds to thousands of individual neurons in real time. Wide field imaging of fluorescent markers for neuronal activity makes use of the same principles as two-photon microscopy, but at a different scale. This approach involves macroscopy and does not allow activity measurements at the single cell level, but at the population level. The advantage is that imaging of a much larger part of the cerebral cortex of the mouse can be imaged. Also for widefield imaging, the skull needs to be made translucent, either by the implantation of a cranial window or by application of agents rendering the skull translucent.

4c) Slice electrophysiology: mice are anesthetized and sacrificed, and the brain is rapidly removed, cooled and sliced. The brain slices can then be used to record neuronal/synaptic activity by electrophysiology or to acutely induce plasticity by electrical stimulation.

4d) Tissue extraction: to isolate RNA, DNA or proteins from tissue the mice are anesthetized and sacrificed, and the tissue is removed. In most cases the tissue is then snap frozen and stored for later extraction of the required molecular components.

4e) Histology: to collect tissue for histology, the mice are anesthetized and perfused with fixative. The tissue is then removed and post-fixed after which it is sliced and stained using immunohistochemistry. This approach is essential for anatomical and molecular assessment of brain tissue.

In many cases, combinations of the above will be used, such as histology after an in vivo electrophysiology experiment.

Chronic recording of neuronal activity and morphology (3.4.4.2, 3.4.4.4).

4f) In vivo probe recordings: (see 4a). Mice undergoing chronic recordings, have been implanted with a recording chamber or electrode (see 1d). The electrode may either be implanted chronically, or, alternatively, a recording chamber is implanted and the electrode is inserted only during the recording after which the whole is closed with bone wax. In both cases, the recording can be done repeatedly in awake, behaving mice or in anesthetized mice. This read-out may be followed by a final (acute) readout session described under 4a through 4e.

4g) Optical imaging of intrinsic signal (see above) can also be performed chronically. In this case skull clearing or cranial window implantation is performed as described above and a head-post needs to be implanted.

Two-photon microscopy of neuronal structure and/or neuronal activity: in these experiments two-photon microscopy is employed in the same way as described in 4b. However, the recording is performed repeatedly in awake or anesthetized animals, allowing us to detect changes in neuronal morphology (such as synapse size or density) or neuronal activity over prolonged periods of time. A cranial window and head-post is inserted as described under 1d. In case repeated imaging in deep structures of the brain is required, a guide tube for a GRIN lens is implanted in the brain, allowing chronic and repeated insertion of the lens.

Finally, wide field imaging of fluorescent markers for neuronal activity (see above) can also be performed chronically, in which case a head-post needs to be implanted. This read-out may be followed by a final (acute) readout session described under 4a through 4e.

Again, combinations of these techniques are often used: for example optical imaging of intrinsic signal to determine the retinotopy of V1 (i.e. how the visual field is processed within V1) followed by two-photon microscopy of fluorescently labelled neurons, or electrophysiological recordings of neurons that are fluorescently labelled for chronic imaging.

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.

This project includes all steps from developing plasticity paradigms, to identifying the relevant brain regions and neural substrates mediating and/or regulating learning, the testing of causal relationships, and investigating errors in neurodevelopmental disorders as described above.

The first subaim (Fig. 3A) is to compare how different forms of plasticity are mediated by changes in neural connectivity. In many cases, we will make use of established plasticity paradigms, such as OD

13. Kuhlman S.J., Olivas N.D., Tring E., Ikrar T., Xu X., and Trachtenberg J.T. (2013). A disinhibitory microcircuit initiates critical-period plasticity in the visual cortex. *Nature* **501**: 543-546.
14. Fu Y., Kaneko M., Tang Y., Alvarez-Buylla A., and Stryker M.P. (2015). A cortical disinhibitory circuit for enhancing adult plasticity. *Elife*. **4**: e05558.

[Redacted content]

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 | Readout after visual deprivation: Acute in vivo or ex vivo assessment of neuronal function or anatomical/molecular make-up in control mice and mice after plasticity induction by visual deprivation. |
| 2 | Readout during visual deprivation: Chronic in vivo assessment of neuronal function or anatomy in control mice and mice during plasticity induction by visual deprivation. |
| 3 | Readout after visual learning: Acute in vivo or ex vivo assessment of neuronal function or anatomical/molecular make-up in control mice and mice after plasticity induction by visual learning |
| 4 | Readout during visual learning: Chronic in vivo assessment of neuronal function or anatomy in control mice and mice undergoing plasticity induction by visual learning |
| 5 | Readout in naïve mouse: Acute in vivo or ex vivo assessment of neuronal function or anatomical/molecular make-up in mice in without plasticity induction |
| 6 | |
| 7 | |
| 8 | |
| 9 | |
| 10 | |



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Kon. Ned. Academie van Wetenschappen (KNAW)

██████████
Postbus 19121

1000 GC 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
AVD8010020171045
Bijlagen
1

26 APR. 2017

Datum 25 april 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte ██████████

Op 4 april 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Plasticity in the visual system and its regulation" met aanvraagnummer AVD8010020171045. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 24 april 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Op 19 april 2017 hebben wij u om aanvullende informatie gevraagd over de head fixation post en de looptijd van de vergunning. Wij kunnen ons vinden in uw toelichting.

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.

In uw aanvraag geeft u aan dat er sprake is van overlap tussen lopende DEC protocollen en de huidige vergunningsaanvraag. Om te borgen dat er geen sprake zal zijn van overlap, is een voorwaarde toegevoegd aan deze vergunning.

In uw aanvraag geeft u aan in principe zowel mannelijke als vrouwelijke dieren te gebruiken. Er worden namelijk geen verschillen verwacht tussen mannelijke en vrouwelijke. Wel gaat u data verzamelen over beide geslachten. Mocht blijken dat er toch verschillen zijn, wilt u de desbetreffende proeven alsnog met of mannelijke of vrouwelijke dieren uit kunnen voeren. Wij hebben hier geen bezwaar tegen. Wij vinden het wel van belang dat deze

afweging in afstemming met de IvD wordt gemaakt. Om dit te borgen is er een voorwaarde aan de vergunning toegevoegd.

Datum:
25 april 2017
Aanvraagnummer:
AVD8010020171045

U kunt met uw project "Plasticity in the visual system and its regulation" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 mei 2017 tot en met 30 april 2022. Deze termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat een vergunning maar voor maximaal 5 jaar mag worden afgegeven.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-KNAW gevoegd. Dit advies is opgesteld op 4 april 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

In aanvulling op het DEC-advies stelt de CCD voorwaarden. De voorwaarden staan in de vergunning beschreven. Voor het overige nemen wij het advies van de DEC 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.

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

naam: [REDACTED]

Datum:
25 april 2017
Aanvraagnummer:
AVD8010020171045

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: Kon. Ned. Academie van Wetenschappen
(KNAW)

Adres: Postbus 19121

Postcode en plaats: 1000GC AMSTERDAM

Deelnemersnummer: 80100

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 mei 2017 tot en met 30 april 2022, voor het project "Plasticity in the visual system and its regulation" met aanvraagnummer AVD8010020171045, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-KNAW. Hierbij is afgeweken van het DEC-advies. Er worden aanvullende voorwaarde(n) gesteld. Zie samenvatting

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Groepsleider & Hoogleraar.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 4 april 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 24 april 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 4 april 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 4 april 2017, ontvangen op 4 april 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 24 april 2017

Aanvraagnummer:
AVD8010020171045

| Naam proef | Diersoort/ Stam | Aantal dieren | Ernst | Opmerkingen |
|---|---|---------------|------------------------------|-------------|
| 3.4.4.1. Readout after visual deprivation: acute in vivo or ex vivo assessment of neuronal function or anatomical/molecular make-up in control mice and mice after plasticity induction by visual deprivation. | | | | |
| | Muizen (Mus musculus) / Moeders: 83, Embryos (>E11): 250, overig: 1000 | 1.333 | 100% Matig | |
| 3.4.4.2. Readout during visual deprivation: Chronic in vivo assessment of neuronal function or anatomy in control mice and mice during plasticity induction by visual deprivation. | | | | |
| | Muizen (Mus musculus) / Moeders: 50, Embryo's: 150, overig: 600 | 800 | 100% Matig | |
| 3.4.4.3. Readout after visual learning: Acute in vivo or ex vivo assessment of neuronal function or anatomical/molecular make-up in control mice and mice after plasticity induction by visual learning. | | | | |
| | Muizen (Mus musculus) / Moeders: 83, Embryo's (>E11): 250, overig: 1000 | 1.333 | 80% Matig 20% Licht | |
| 3.4.4.4. Readout during visual learning: Chronic in vivo assessment of neuronal function or anatomy in control mice and mice undergoing plasticity induction by visual learning. | | | | |
| | Muizen (Mus musculus) / Moeders: 50, Embryo's (>E11): 150, overig: 600 | 800 | 100% Matig | |
| 3.4.4.5. Readout in naïve mouse: Acute in vivo or ex vivo assessment of neuronal function or anatomical/molecular make-up in mice without plasticity induction. | | | | |

Aanvraagnummer:
AVD8010020171045

| | | | | |
|--|--|-------|------------------------------|--|
| | Muizen (<i>Mus musculus</i>) / Moeders: 167, Embryo's (>E11):500, overig: 2600 | 3.267 | 82% Matig 18% 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 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.

Daar waar er sprake is van overlap tussen de in deze vergunning vergunde dierproeven en eerder goedgekeurde DEC protocollen zullen de dieren en experimenten na het verlenen van de vergunning formeel onder deze vergunning gaan vallen, zoals u in uw aanvraag ook heeft aangegeven. Hierdoor is er geen sprake meer van overlap.

Mannelijke en vrouwelijke dieren moeten in principe in evenredige aantallen gebruikt worden. Indien gedurende het project blijkt dat er in specifieke situaties geslachts-specifieke effecten zijn, kunt u met de IvD afstemmen of het noodzakelijk is voor het behalen van de doelstelling om 1 geslacht te gebruiken.



Aanvraagnummer:

AVD8010020171045

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:
AVD8010020171045

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 humanaan acht als de in de richtlijn opgenomen passende methoden.

| Inventaris Wob-verzoek W17-09 | | | | | | | | | | |
|-------------------------------|---------------------------------|----------------|-----------------|--------|-------|--------|-------------------|--------|------|--|
| | | | wordt verstrekt | | | | weigeringsgronden | | | |
| nr. | document NTS 20171070 | reeds openbaar | niet | geheel | deels | 10.1.c | 10.2.e | 10.2.g | 11.1 | |
| 1 | Aanvraagformulier | | | | x | | x | x | | |
| 2 | NTS | x | | | | | | | | |
| 3 | Projectvoorstel | | | x | | | | | | |
| 4 | Bijlage animal procedure | | | x | | | | | | |
| 5 | Ontvangstbevestiging en factuur | | | | x | | x | x | | |
| 6 | DEC advies | | | | x | | x | x | | |
| 7 | Advies CCD | | x | | | | | | x | |
| 8 | Beschikking en vergunning | | | | x | | x | x | | |



Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

- U bent van plan om één of meerdere dierproeven uit te voeren.
- Met dit formulier vraagt u een vergunning aan voor het project dat u wilt uitvoeren. Of u geeft aan wat u in het vergunde project wilt wijzigen.
- Meer informatie over de voorwaarden vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl, of in de toelichting op de website.
- Of bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

1 Gegevens aanvrager

| | |
|---|---|
| <p>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></p> | <p><input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 11400</p> <p><input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen</p> |
| <p>1.2 Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.</p> | <p>Naam instelling of organisatie Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUmc) te Amsterdam</p> <p>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde ██████████</p> |
| <p>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></p> | <p>KvK-nummer 64156338</p> <p>Straat en huisnummer de Boelelaan 1117</p> <p>Postbus </p> <p>Postcode en plaats 1081HV Amsterdam</p> <p>IBAN </p> <p>Tenaamstelling van het rekeningnummer </p> |
| <p>1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.</p> | <p>(Titel) Naam en voorletters ██████████ X Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</p> <p>Functie █</p> <p>Afdeling ████████████████████</p> <p>Telefoonnummer ████████</p> <p>E-mailadres ████████████████</p> |
| <p>1.5 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.</p> | <p>(Titel) Naam en voorletters ██████████ X Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</p> <p>Functie ████████████████</p> <p>Afdeling ████████</p> <p>Telefoonnummer ████████</p> <p>E-mailadres ████████████████</p> |

- 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 | 1-6-2017 |
| Einddatum | 31-5-2021 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- New P2Y12 receptor targeting PET tracers as next generation neuroinflammation markers in Parkinson's disease.
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- PET tracer ontwikkeling om hersenontstekingsreacties in patiënten met de ziekte van Parkinson te meten
- 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 € 1.035 |
| | | <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 |
| | | X 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: 4667599 Factuuradres: VU |
| | | 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 | <p>Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondergetekende verklaart:</p> <ul style="list-style-type: none"> 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. | | | | | | | | | | |
| | | <table border="1"> <tr> <td>Naam</td> <td>[Redacted]</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td>[Redacted]</td> </tr> <tr> <td>Plaats</td> <td>Amsterdam</td> </tr> <tr> <td>Datum</td> <td>16-03-2017</td> </tr> <tr> <td>Handtekening</td> <td>[Redacted]</td> </tr> </table> | Naam | [Redacted] | Functie | [Redacted] | Plaats | Amsterdam | Datum | 16-03-2017 | Handtekening | [Redacted] |
| Naam | [Redacted] | | | | | | | | | | | |
| Functie | [Redacted] | | | | | | | | | | | |
| Plaats | Amsterdam | | | | | | | | | | | |
| Datum | 16-03-2017 | | | | | | | | | | | |
| 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] | |

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

Naam gemachtigde

[Redacted]

Datum

1 6 - 0 8 - 2 0 1 6

Handtekening
portefeuillehouder
van de instelling

[Redacted signature area]

Handtekening
gemachtigde



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'. 11400
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. VU University Medical Center
- 1.3 Provide the title of the project. New P2Y12 receptor targeting PET tracers as next generation neuroinflammation markers in Parkinson's disease.

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.

Introduction

Parkinson's disease (PD) is a chronic, progressive neurodegenerative disorder affecting mainly elderly people. In the Netherlands, nowadays approximately 70.000 people suffer from this devastating disease,

and with the aging population the incidence will increase even further. The disease is characterized by massive degeneration of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta, but also other brain regions are affected, e.g. striatum, hippocampus, bulbus olfactorius and the brain stem. Neurodegeneration in PD is accompanied by neuroinflammation, characterized by the presence of reactive microglial cells and astrocytes at the sites of neurodegeneration. The neuroinflammatory response is an early phenomenon observed in the affected areas of the PD brain and known to play a cardinal role in disease progression. Nowadays, novel therapeutic strategies are developing to counteract the detrimental neuroinflammatory processes that drive PD pathogenesis. Unfortunately however, (pre)clinical evaluation of these novel therapeutic strategies are hampered by the lack of individual *in vivo* monitoring of target engagement, such as the presence, location and/or active state of microglial cells. Positron emission tomography (PET) is a noninvasive technique able to monitor the *in vivo* fate of specific agents. A PET tracer that would monitor specific reactive microglial cells *in vivo*, in a single individual, would be a huge advantage for target engagement evaluation in both preclinical as well as clinical studies. For animal studies, this would also imply a strong reduction of animals needed for proof-of-concept and/or target-engagement studies that focus on microglial activation.

We discovered that the P2Y₁₂ receptor is a novel target that might specifically detect neuroinflammation *in vivo* using dedicated PET labels. P2Y₁₂ is not expressed on neurons or other cells present in the brain. This combination would imply a potentially highly selective positive PET signal for activated microglia that would be relatively easy to interpret in future (pre)clinical studies. The role of neuroinflammation in PD can only be explored using the appropriate PET tracers, e.g. a very selective PET tracer that preferably only images neuroinflammation. A PET tracer that targets the P2Y₁₂ receptor would be able to answer this. However, such a tracer is not yet available, and thus, there is an urgent need to design, synthesize and evaluate such a ligand, which is the aim of this investigation.

The P2Y₁₂ receptor is overexpressed on activated microglia

The P2Y₁₂ receptor, amongst other proteins, is expressed on activated microglia (Chhor 2013; Gautier 2012; Butovsky 2012). In fact, compared with the expression on other CNS cells, the P2Y₁₂ receptor is over-expressed on mature microglia (Moore 2015, Butovsky 2014; Hickman 2013) and is as such a highly relevant target for the development of microglia-selective PET tracers, since it would provide an imaging tool that is very specific for activated microglia. This is in contrast to currently known PET tracers targeting activated microglia who show expression on macrophages as well.

The P2Y₁₂ receptor is associated with anti-inflammatory (M2 type) activated microglia.

A central characteristic in neuroinflammation is the activation of microglia, a diverse process manifested in distinct activation types, depending on type and phase of pathology (Heneka 2015, Hanisch 2007; Mosher 2014; Saijo 2011). The complex molecular and cellular processes accompanying microglial activation are highly dynamic and may contribute to tissue damage, neurodegeneration and brain dysfunction. However, depending on the activation phenotype, these processes may also promote neuro-regeneration and -restoration (Rivest 2009). Microglial activation is characterized by changes in proliferation, morphology, motility of cellular processes, migration, phagocytic activity and, most importantly, the release of pro- and/or anti-inflammatory cytokines and other signaling molecules (Kettenmann 2011; Mosher 2014). The P2Y₁₂ receptor is correlated to the anti-inflammatory (M2) state of activated microglia and PET tracers targeting the P2Y₁₂ receptor could as such not only image activated microglia, but in addition give valuable information on the phenotype of the activated microglia.

Taken together, there is ample evidence for a distinct role of the P2Y₁₂ receptor in activated microglia, especially in microglia in the anti-inflammatory polarization state. As such the P2Y₁₂ receptor is a highly promising target for imaging purposes. Although the levels of alterations in P2Y₁₂ receptor expression in rodent microglia (Butovsky 2014) are less pronounced than in human microglia (Moore 2015), significant differences in expression levels between microglial phenotypes can still be demonstrated. This is an important aspect with respect to translational research, where a putative target for a PET tracer should be expressed both in rodents and humans.

So far, no PET tracer for the P2Y₁₂ receptor is available. However, we already developed a carbon-11 labeled P2Y₁₂ receptor antagonist, being the first potential PET tracer for the P2Y₁₂ receptor (Janssen 2015, *manuscript in preparation*), Specific binding of was observed in *in vitro* autoradiography studies on mouse brain, in which inflammation was induced *in vivo* via an intracerebroventricular injection of IL-4. Ex vivo biodistribution of compound this initial carbon-11 labeled compound showed that brain uptake

was extremely low, thus limiting its use as a PET tracer for imaging of the P2Y₁₂ receptor in the brain. The low brain uptake could be caused by metabolism of the compound, as preliminary data show metabolism into a more polar radioactive metabolite at 15 minutes post injection, which is most likely a result of ester hydrolysis *in vivo*, yielding the carboxylic acid. This indicates that metabolism could indeed be responsible for low brain uptake. Moreover, the new P2Y₁₂ receptor PET tracer has a relatively high calculated topological polar surface area (tPSA) of 140 Å², which is well above the considered maximum to allow for passive diffusion over membranes (120 Å²) (Bohets 2001, Ertl 2000), such as the blood brain barrier. In addition, a possible role of efflux transporters at the blood brain barrier (e.g. P-gp or BCRP) cannot be excluded, since the high uptake observed in duodenum could be due to these transporters. Despite this negative result, these preliminary data show the potential of P2Y₁₂ receptor PET tracers once they are taken up into the brain. Most importantly, the levels of the tracer in the blood are very low, also at early time points when the tracer is hardly metabolized, so binding of P2Y₁₂ receptor PET tracers to blood platelets expressing the P2Y₁₂ receptor (Hollopeter, 2001) will likely not hamper the application of P2Y₁₂ receptor PET tracers.

To mimic the PD pathogenic processes, we will use the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) mouse model. The MPTP model is based on the injection of MPTP, which is a blood-brain barrier-penetrant lipophilic compound that is metabolized into the toxic cation 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) by the enzyme monoamine oxidase B of glial cells. MPP⁺ kills primarily dopamine-producing neurons in for instance the substantia nigra. MPP⁺ interferes with complex I of the electron transport chain, a component of mitochondrial metabolism, which leads to cell death and causes the buildup of free radicals, toxic molecules that contribute further to cell destruction. This model is a widely used and reliable one that not only induces nigrostriatal degeneration, but also pronounced neuroinflammation, alike human PD. Intraperitoneal injection of MPTP, depending on its administration, results in either temporarily dopaminergic depletion or selective and irreversible degeneration of dopaminergic neurons in the substantia nigra followed by local microgliosis, pointing out its value as a PD mimicking model. The MPTP model can be administered as an acute model or as a subchronic model, both mimicking different aspects of the disease and mimicking different types of neuroinflammation observed in PD. Thus, although both models induce a neuroinflammatory response, the underlying mechanisms leading to this response and the response itself differ. The acute model is based on several repetitive injections of MPTP in one day, which leads to a reversible temporary depletion of dopaminergic transmission in the dopaminergic neurons of the brain. In contrast, the subchronic model is based on daily injections of MPTP for a period up to 7 days, resulting in irreversible dopamine depletion caused by loss of dopaminergic neurons.

3.2 Purpose

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

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

The overall goal of this project is to evaluate novel PET tracers targeting the P2Y₁₂ receptor as an innovative marker to image neuroinflammation with PET, with a focus on Parkinson's disease (PD).

The two main subobjectives of the project are:

- 1) To determine the optimal time points for maximal P2Y₁₂ expression during and after the MPTP treatment, in both the acute and subchronic model, to evaluate the lead PET tracers and whether the lead tracers are selective for the P2Y₁₂ receptors on activated microglial cells in disease relevant post-mortem brain tissue (target engagement)
- 2) To test whether the lead PET tracers are suitable for imaging microgliosis in both the acute and subchronic MPTP model

The collaboration of excellent scientific expertise from specialized groups of the VUmc/VU combines the ample experience with the MPTP mouse model, both the acute and the subchronic administration model, with extensive experience with preclinical PET tracer design and evaluation in murine models. We have ample experience with both the acute and subchronic MPTP model and have already collected data on the presence and distribution of reactive microglia during both models (Vroon 2007; Andriga 2005). In addition, our partners already developed a PET tracer of the P2Y₁₂ receptor antagonist, demonstrating the feasibility of their approach to develop P2Y₁₂ PET ligands within the time frame of the project.

Therefore, our objectives are certainly achievable within the given timelines. The current project is peer-reviewed and financed by a singular international non-profit organization supporting PD research.

3.3 Relevance

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

Social benefit: The project is highly social beneficial as novel therapeutic strategies, developed to counteract the detrimental neuroinflammatory processes that drive PD pathogenesis, are hampered by the lack of individual *in vivo* monitoring of target engagement, such as the presence, location and/or active state of microglial cells. PET is a noninvasive technique that enables monitoring the *in vivo* fate of a specific agent. A PET tracer that would monitor specific reactive microglial cells *in vivo*, in a single individual, would be a huge advantage for target engagement evaluation in both preclinical as well as clinical studies. For individual patients, neuroinflammation could be monitored leading to 'personalized therapy' to optimize the therapeutic strategy at hand. In addition, neuroinflammation plays an important role in many neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease and Multiple Sclerosis. Having a PET tracers that could monitor neuroinflammatory processes in these diseases will lead to similar benefits as for PD patients. In addition, for animal studies, this would also imply a strong reduction of animals needed for proof-of-concept and/or target-engagement studies.

Scientific benefit: *In vivo* PET tracers for neuroinflammation will provide insight into the pathogenesis of neuroinflammation during the course of disease. This will not only be restricted to PD, but is also of value for all neurological disorders in which neuroinflammation plays an important role.

3.4 Research strategy

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

In order to increase the chance of the development of successful radiotracers for the P2Y₁₂ receptor as an *in vivo* biomarker of the neuroinflammatory state in PD brain, proper *in vitro* validation of the target is required. For this purpose we plan to use freshly frozen and/or fixed tissue sections of post-mortem brain tissue from well-characterized and matched PD patients and control cases. Immunohistochemistry (IHC) using a commercially available antibody, which has shown its use on post-mortem material from a stroke patient, will be performed on freshly frozen as well as on formalin fixed and paraffin embedded brain tissue sections to study the presence and distribution of the P2Y₁₂ receptor, in particular in the substantia nigra, olfactory bulb and hippocampus. These stainings will be combined with double stainings for microglia markers, including CD68 and Iba-1, and an astroglial marker, i.e. GFAP, for identification of the glial cell-type expressing the P2Y₁₂ receptor. We have ample experience with these techniques in PD brain material. If successful, these experiments will be followed by qPCR on tissue extracts and autoradiography on snap-frozen tissue sections using radiolabeled P2Y₁₂ receptor ligands, to investigate the expression levels of the P2Y₁₂ receptor gene and to characterize the role of the receptor in neuroinflammation in PD, respectively. In addition, using immunohistochemistry (IHC) and autoradiography (*in vitro* evaluation of a radioactive substance) on post-mortem murine tissue, we will first analyze the expression level of the P2Y₁₂ receptor on microglia during and after the MPTP treatment in a time-dependent manner. Using the optimal time points during and/or after the MPTP treatment regime, during which the P2Y₁₂ receptor is abundantly expressed on microglial cells, target validation of the tracers using autoradiography will be performed (Figure 1). In addition, by making use of these time points in which optimal microglial P2Y₁₂ receptor expression is achieved during and/or after MPTP treatment, we will evaluate the ability of the tracers to image reactive microglia *in vivo* using both a combination of PET with x-ray computed tomography (CT) and a combination of PET with magnetic resonance (MR) imaging in both the acute and subchronic MPTP mouse model. Combining PET with CT will result in not only functional images that depict the spatial distribution of a tracer in the body (obtained by PET), but these images can now be more precisely aligned or correlated with anatomic imaging obtained by CT scanning. By combining PET with MR imaging, the PET signal can be aligned with the soft tissue morphological images for high spatial resolution. The high spatial resolution is also of importance in other diseases, as the brain location of neuroinflammation is often typical for the neurodegenerative disease at hand. In the similar animals used for PET imaging, *in vitro* autoradiography, IHC and qPCR on brain tissues of these animals will be performed after they are sacrificed in order to assess P2Y₁₂ receptor expression, thus validating the signal that was measured with PET (Figure 1).

Given the observation that compound Carbon 11-tracer showed very limited brain uptake, new lead compounds need to be identified with a focus on high affinity for the P2Y₁₂ receptor in combination with

a high chance of brain uptake. Since P2Y₁₂ receptor antagonists have not been investigated for their activity in the brain, no experimental data are available from literature.

Therefore new compounds need to be identified that meet the following criteria:

- High affinity for the P2Y₁₂ receptor, K_D or $K_i < 10$ nM
- cLogP between 2 and 4
- tPSA below 90 Å²

We prefer compounds with a high affinity for the receptor and an upper limit of 10 nM is generally suited for neuroreceptor PET tracers, given the fact the binding potential (BP, B_{max}/K_D) of the ideal neuroreceptor PET tracer should preferably be higher than 10 (Mintun 1984). Since the B_{max} is yet unknown, the K_D should be low. The limits for cLogP are not absolute since there are successful neuroreceptor PET tracers known that exceed the cLogP limit of 4 (Pike 2009), while the limit for tPSA is generally accepted as suitable for drugs that need to pass the blood brain barrier (Hitchcock 2006, Kelder 1999). One of the compounds meeting the requirements is tracer **2**, which has been published in a US patent (Lee 2011). Compound **2** has a K_i of 0.3 nM in a human platelet aggregation assay, its calculated LogP is 3.1 and the tPSA is 65 Å² making **2** an ideal new compound for PET tracer development.

In case P2Y₁₂ receptor expression in both human post-mortem as well as in the MPTP mouse models is below background, or not correlated with microglial activation and or pathology, no further experiments will be performed. In addition, when the novel PET tracers do not meet the above described criteria, also no further animal experiments will be performed with these tracers.

Details concerning the animal model.

We will use two different MPTP treatment regimens to achieve both the acute and the subchronic MPTP model. In addition, we will use both models for 1) obtaining MPTP treated post-mortem brain tissue to evaluate P2Y₁₂ receptor expression in microglial cells in affected regions in time, and 2) *in vivo* PET tracer evaluation. The acute MPTP model consists of a maximum of 4 i.p. injections of 30 mg/kg MPTP during one day. The control group will be injected with physiological salt solution. Animals will be sacrificed using cervical dislocation (experiment 1) or an overdose of anesthetics (experiment 2). The subchronic MPTP model consists of a once daily injection i.p. of MPTP 30 mg/kg for a maximum of 7 days. The control group will be injected with physiological salt solution. Animals will be sacrificed using cervical dislocation (experiment 1) or an overdose of anesthetics (experiment 2). To determine the expression level of the P2Y₁₂ receptor on reactive microglia during and after both the acute and the subchronic MPTP treatment regime, animals will be sacrificed at specific time points during and after the treatment with MPTP. For the acute MPTP model, animals will be sacrificed after the second injection, shortly after the last injection, and 12, 24 and 48 hours after the injection. For the subchronic MPTP model, animals will be sacrificed every 24 hours after the first injection up to 2 days after the final injection.

For *in vivo* PET tracer evaluation (both PET/CT and PET/MR combination), animals will be anesthetized and PET tracer will be injected into the tail vein. Under complete anesthesia, animals will remain in the PET/CT or PET/MR imaging scanner for a maximum of 80 minutes, as we will make use of either fluorine-18 or carbon-11 labelled tracers. For the acute model, each animal will be analyzed by PET scanning with a maximum of 2 times. For the subchronic model, each animal will be scanned for a maximum of 6 times. During each scan (duration of PET/CT is approximately 60 min, and for PET/MR imaging 80 min), in which the animal is anesthetized, a maximum of 3 times a small size blood sample will be collected for determination of tracer concentration and metabolite formation.

To determine PET tracer specificity, a displacement study needs to be performed. Several minutes after the radiolabeled tracer is injected, a non-labeled P2Y₁₂ antagonist is injected to compete with and displace the tracer. To determine the optimal time between radiolabeled PET tracer and the non-labeled compound, the PET tracer imaging signal (obtained using PET imaging) within the brain needs to be determined.

The treatment regimens for both the acute and subchronic model are well defined in literature. In addition, we have experience working with this model previously.

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.

Animal experiments will consist of

- 1) using both the acute and subchronic MPTP toxicity model for *in vitro* time-dependent evaluation of the P2Y₁₂ receptor expression and validation of tracer binding to the target
- 2) using both the acute and subchronic MPTP toxicity model for PET imaging to evaluate the radiolabeled compounds as a PET tracer followed by *in vitro* post-mortem validation of the PET signal

Together, our proposed experiments will consist of treatment of mice with MPTP in an acute and a subchronic administration model or no treatment.

For 1) the animals will be treated with MPTP, either acute or subchronic administration, or no treatment and post-mortem tissue will be used to determine the maximal expression levels of the P2Y₁₂ receptor during and after MPTP exposure and for target validation (Figure 1)

For 2) the animals will be treated with MPTP, either acute or subchronic administration, or no treatment and injected under anesthesia with the PET tracer for either PET/CT or PET/MR imaging. After the final PET/CT or PET/MR scan, animals will be sacrificed and post-mortem tissue will be used for target validation of the PET signal (Figure 1).

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.

Using IHC, we will first analyze the presence and expression levels of the P2Y₁₂ receptor over time on activated microglia in post-mortem brain of MPTP treated mice, both the acute and subchronic model. The time points in which the P2Y₁₂ receptor is maximally expressed on this post-mortem tissue will be used to determine target validation of the PET tracer using autoradiography. This approach reduces the numbers of animals needed for PET imaging (which leads to a higher level of discomfort), and assures the optimal conditions to test the PET tracer potential. Tracers that show no selectivity or binding towards the P2Y₁₂ receptor in autoradiography experiments will not be used for PET imaging. In addition, we will evaluate our tracer's abilities to image reactive microglia *in vivo* using PET/CT and PET/MR imaging in both the acute and subchronic MPTP mouse model, using the time points for optimal P2Y₁₂ expression found in experiment 1. Using the brain of these same animals, *in vitro* autoradiography, IHC and qPCR will be performed to assess P2Y₁₂ receptor expression, thus validating the signal that was measured with PET.

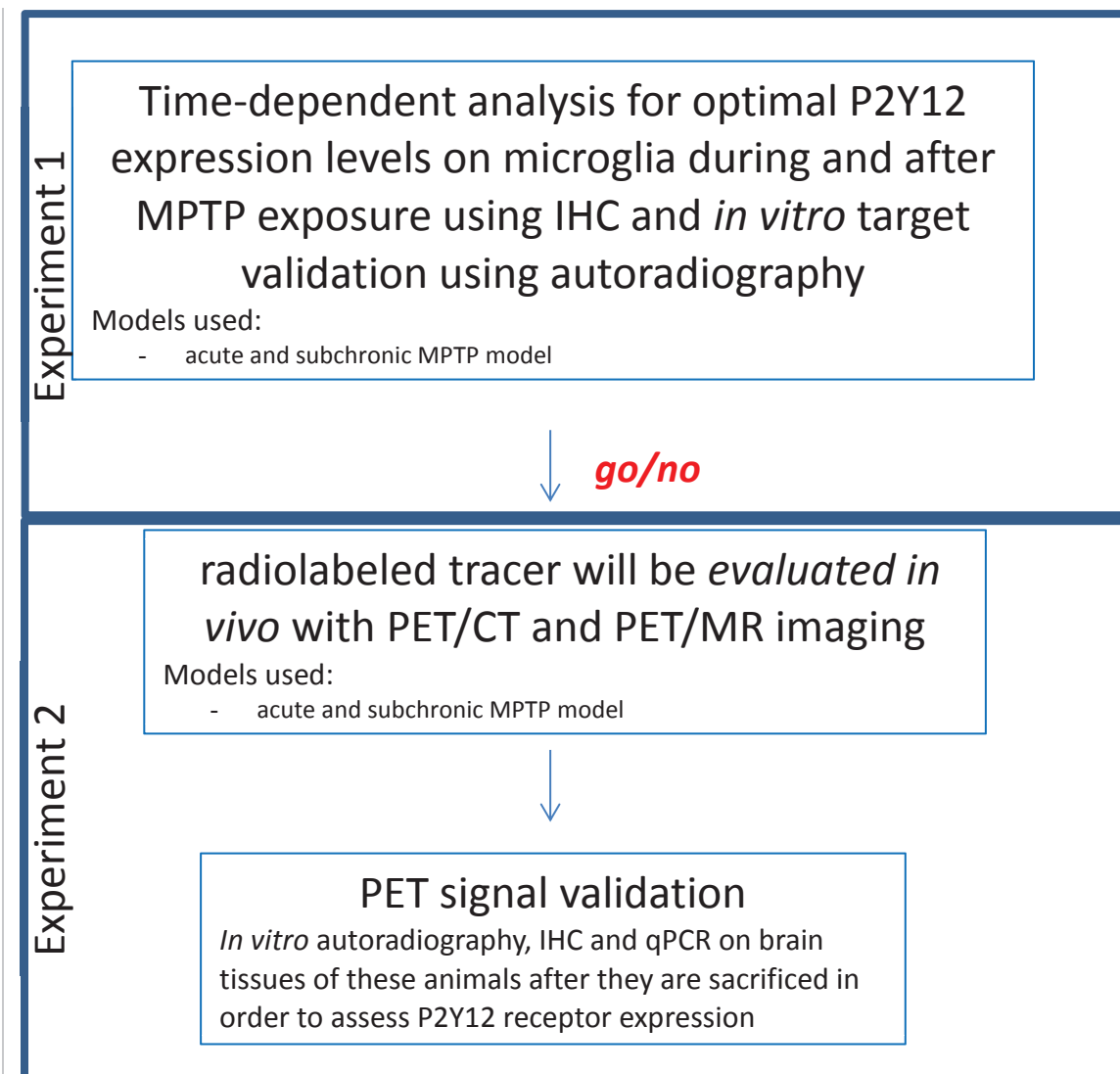


Figure 1: The project strategy consist of *in vitro* validation of target engagement by the novel PET tracers in post-mortem brain tissue of the MPTP models. Optimal P2Y12 expression on microglia, using immunohistochemistry (IHC) during and after MPTP exposure will be determined for target validation of the PET tracers. In case the PET tracer demonstrates *in vitro* target engagement, *in vivo* evaluation of the tracer will be performed using both PET/CT and PET/MR imaging, followed by *in vitro* post-mortem PET signal validation.

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 | PET tracer evaluation in both the acute and subchronic MPTP mouse model |
| 2 | |
| 3 | |
| 4 | |
| 5 | |
| 6 | |
| 7 | |
| 8 | |
| 9 | |
| 10 | |



Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website (www.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'. | 11400 | |
| 1.2 Provide the name of the licenced establishment. | VU University Medical Center | |
| 1.3 List the serial number and type of animal procedure. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i> | Serial number | Type of animal procedure |
| | #1 | PET tracer evaluation in both the acute and subchronic MPTP mouse model |

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.

To evaluate novel PET tracers for microglia activation in PD brain, the aim of the following animal experiment is to mimic PD-related dopamine depletion, neurodegeneration and neuroinflammation in a mouse model. We will use the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) mouse model as it is ideal to study effects of therapeutic intervention strategies, because MPTP is an easy administrable neurotoxin that offers the flexibility of creating both an acute or subchronic model that mimics dopaminergic depletion or neurodegeneration, respectively. The acute MPTP model is a fast and reversible model mimicking dopamine depletion without actual neurodegeneration. In the subchronic model, the toxin leads to neurochemical and histopathological alterations that replicate very closely the pattern of dopaminergic degeneration observed in PD (Prezedborski and Vila, 2003). Although both models result in neuroinflammation (Vroon 2007), the underlying pathogenesis that drives this neuroinflammation differs. So far, it remains unclear which type of neuroinflammation (e.g. receptor expression and microglial activation state) is of importance for the pathogenesis of PD and the development of neurodegeneration in PD. Therefore, it is of crucial importance to evaluate both the acute and the subchronic type of induction of neuroinflammation in a PD mimicking animal model. Here, we will use both the acute and subchronic model in order to determine both the distribution of P2Y12-positive microglia in control and MPTP-induced PD pathology, and to validate our newly synthesized P2Y12 PET ligands for specificity *in vitro* and *in vivo*.

Primary outcome measurements:

- 1) immunohistochemical (IHC) evaluation of the time-dependent P2Y12 receptor expression on microglial cells in the post-mortem brains of untreated and both acute and subchronic MPTP

- treated mice to determine the optimal timelines for PET tracer evaluation (experiment 1)
- 2) target engagement of the PET tracers in microglial cells in both the acute and subchronic MPTP mouse model using autoradiography (experiment 1)
 - 3) evaluate the ability of the PET tracers to image reactive microglia *in vivo* using PET/CT and PET/MR imaging in controls and both the acute and subchronic MPTP mouse model. Using the brain of these same animals, *in vitro* autoradiography, IHC and qPCR will be performed to assess P2Y12 receptor expression, thus validating the signal that was measured with PET. (experiment 2)

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

We will use two different MPTP treatment regimens to achieve both the acute and the subchronic MPTP model. In addition, we will use both models for 1) obtaining MPTP treated post-mortem brain tissue to evaluate P2Y12 receptor expression in microglial cells in affected regions in time, and 2) *in vivo* PET tracer evaluation.

The acute MPTP model consists of a maximum of 4 i.p. injections of 30 mg/kg MPTP during one day. The control group will be injected with physiological salt solution. Animals will be sacrificed using cervical dislocation (experiment 1) or an overdose of anesthetics (experiment 2).

The subchronic MPTP model consist of a once daily injection i.p. of MPTP 30 mg/kg for a maximum of 7 days. The control group will be injected with physiological salt solution. Animals will be sacrificed using cervical dislocation (experiment 1) or an overdose of anesthetics (experiment 2).

To determine the expression level of the P2Y12 receptor on reactive microglia during and after both the acute and the subchronic MPTP treatment regime, animals will be sacrificed at specific time points during and after the treatment with MPTP.

For the acute MPTP model, animals will be sacrificed after the second injection, shortly after the last injection, and 12, 24 and 48 hours after the injection.

For the subchronic MPTP model, animals will be sacrificed every 24 hours after the first injection up to 2 days after the final injection.

For *in vivo* PET tracer evaluation (both PET/CT and PET/MR combination), animals will be anesthetized and PET tracer will be injected into the tail vein. Under complete anesthesia, animals will remain in the PET/CT or PET/MR imaging scanner for a maximum of 80 minutes, as we will make use of either fluorine-18 or carbon-11 labelled tracers. For the acute model, each animal will be analyzed by PET scanning with a maximum of 2 times. For the subchronic model, each animal will be scanned for a maximum of 6 times.

During each scan (duration of PET/CT is approximately 60 min, and for PET/MR imaging 80 min), in which the animal is anesthetized, a maximum of 3 times a small size blood sample will be collected for determination of tracer concentration and metabolite formation.

To determine PET tracer specificity, a displacement study needs to be performed. Several minutes after the radiolabeled tracer is injected, a non-labeled P2Y12 antagonist is injected to compete with and displace the tracer. To determine the optimal time between radiolabeled PET tracer and the non-labeled compound, the PET tracer imaging signal (obtained using PET imaging) within the brain needs to be determined.

The treatment regimens for both the acute and subchronic model are well defined in literature. In addition, we have experience working with this model previously.

Timelines: mice in test**Experiment 1**

For the acute model:

- 7 mice will be in the test for 24 h
- 7 mice will be in the test for 25-26 h
- 7 mice will be in the test for 36 h
- 7 mice will be in the test for 48 h
- 7 mice will be in the test for 72 h

For the chronic model:

- 7 mice will be in the test for 24 h
- 7 mice will be in the test for 2 days
- 7 mice will be in the test for 3 days
- 7 mice will be in the test for 4 days
- 7 mice will be in the test for 5 days
- 7 mice will be in the test for 6 days
- 7 mice will be in the test for 7 days
- 7 mice will be in the test for 8 days
- 7 mice will be in the test for 9 days

Experiment 2

Control mice will be in the test for a maximum of 80 minutes (imaging time)

For the acute model, 128 mice will be in the test between 24h and 72h, depending on the maximal microglial activity to be found in time in the model. Plus a maximum of 80 minutes imaging time.

For the chronic model, 128 mice will be in the test between 24h and 9 days, depending on the maximal microglial activity to be found in time in the model. Plus a maximum of 80 minutes imaging time.

For the displacement studies,

32 control mice will be in the test for a maximum of 80 minutes (imaging time)

32 acute model subjected mice will be in the test for a time between 24 – 72h (depending on the maximal microglial activity to be found in time in the model). Plus a maximum of 80 minutes imaging time.

32 chronic model subjected mice will be in the test for a time between 24h and 9 days (depending on the maximal microglial activity to be found in time in the model). Plus a maximum of 80 minutes imaging time.

Pharmacokinetic brain profiling: 16 mice for a maximum of 80 minutes (imaging time)

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

Given our experience with both the acute and subchronic model and its known reproducibility, we request a minimal number of animals for each experiment (see B). We will scan one animal multiple times to reduce the total of animals needed for completion of the study. In addition, we will determine pharmacokinetic profiles of the injected tracers by evaluating the tracer amounts during the scans within a single animal via multiple blood sampling. Furthermore, we included go/on-go criteria for each tracer (experiment 1), that will result in a reduction in animal numbers. In case of a successful fluorine-18 labelled tracer, we will not evaluate the carbon-11 labelled analogue of the same tracer. Animals requested in B are based on our extensive experience with both the MPTP model, as well as experience in tracer evaluation, both *in vitro* and *in vivo*.

B. The animals

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

Species: Mice

Origin: C57BL/6 mice will be obtained from a commercial licensed breeder.

Gender: male. From the literature, it is known that in female mice MPTP toxicity is more severe when compared to male mice. For statistical reasons (i.e. number of animals required for sufficient statistical power), this difference between the level of toxicity of MPTP between male and female mice hampers the use of both sexes within one experiment. In addition, our experience of dose and the time of injection of MPTP, with both the acute and the subchronic model are based upon the use of males only.

Life stage: mice used for the study will be within the range of 8-10 weeks, with a weight range of 25-30 gram.

Study arms: Two experiments (experiment 1 and 2), both divided into a control, an acute and a subchronic dosing regimen.

Estimated numbers of animals:

Experiment 1

Given our experience with both the acute and subchronic model and its known reproducibility a total number of 7 animals of each model for each time point will be sufficient to obtain the required post-mortem brain tissue to determine the maximal P2Y₁₂ receptor expression on microglial cells and target engagement of the PET tracers. In addition, **7 non-treated mice** are requested as a control.

We request for the acute model 5 time points*7 animals = **35 mice**.

For the subchronic model 9 time point*7 animals = **63 mice**.

Total, 105 mice

Experiment 2

For *in vivo* PET tracer analysis, we will analyse a maximum of 4 different tracers, either labeled with fluorine-18 or carbon-11. Each tracer will be evaluated by both PET/CT as well as PET/MR imaging, in both the acute and subchronic model.

Based on our experience with the MPTP model and PET tracer evaluation, we request

Controls: n = 4 for both PET/CT and PET/MR imaging; 4 animals * 4 tracers * 2 imaging techniques = total **32 mice**

MPTP acute model: n = 8 for 4 tracers (n = 32), both fluorine-18 and carbon-11 labeled (n = 64), both PET/CT and PET/MR imaging (n = 128); total of **128 mice**

MPTP subchronic model: n = 8 for 4 tracers (n = 32), both fluorine-18 and carbon-11 labeled (n = 64), both PET/CT and PET/MR imaging (n = 128); total of **128 mice**

To determine PET tracer specificity, a displacement study needs to be performed. Several minutes after the radiolabeled tracer is injected, a non-labeled P2Y₁₂ antagonist is injected to compete with and displace the tracer. Based on our experience, for each tracer a maximal numbers of animals 4 is required. We will use 4 tracers (labelled with either fluorine-18 or carbon-11 labeled = 8). Together this requires 4*8 = 32 mice. In addition, we will perform such a displacement study in all experimental groups (control, MPTP acute and MPTP chronic). Total of 32 mice * 3 experimental groups = **96 mice**.

To determine the optimal time between radiolabeled PET tracer and the P2Y₁₂ antagonist, a pharmacokinetic profile of each tracer within the brain needs to be determined. For this, a maximum of 2 animals per tracer is requested. 2 animals * 4 tracers * 2 radiolabels (fluorine-18 or carbon-11). **N= 16 mice**.

Total experiment 2, 400 mice.

In total, a number of maximal 505 mice is requested.

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: Evaluation of PET tracers is only possible in animals, as the pharmacokinetic and PET tracer distribution is of crucial importance to determine the efficacy and specificity of the tracer for human use. We will use mice as we have ample experience with the MPTP model, both the acute and subchronic administration model, in these animals. In addition, in other laboratories, mice are the most frequently used animals for the MPTP models.

Reduction: As we have extensive experience with the use of both the MPTP model in mice as well as with PET tracer evaluation, this results in the use of smaller numbers of animals and reduced variation with groups. Reduction in animals needed for PET tracer evaluation is achieved by determining the optimal P2Y₁₂ expression levels on microglia prior to the PET analysis. This narrows the time window for PET imaging and thus reduces animal numbers for PET tracer evaluation. In case of a successful fluorine-18 labelled tracer, we will not evaluate the carbon-11 labelled analogue of the same tracer. In addition, a reduction of animals needed in experiment 2 will be achieved as each animal will be scanned multiple times, to obtain a time-dependent PET tracer signal that reflects the course of neuroinflammation during the MPTP treatment.

Refinement:

We will reduce stress for the animals by allowing them to have enough time to habituate (at least 7 days) and provide materials to enrich the home cage environment (e.g. nesting material, tube, piece of wood). In addition, our personnel has many years of experience with animal experimentation, which benefits the swiftness and accuracy of the biotechnical actions, such as PET scanning, cervical dislocation, injection of anesthetics, MPTP and PET tracers, and blood sampling. To reduce pain, adequate anesthetics will be used. In addition, as sign of pain are reported, appropriate pain relieving measures will be taken.

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

Previous experience of our group with both the acute and the subchronic model demonstrated that in both models animals do not demonstrate signs of pain or other types of discomfort. In general, suffering through stress and fear is reduced by good housing conditions (habituation, cage enrichment) and by taking care that experiments are performed under optimal conditions (handling of animals, skilled personnel).

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.

Until now, no PET tracer development based on the P2Y₁₂ receptor to determine *in vivo* microglial activation for monitoring neuroinflammation in PD has been described in literature.

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.

When animals show sign of pain, appropriate analgesia will be applied.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

In theory, the subchronic administration model of MPTP (using doses of >50mg/kg/day) could result in systemic toxicity resulting in heart failure and overall discomfort. This is reflected in weight loss. However, our proposed dosing regimen, based on our previous experience with the model, is not likely to result in these side-effects.

Explain why these effects may emerge.

These effects are a direct consequence of the procedures in this appendix.

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

Close monitoring of the animals during MPTP treatment (weight loss, behaviour)

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.

Animal weight will be monitored regularly. In general: weight loss (decrease of >20%) from the highest recorded body weight of the animal), abnormal/unexpected behaviour and/or posture, general signs of illness and/or discomfort. The discomfort will never be allowed to increase to more than moderate; animals will be killed if it is expected that discomfort will progress beyond moderate.

Indicate the likely incidence.

Maximal 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').

| | Model | Type of discomfort | Level of discomfort | Duration of discomfort |
|---|---|---|---|--|
| Experiment 1: obtaining MPTP post-mortem tissue | Control animals (7) | <ul style="list-style-type: none"> • injected with salt solution • Cervical dislocation | <ul style="list-style-type: none"> • Mild | <ul style="list-style-type: none"> • Seconds |
| | Acute (35) | <ul style="list-style-type: none"> • MPTP injection (i.p.) • MPTP-induced symptoms • Cervical dislocation | <ul style="list-style-type: none"> • Moderate (max.) • Moderate • Mild | <ul style="list-style-type: none"> • Minutes • Max. 48 h • Seconds |
| | Subchronic (63) | <ul style="list-style-type: none"> • MPTP injection • MPTP-induced symptoms • Cervical dislocation | <ul style="list-style-type: none"> • Moderate (max.) • Moderate • Mild | <ul style="list-style-type: none"> • Minutes • Max. 8 days • Seconds |
| Experiment 2: In vivo PET tracer evaluation | Control animals, PK and displace- ment study (32 + 96 + 16) | <ul style="list-style-type: none"> • I.V. injection of PET tracers, anesthesia, PET scan (max. 6 scans/mouse), blood sampling • Terminal anesthesia | <ul style="list-style-type: none"> • Moderate (cumulative discomfort) • Mild | <ul style="list-style-type: none"> • Max. 80 min/scan • Minutes |
| | Acute (128) | <ul style="list-style-type: none"> • MPTP injection • MPTP-induced symptoms • I.V. injection of PET tracers, anesthesia, PET scans (max. 4 scans/mouse), blood sampling • Terminal anesthesia | <ul style="list-style-type: none"> • Moderate (max.) • Moderate • Moderate (cumulative discomfort) • Mild | <ul style="list-style-type: none"> • Minutes • Max. 48 h • Max. 80 min • Minutes |
| | Subchronic (128) | <ul style="list-style-type: none"> • MPTP injection • MPTP-induced symptoms • I.V. injection of PET tracers, anesthesia, PET scans (max. 6 scans/mouse), blood sampling • Terminal anesthesia | <ul style="list-style-type: none"> • Moderate • Moderate • Moderate (cumulative discomfort) • Mild | <ul style="list-style-type: none"> • Minutes • Max. 8 days • Max. 80 min /scan • Minutes |
| <p>The expected percentage of animals that will experience the indicated level of mild discomfort is 1,4% and moderate discomfort is 98,6%.</p> | | | | |

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.

In experiment 1, analysis of both anti-P2Y12 antibodies and PET tracer target engagement in both the acute and subchronic model requires post-mortem brain tissue of the treated and control mice is a primary outcome measurement.

In experiment 2, verification of the *in vivo* PET tracer signal using autoradiography of the post-mortem brain tissue is of importance to evaluate the target engagement and specificity of the PET tracer.

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

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
AVD1140020171070

Bijlagen

2

Datum 21 maart 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 17 maart 2017. Het gaat om uw project "New P2Y12 receptor targeting PET tracers as next generation neuroinflammation markers in Parkinson's disease.". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1140020171070. 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:

21 maart 2017

Aanvraagnummer:

AVD1140020171070

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
21 maart 2017
Aanvraagnummer:
AVD1140020171070

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:
21 maart 2017
Aanvraagnummer:
AVD1140020171070

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens gemachtigde

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

Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Ja

Wat mag de gemachtigde doen?

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

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u?

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

Over uw project

Geplande startdatum: 1 juni 2017
Geplande einddatum: 31 mei 2021

Titel project: New P2Y12 receptor targeting PET tracers as next generation neuroinflammation markers in Parkinson's disease.

Titel niet-technische samenvatting: PET tracer ontwikkeling om hersenontstekingsreacties in patiënten met de ziekte van Parkinson te meten.

Naam DEC: DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum

Postadres DEC: [REDACTED]
Amsterdam/ Nederland

E-mailadres DEC: [REDACTED]

Datum:

21 maart 2017

Aanvraagnummer:

AVD1140020171070

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1035,-

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: 16 maart 2017



> 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
AVD1140020171070

Bijlagen

2

Datum 21 maart 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 21 maart 2017
Vervaldatum: 20 april 2017
Factuurnummer: 171070
Ordernummer: Inkoopordernummer: 4667599

| Omschrijving | Bedrag |
|---|-----------|
| Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD1140020171070 | € 1035,00 |

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.

Format DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer:
11400
2. Titel van het project:
New P2Y12 receptor targeting PET tracers as next generation neuroinflammation markers in Parkinson's disease.
3. Titel van de NTS:
PET tracer ontwikkeling om hersenontstekingsreacties in patiënten met de ziekte van Parkinson te meten
4. Type aanvraag:
nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: *Vrije Universiteit Amsterdam / VU medisch centrum*
 - telefoonnummer contactpersoon: XXXXXXXXXX
 - e-mailadres contactpersoon: XXXXXXXXXX
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: *26-01-2017*
 - aanvraag compleet: *26-01-2017*
 - in vergadering besproken: *14-02-2017*
 - 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: *17-02-2017*
 - advies aan CCD: *16-03-2017*
7. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.
 - Datum advies IvD: *26-01-2017*
 - 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: *15-02-2017*
- Strekking gestelde vragen: *Graag ziet de DEC meer uitleg bij de achtergrond, de haalbaarheid en bij experiment 1. Onderdeel 3.4.1 is nog niet helder. Welke informatie ga je verzamelen en hoe leidt dit tot het beantwoorden van het doel? Graag weergeven: het model, de interventies en de uitleesparameters. Graag nog wat extra uitleg bij de mate van ongerief.*
- Datum antwoord: *17-02-2017*

- 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. *Het project is 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. 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 het bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

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 Wet Natuurbescherming): n.v.t.*
3. *De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie translationeel onderzoek is in overeenstemming met de hoofddoelstelling. De doelstelling is helder omschreven.*

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.*

De ziekte van Parkinson is een hersenziekte waarbij specifieke zenuwcellen in de hersenen verloren gaan. Hierdoor hebben patiënten met deze ziekte last van trillende handen en benen, verminderde beweging, stijfheid van de spieren en geheugenproblemen. Het is bekend dat bij Parkinson de activering van de afweercellen van de hersenen, de zogenaamde microgliacellen, een ongunstig effect hebben op het verloop van de ziekte. Daarom worden er nieuwe therapieën ontwikkeld, die als doel hebben de activatie van deze microgliacellen te verminderen. Echter is er nog geen goede manier om in de patiënt zelf aan te tonen of de nieuwe behandelmethod

daadwerkelijk de activatie van microgliacellen tegen gaat. Met behulp van positronemissietomografie (PET), een beeldvormende techniek waarbij een stof wordt gemerkt met een radioactief isotoop (een zogenaamde PET tracer) zou dit wel kunnen.

Het directe doel van deze studie is het testen van nieuwe specifieke radioactieve PET tracers voor het imagen van actieve microgliacellen bij een diermodel voor de ziekte van Parkinson. Het uiteindelijke doel is om met behulp van PET tracers, de activiteit van microgliacellen in de hersenen van Parkinson patiënten te meten. Zodat de effectiviteit van nieuwe behandelmethoden, gericht tegen het voorkomen van activatie van microgliacellen, beter en sneller kan worden bestudeerd. Dit zal bijdragen aan het onderzoek naar nieuwe efficiëntere behandelmethoden voor Parkinsonpatiënten. 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 zijn: 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 onderzoek zal bijdragen aan het beter en sneller bestuderen van de effectiviteit van nieuwe behandelmethoden bij Parkinsonpatiënten.

6. Is er aanleiding voor de DEC om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken?: *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. Licht uw beoordeling toe.

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. Licht uw beoordeling toe.

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 bijdragen aan effectievere behandelmethoden voor patiënten met de ziekte van Parkinson. De gevraagde looptijd van 4 jaar acht de DEC reëel gezien de opzet 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: *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.

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.

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 cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe.

Het ongerief als gevolg van de dierproeven is naar de mening van de DEC door de aanvragers realistisch ingeschat en geclassificeerd.

Het cumulatieve ongerief is matig voor 98.6% van de dieren. De controle dieren in experiment 1 (1,4%) zullen alleen een injectie met zoutoplossing krijgen, waardoor ze maximaal licht ongerief ervaren. De rest van de dieren zal licht tot maximaal matig ongerief ervaren, als gevolg van injecties, meerdere malen anesthesie in combinatie met PET scans, bloedafname en door het ontstaan van ziekte symptomen (Parkinson diermodel). Voordat de dieren meer dan matig ongerief zullen ondervinden worden de humane eindpunten toegepast.

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.

De integriteit van de dieren zal worden aangetast omdat de dieren een injectie krijgen die bepaalde ziekte processen van de ziekte van Parkinson nabootst. Daarnaast zal er bloed worden afgenomen, zullen de dieren onder anesthesie PET scans ondergaan en worden de dieren gedood.

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.

De criteria voor humane eindpunten zijn goed gedefinieerd. De humane eindpunten zullen worden toegepast, wanneer er duidelijke veranderingen zijn in het gewicht en gedrag van de dieren of wanneer de dieren te veel ziekteverschijnselen vertonen. De verwachting is dat maximaal 5% van de dieren de humane eindpunten zal bereiken.

3V's

14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Licht uw beoordeling toe

Het project is in overeenstemming met de vereisten ten aanzien van de vervanging van dierproeven. Het gebruik van proefdierlijke methoden of minder complexe diersoorten is volgens

de DEC niet mogelijk.

De complexe structuur van de hersenen is nodig om de ziekteverschijnselen van de ziekte van Parkinson goed na te kunnen bootsen. Bovendien is de evaluatie van PET tracers alleen mogelijk in dieren, omdat de effectiviteit en de specificiteit (opname in de hersenen) van de tracer in het lichaam van cruciaal belang is voor de beoordeling van de tracer. Het is daardoor niet mogelijk deze experimenten uit te voeren in celkweek.

De keuze voor het gebruik van muizen is naar het oordeel van de DEC gerechtvaardigd. Om de ziekteverschijnselen van de ziekte van Parkinson na te bootsen gebruikt men twee verschillende (MPTP) muismodellen. Een acuut model dat dopamine afname weergeeft en het sub-chronische model dat neurodegeneratie (het afsterven van zenuwcellen) nabootst. Beide modellen zorgen voor activatie van de microglia-cellen, de biologische target van dit project. Tot nu toe blijft het onduidelijk welke type neuroinflammatie van belang is voor de pathogenese en de ontwikkeling van neurodegeneratie in Parkinson. Daarom is het van essentieel belang om zowel de acute als de sub-chronische soort inductie van Parkinson te evalueren.

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.

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. Door voorafgaande aan de PET tracer evaluatie eerst te bepalen wanneer in de tijd het te verwachten PET signaal optimaal zal zijn, hebben de onderzoekers minder dieren nodig. Daarnaast zal men dezelfde dieren meerdere malen scannen, zodat het aantal observaties per dier wordt gemaximaliseerd.

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 505 muizen 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. 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.

Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd.

De dieren krijgen tijd om te acclimatiseren, worden sociaal gehuisvest en intensief gemonitord. Passende anesthesie en pijnbestrijding zal de gevolgen van de ingrepen minimaliseren. Alle procedures zullen uitgevoerd worden door ervaren en bekwaam personeel.

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: *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.

Voor dit onderzoek zal men gebruik maken van mannelijke dieren. Vanuit de literatuur is het bekend dat in vrouwelijke muizen de MPTP toxiciteit ernstiger is dan die bij mannelijke muizen. Dit verschil in het toxiciteitslevel tussen mannen en vrouwen verhindert het gebruik van beide geslachten binnen één experiment. Daarnaast zijn de doses en tijdstippen van de MPTP gebaseerd op eerdere experimenten bij mannelijke dieren.

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.

Na het euthanaseren van de dieren zal men hersenweefsel verzamelen voor verdere analyse, zoals voor autoradiografie. Er worden dodingsmethodes uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU gebruikt.

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?

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

Rechtvaardigen de doeleinden van dit project het voorgestelde gebruik van de dieren?

Bij deze dierproef is de centrale morele vraag: Rechtvaardigt het testen van nieuwe specifieke PET tracers voor het imageren van de activiteit van microglia-cellen, bij de ziekte van Parkinson het gebruik van 505 muizen in de dierproef die daarvan licht tot maximaal matig 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 de dieren ondervinden licht tot maximaal matig ongerief. Dat leidt tot veel nadeel

voor deze proefdieren. De waarden voor de onderzoekers: Voordeel vanwege de kennisontwikkeling. De waarden die voor de patiënten bevorderd worden: Mogelijk veel voordeel wanneer de dierproef bijdraagt aan het ter beschikking komen van effectievere behandelmethoden voor Parkinson patiënten.

De DEC is van mening dat de belangen van de wetenschap en de patiënten in dit project zwaarder wegen dan de belangen van de 505 muizen die hiervoor als proefdieren gebruikt worden. Voor het verkrijgen van kennis over PET tracers met betrekking tot de ziekte van Parkinson, 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.

Volgens de DEC rechtvaardigen de doeleinden van dit project het voorgestelde gebruik van dieren. Het directe doel van deze studie is het testen van nieuwe PET tracers, voor het imagen van actieve microglia-cellen, bij een diermodel voor de ziekte van Parkinson. Het verwachte resultaat, in het kader van het beschikbaar komen van nieuwe effectievere behandelmethoden voor Parkinson patiënten is afgewogen tegen het, als maximaal matig 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 505 muizen 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 belang wordt door de DEC ingeschat als substantieel en het wetenschappelijk belang als reëel. De resultaten van dit onderzoek zullen informatie geven over de PET tracers en zullen bijdragen aan het beschikbaar komen van een effectievere behandeling van Parkinson.

(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 belang en het reële wetenschappelijk belang van het onderzoek naar het oordeel van de DEC opweegt tegen het gebruik van maximaal 505 muizen en het daarbij verwachte lichte tot maximaal matige 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.

Er is geen dilemma geconstateerd.



> 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
AVD1140020171070
Bijlagen
1

Datum 25 april 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 17 maart 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "New P2Y12 receptor targeting PET tracers as next generation neuroinflammation markers in Parkinson's disease." met aanvraagnummer AVD1140020171070. 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 "New P2Y12 receptor targeting PET tracers as next generation neuroinflammation markers in Parkinson's disease." starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 juni 2017 tot en met 31 mei 2021.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum gevoegd. Dit advies is opgesteld op 16 maart 2017. 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:
25 april 2017
Aanvraagnummer:
AVD1140020171070

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



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 1 juni 2017 tot en met 31 mei 2021, voor het project "New P2Y12 receptor targeting PET tracers as next generation neuroinflammation markers in Parkinson's disease." met aanvraagnummer AVD1140020171070, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum. 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 17 maart 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 17 maart 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 17 maart 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 16 maart 2017, ontvangen op 17 maart 2017.

| Naam proef | Diersoort/ Stam | Aantal dieren | Ernst | Opmerkingen |
|--|-------------------------|---------------|-----------------------------|-------------|
| 3.4.4.1 PET tracer evaluation in both the acute and subchronic MPTP mouse model | | | | |
| | Muizen (Mus musculus) / | 505 | 98% Matig 2% 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 anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen

Aanvraagnummer:

AVD1140020171070

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:
AVD1140020171070

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 onvereenigbaar 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:
AVD1140020171070

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 W17-09 | | | | | | | | | |
|-------------------------------|---|-----------------|------|--------|-------|-------------------|--------|--------|------|
| nr. | document NTS 20171125 | wordt verstrekt | | | | weigeringsgronden | | | |
| | | reeds openbaar | niet | geheel | deels | 10.1.c | 10.2.e | 10.2.g | 11.1 |
| 1 | Aanvraagformulier | | | | x | | x | x | |
| 2 | NTS oud | | | | x | | | x | |
| 3 | NTS nieuw | x | | | | | | | |
| 4 | Projectvoorstel | | | | x | | | x | |
| 5 | Bijlage animal procedure | | | | x | | | x | |
| 6 | Ontvangstbevestiging en factuur | | | | x | | x | x | |
| 7 | DEC advies | | | | x | | | x | |
| 8 | Verzoek om aanvullende informatie | | | | x | | x | x | |
| 9 | Mail antwoord verzoek op aanvullende informatie | | | | x | | x | x | |
| 10 | Antwoord op verzoek om aanvullende informatie | | | | x | | x | x | |
| 11 | Advies CCD | | x | | | | | | x |
| 12 | Beschikking en vergunning | | | | x | | x | x | |



Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

- U bent van plan om één of meerdere dierproeven uit te voeren.
- Met dit formulier vraagt u een vergunning aan voor het project dat u wilt uitvoeren. Of u geeft aan wat u in het vergunde project wilt wijzigen.
- Meer informatie over de voorwaarden vindt u op de website www.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?
Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.

Ja > Vul uw deelnemernummer in 10800
 Nee > U kunt geen aanvraag doen

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

| | |
|---|----------------------|
| Naam instelling of organisatie | Universiteit Utrecht |
| Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde | [Redacted] |
| KvK-nummer | 30275924 |

1.3 Vul de gegevens van het postadres in.
Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.

| | |
|---------------------------------------|--------------------------------------|
| Straat en huisnummer | Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht |
| 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 | [Redacted] | |
| Afdeling | departement Infectie ziekten & Immunologie | |
| Telefoonnummer | [Redacted] | |
| E-mailadres | [Redacted] | |

1.5 (Optioneel) 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 | Post Doc | |
| Afdeling | departement Infectieziekten en Immunologie | |
| 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 checked="" type="checkbox"/> Mw. |
| Functie | dierenarts/ onderzoeker (UD) | |
| Afdeling | Departement Landbouwhuisdieren | |
| 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 - 5 - 2017 |
| Einddatum | 1 - 5 - 2018 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Immunization study to test the safety of a novel vaccine producer cell line
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Immunisatie studie om de veiligheid te testen van een nieuwe vaccin producerende cellijn
- 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 € 568 Lege

Wijziging € Lege

4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.

Via een eenmalige incasso

Na ontvangst van de factuur

Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.

5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

Projectvoorstel

Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen, indien van toepassing

Melding Machtiging

6 Ondertekening

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

Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondergetekende verklaart:

- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
- dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
- dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
- dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
- dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam

Functie

Plaats

Datum

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.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

- 1.1 Titel van het project : Immunisatie studie om de veiligheid te testen van een nieuwe vaccin producerende cellijn
- 1.2 Looptijd van het project Drie maanden
- 1.3 Trefwoorden (maximaal 5) Vaccinatie, Kalf, Vaccin veiligheid

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
- Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid
- 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
- U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.*

3 Projectbeschrijving

- 3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)
- Infectieziekten veroorzaken onnodig leed onder dieren. Vaccineren met veilige en effectieve vaccins is een belangrijk manier om infectieziekten te bestrijden. Sommige vaccins leiden tot een ongewenste afweerrespons, bijvoorbeeld doordat er antistoffen tegen diersoorteigen eiwitten worden aangemaakt. Antistoffen tegen deze diersoorteigen eiwitten kunnen in nakomelingen tot ziekte leiden. Het doel van dit onderzoek is om te bestuderen of een alternatieve productie van vaccins kan voorkomen dat vaccinatie leidt tot antistoffen tegen diersoorteigen eiwitten en of zo'n vaccin nog steeds goede bescherming geeft. Er zullen twee vaccins getest worden op kalveren, een vaccin geproduceerd op de normale manier en een vaccin welke de kans op

het induceren van antistoffen tegen diersoortigen eiwitten vermindert. [redacted] in de cellijn zijn [redacted], waardoor er [redacted] [redacted] en er [redacted]. Deze vaccins voldoen aan minimale veiligheids- en kwaliteitseisen. De afweerrespons geïnduceerd door deze vaccins zal gemeten en vergeleken worden.

- 3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang? Met dit onderzoek wordt een bijdrage geleverd het verbeteren van de veiligheid van vaccins. Vaccins zijn belangrijk om kalveren, en dieren en mensen in het algemeen, gezond te houden. Dit onderzoek is een eerste stap in het ontwikkelen van een veiligere productie methode van vaccins: Testen of een alternatieve manier van celkweken voor vaccin productie leidt tot een veiliger vaccin.
- 3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt? 14 kalveren in de leeftijd van 3-6 maanden.
- 3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren? Vaccinatie en het afnemen van bloed geeft lichte stress. De vaccinatie kan leiden tot zwelling en een lichte temperatuursverhoging, de dieren hebben hier over het algemeen geen last van.
- 3.5 Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst? Licht ongerief door het inbrengen van een naald.
- 3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop? De kalveren gaan na afloop van het experiment terug naar de onderwijspool, daar is geen ontheffing voor nodig.

4 Drie V's

- 4.1 **Vervanging**
Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden. Omdat antilichaamproductie na vaccinatie gemeten moet worden zijn proefdieren nodig.
- 4.2 **Vermindering**
Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt. Het minimaal aantal proefdieren wat nodig is om betrouwbaar een verschil tussen de twee behandelingsgroepen aan te tonen wordt gebruikt. Deze aantallen zijn statistisch onderbouwd.

4.3 **Verfijning**

Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diermodel(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.

Er is voor runderen gekozen, omdat dit ook de toekomstige doelgroep is.

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

De dieren worden gehuisvest in groepshuisvesting op stro, ze krijgen ad lib ruwvoer en krachtvoer. De vaccinatie en bloedafname wordt gedaan door medewerkers die hier veel ervaring mee hebben. Ze staan vanaf hun geboorte in een quarantaine stal, zodat het risico op besmetting nihil is en zijn van te voren negatief getest op BVD virus en antilichamen.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen



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.

Viruses for vaccine production are often grown on cell lines derived from the species in which the vaccine will be used. This means that there is a risk of contamination of the vaccine with proteins from this cell line and these proteins may elicit antibodies against proteins from the same species, called alloantibodies. Alloantibodies can lead to severe adverse effects (reviewed in Benedictus 2016). An example of an adverse effect as a result of a vaccine-induced alloantibody response is the disease Bovine Neonatal Pancytopenia (BNP), which led to the death of thousands of calves throughout Europe and New Zealand (Jones 2013, Friedrich 2009). The disease is generally accepted to have been caused by an alloantibody response against proteins from the vaccine production cell line present in the vaccine (Benedictus 2016). Vaccination of cows with Pregsure® BVD (Bovine Viral Diarrhea) induced alloantibodies, which were transferred to the calf via the colostrum. These pathogenic antibodies attacked cells in the calf, leading to neonatal pancytopenia which usually resulted in death. Although the incidence of BNP in vaccinated animals was around 0.3%, the widespread use of Pregsure® BVD throughout Europe and the occurrence of subclinical disease, resulted in a large impact on the dairy industry. The vaccine contained a potent adjuvant that induced a strong and long lasting antibody response. The potency of the adjuvant is hypothesized to have contributed to the occurrence of BNP. Vaccine-induced alloantibody mediated disease have only sparsely been documented and BNP is the best studied example and also the example with the biggest impact. However, the use of new and more potent adjuvants may increase the risk of similar vaccine-induced alloantibody mediated diseases.

Novel methods to reduce the chance of alloantigen contamination of vaccines would greatly increase the safety of vaccines. Possible approaches to avoid alloantibodies responses, all applied more or less successfully are to i) use xenogeneic cell lines, ii) remove protein contaminations from the vaccine,

Many viruses will only grow on cell lines from the host species, making approach i) not generally applicable. Removing unwanted proteins ii) has the risk of being incomplete, is likely to be expensive and will have to be continuously performed. Innovative and more effective vaccines are not only likely to give stronger immune responsiveness to the infectious agent *per sé*, but also to impurities inevitably present. We therefore believe that

to

has the highest chance of success. We have constructed

and have shown that this cell line has

in the cell line are

which means that

and

A vaccine production cell line

modified to

can be used continuously and for

Such an approach has the potential to strongly reduce the risk of

mediated disease syndromes

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 goals of this experiment are to test, as a proof of principle, whether an alternative vaccine production cell line reduces the risk of inducing an unwanted alloimmune response and whether such a vaccine induces an immune response against the viral component of the vaccine that is comparable to normal vaccines. For this purpose, we will compare the vaccine induced immune response of vaccines produced using the wild type- and the modified-vaccine-cell lines, respectively.

Assays to measure alloimmune responses and the immune response against the viral component of the vaccine are in routine use at the Dept of Infectious Diseases and Immunology, Fac of Veterinary Medicine. A veterinary pharmaceutical company will produce the vaccines according to routine procedures, and will assure that the vaccines meet minimal safety and quality criteria. The experiments will be conducted at the facilities of the Dept Farm Animal Health, Fac of Veterinary Medicine, that has qualified personnel involved in housing and maintenance of the calves as well as Veterinarians responsible for vaccination and sampling procedures.

3.3 Belang

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

Alloantigen contamination of vaccines poses a risk to the health and well-being of vaccinated animals, which is best exemplified by the occurrence of the vaccine-induced alloimmune-mediated disease Bovine Neonatal Pancytopenia (reviewed in Benedictus 2016). Whereas the alloantibodies do not cause harm to the vaccinated dams, upon natural transfer of maternal antibodies via colostrum they are able to do so in the newborn calves. Although the incidence of BNP in vaccinated animals was around 0.3%, deaths of thousands of calves have been attributed to Bovine Neonatal Pancytopenia (PEI 2011). In addition to this, the pathogenic vaccine-induced alloantibodies have also lead to subclinical disease (Bell 2014) and a reduction in the use of vaccines due to a fear among farmers of similar vaccine-induced diseases.

Vaccination is one of the most important sustainable and durable measures to reduce the burden of infectious diseases. Results from these experiments may lead to safer vaccine production cell lines, [REDACTED] which benefits the target species, but the concept will also be applicable to vaccine production in general.

Paul-Ehrlich-Institute. Investigating the cause of Bleeding Calf Syndrome. 2011. [cited 2016 Oct 14]. Available from: <http://www.pei.de/EN/information/journalists-press/press-releases/2011/02-cause-bleeding-calf-syndrome.html>

Bell CR, Kerr MG, Scott PR, et al. Evidence of a high incidence of subclinically affected calves in a herd of cattle with fatal cases of Bovine Neonatal Pancytopenia (BNP). BMC Vet Res. 2014;10:245. Epub 2014 Nov 2.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

Calves will be vaccinated with a BVD virus vaccine [REDACTED] grown on an alternative vaccine production cell line (n=5) or on the original cell line (n=5). The alloimmune response against vaccine components will be measured quantitatively in time and compared to test the safety of the vaccine. The antibody response against the viral component of the vaccine will also be measured quantitatively in time to test the suitability of the cell lines as vaccine production cell lines. Since this experiment is a proof of concept we do not intend to perform a challenge experiment of the vaccinated calves at this stage and the total antibody response against the viral component will be used as a correlate for a protective vaccine-induced immune response. Commercial BVD vaccines induce a protective vaccine-induced immune response. Therefore we call it a protective vaccine-induced immune response. Unvaccinated calves (n=4) will serve as control animals, since 'natural' antibodies against both alloantigens and the virus may occur. The antibody response is a suitable correlate of protection given the question studied and the impact on animal welfare of including a challenge studied is therefore not warranted.

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

Acclimatization.

Age \pm 3-6 months: Immunization (D0), booster after 3 and 6 weeks.

Weekly blood sampling from D-7 until the end of the experiment to perform several immunological assays.

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.

Before the start of the experiment calves born from BVD-free dams will be selected and tested if they are BVD-free. In vitro suitable cell lines will be tested for the production of vaccines. The experimental vaccines will be produced according to standard production methods also used for the production of commercial vaccines.

In the experiment calves will be immunized with the experimental vaccines to test the induction of alloimmune responses and protective immune responses. Weekly blood samples are necessary to measure the immune responses in time. The immunization and blood sampling is not expected to lead to complications.

Following blood sampling the results from the different immunological assays will be analyzed to determine the alloimmune response and the immune response against the viral component in both experimental vaccination groups.

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

| Volgnummer | Type dierproef |
|------------|--------------------------|
| 1 | Immunisatie van kalveren |
| 2 | |
| 3 | |
| 4 | |
| 5 | |
| 6 | |
| 7 | |
| 8 | |
| 9 | |



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. | 10800 | |
| 1.2 | Vul de naam van de instelling of organisatie in. | Universiteit Utrecht | |
| 1.3 | Vul het volgnummer en het type dierproef in. | Volgnummer | Type dierproef |
| | | 1 | Immunisatie van kalveren |

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.

Het doel van dit onderzoek is om de immuunrespons geïnduceerd door een conventioneel geproduceerd vaccin te vergelijken met een vaccin geproduceerd op een aangepase cellijn, hiervoor zijn levende kalveren nodig. De primaire uitkomstparameters zijn de kwantitatieve alloantilichaam- en virus specifieke antilichaamrespons. Bij BNP moederdieren zijn 46-91% van de alloantilichamen specifiek voor ██████████ Hierop gebaseerd nemen we aan dat de alloantilichaam niveaus in de groep gevaccineerd met het 'aangepaste vaccin' gemiddeld 50% is van de groep gevaccineerd met een 'normaal vaccin'.

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.

Kalveren worden 3x subcutaan gevaccineerd met 3 weken tussentijd en wekelijks (11 weken) wordt bloed afgenomen, waarbij de bloedafname onder de 8ml/kg/14 dagen blijft.

Er wordt driemaal gevaccineerd in korte tijd. Dit is niet gebruikelijk in de praktijk, maar is bedoeld om een hoger antilichaam productie krijgen om zodoende de inductie van ongewenste (allo)antilichamen beter te kunnen meten.

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

Sample size berekening:

We verwachten dat de alloantilichaam niveaus in de groep gevaccineerd met het 'aangepaste vaccin' 50% is van de groep gevaccineerd met een 'normaal vaccin'. Uitgaande van een power van 80%, een alpha van 5% en een standard deviatie in de alloantilichaam respons van 25% van het gemiddelde in de 'normaal vaccin' groep resulteert dit in een groeps grootte van n=4. Rekening houdend met mogelijke uitval, 5 dieren per groep. ongevaccineerde dieren worden meegenomen als controle voor spontane/maternale alloantilichamen en besmetting met BVD virus wat leidt tot antilichamen tegen BVD (n=3 +1 uitval = 4 dieren).

B. De dieren

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

Runderen, kalveren, n=14, ± 3-6 maanden lft, vrij van BVD antilichamen.

Er wordt gekozen voor kalveren omdat deze makkelijker te huisvesten zijn dan volwassen runderen. Tevens is het makkelijker om kalveren te verkrijgen die geen antilichamen tegen BVD hebben. Voor het doel van het onderzoek maakt het niet uit of de proef uit wordt gevoerd in kalveren of volwassen dieren.

De kalveren worden betrokken van het departement Landbouwhuisdieren, faculteit Diergeneeskunde UU.

De kalveren van het departement landbouwhuisdieren zijn geboren uit BVD-vrije koeien die betrokken zijn in een voedingsexperiment. Deze BVD vrije kalveren kunnen derhalve in een schone omgeving opgefokt worden en zijn voor aanvang van het experiment negatief getest op BVD antigeen en antilichamen.

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.

Gezonde dieren die terug de onderwijspool ingaan

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.

Vervanging: niet mogelijk, omdat antilichaamproductie na vaccinatie gemeten moet worden, hierbij zijn proefdieren nodig. Vermindering: statistische berekening benodigde aantal proefdieren, verfijning: voor runderen gekozen, omdat dat de toekomstige doelgroep is.

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.

Handelingen vaccinatie en bloedafname zijn de ondergrens van licht ongerief en milieu-effecten spelen in dit onderzoek geen rol. De handelingen worden uitgevoerd door gekwalificeerd en ervaren personen. De dieren worden gehuisvest in groepshuisvesting op stro en krijgen krachtvoer en ad lib ruwvoer.

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.

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 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?

x

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.

De pijn door vaccineren en bloedafname is minimaal en ongerief door pijnverlichtingsmethoden wegen niet op tegen de minimale pijn veroorzaakt door deze bloedafname en vaccineren. Vaccinatie kan leiden tot een lichte kortdurende koorts, welke niet geassocieerd is met klinische ziektesymptomen. Vaccinatie kan tevens leiden tot zwelling op de injectieplaats (warm, stevig, gevoelig voor palpatie) welke gewoonlijk binnen 14 dagen vanzelf weg trekt. Deze reactie is een verwacht gevolg van de immunrespons tegen het vaccin en behandeling is niet nodig. Als dieren klinische ziekteverschijnselen vertonen zullen de dieren wel met NSAID's behandeld worden.

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

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

geen verwacht

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

nvt

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

Goede veterinaire zorg en rustig met de dieren omgaan

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.

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

K. Classificatie van ongerief

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

Licht ongerief

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee

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

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht

Postbus 12007

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
AVD1080020171125

Bijlagen

2

Datum 23 maart 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 22 maart 2017. Het gaat om uw project "Immunization study to test the safety of a novel vaccine producer cell line". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1080020171125. 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 maart 2017

Aanvraagnummer:

AVD1080020171125

Datum:
23 maart 2017
Aanvraagnummer:
AVD1080020171125

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10800
Naam instelling of organisatie: Universiteit Utrecht
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 30275924
Postbus: 12007
Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT
IBAN: NL27INGB0000425267
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: Universiteit Utrecht

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Afdeling: departement Infectie ziekten & Immunologie
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Datum:
23 maart 2017
Aanvraagnummer:
AVD1080020171125

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: Post Doc
Afdeling: departement Infectieziekten en Immunologie
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

Naam: [REDACTED]
Functie: dierenarts/ onderzoeker (UD)
Afdeling: Departement Landbouwhuisdieren
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 mei 2017
Geplande einddatum: 1 mei 2018
Titel project: Immunization study to test the safety of a novel vaccine producer cell line
Titel niet-technische samenvatting: Immunisatie studie om de veiligheid te testen van een nieuwe vaccin producerende cellijn
Naam DEC: DEC Utrecht
Postadres DEC: Postbus 85500 3508 GA Utrecht
E-mailadres DEC: dec-utrecht@umcutrecht.nl

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 568,-
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:



Plaats:

Utrecht

Datum:

1 februari 2017

Datum:

23 maart 2017

Aanvraagnummer:

AVD1080020171125



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UU-ASC
Postbus 80011
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
AVD1080020171125
Bijlagen
2

Datum 23 maart 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur
Factuurdatum: 23 maart 2017
Vervaldatum: 22 april 2017
Factuurnummer: 171125
Ordernummer: CB. 841910.3.01.011

| Omschrijving | Bedrag |
|---|----------|
| Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD1080020171125 | € 568,00 |

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.

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer : 2017.II.811.003
2. Titel van het project : Immunization study to test the safety of a novel vaccine producer cell line
3. Titel van de NTS : Immunisatie studie om de veiligheid te testen van een nieuwe vaccin producerende cellijn

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: 07-02-2017
- aanvraag compleet:
- in vergadering besproken: 15-02-2017
- anderszins behandeld:
- termijnonderbreking(en) van / tot : 20-02-2017/02-03-2017
- besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
- aanpassing aanvraag:
- advies aan CCD: 20-03-2017

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: 20-02-2017
- Datum antwoord: 02-03-2017
- Gestelde vragen en antwoorden:

- 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 heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. De opzet komt het best overeen met voorbeeld 1 uit de handreiking 'Handreiking Invulling Definitie Project'. De aanvraag betreft een proof of principle studie met een straight forward opzet. Het is helder wat de primaire uitkomstparameters zijn en welke handelingen de individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondervinden. De DEC is er om die reden van overtuigd dat de het project toetsbaar is.
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 hoofddoelstellingen.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is bestuderen of het gebruik van een alternatieve vaccinatiec lijn het risico op het induceren van een allo-immuunrespons verminderd en of een dergelijk vaccin een zelfde immuunrespons induceert als conventionele vaccins. Het uiteindelijke doel van het project is het ontwikkelen van een veiligere en effectieve productiemethode van vaccins.
Sommige vaccins leiden tot een ongewenste allo-immuunrespons, waarbij antistoffen tegen de diersoortigen eiwitten worden aangemaakt. Deze antistoffen kunnen in nakomelingen tot ziekte leiden. Het zoeken naar een alternatieve productiemethode van vaccinatiec lijnen, waarbij deze allo-immuunresponse niet optreedt kan derhalve leiden tot een veiligere en effectievere vaccinatie. De DEC is daarom van mening dat er in voldoende mate een relatie is tussen het directe doel en het uiteindelijke doel.
5. De belangrijkste belanghebbenden in dit onderzoeksproject zijn: de proefdieren/het doeldier en het onderzoeksveld. Voor de proefdieren (runderen) 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 ervaren. De proefdieren zijn tevens doeldier. Voor hen is dit onderzoek van belang, omdat het kan bijdragen aan een veiligere en effectievere methode van vaccineren, wat ten gunste komt aan hun gezondheid (en dat van hun kalveren) en daaruit voortvloeiend de kwaliteit van leven. Voor het onderzoeksveld geldt dat het ontwikkelen

van een alternatieve productiemethode bijdraagt aan een goede wetenschappelijke reputatie. Wetenschappelijke status kan door het onderzoeksveld van belang geacht worden, maar dient naar de mening van de DEC geen rol te spelen in de ethische afweging over de toelaatbaarheid van het gebruik van proefdieren.

6. De aanvrager geeft aan dat er geen nadelige effecten op het milieu te verwachten. De DEC ziet geen aanleiding om aan te nemen dat zich toch nadelige effecten zullen voordoen.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De onderzoeksgroep heeft veel ervaring met het meten van allo-immuunrespons en de immuunrespons tegen virale componenten in vaccins. Een veterinaire farmaceutische bedrijf zal de vaccins produceren. De DEC is er daarom van overtuigd dat de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen beschikt om de projectdoelstelling met de gekozen strategie/aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren. De DEC is er bovendien van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project zal kunnen en blijven voldoen aan de 3V-beginselen om te voorkomen dat teveel proefdieren zullen worden ingezet en dat ze onnodig nadeel zullen ondervinden van de experimenten.
8. Het project is goed opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten logisch en helder aan bij de aangegeven doelstellingen en de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Voor het onderzoek worden BVD vrije kalveren gebruikt, welke worden geboren uit BVD-vrije runderen. Om te checken of de kalveren ook echt BVD vrij zijn, zullen zij direct na geboorte worden getest of zij het BVD virus of antilichamen daartegen hebben en vervolgens in quarantaine worden geplaatst om het besmettingsgevaar nihil te houden. Dit is echter nog geen onderdeel van het experiment maar een gangbare procedure bij de dierfaciliteit. Wanneer de kalveren 3 tot 6 maanden oud zijn start het experiment met het vaccineren van de dieren met een BVD virus, geproduceerd op een aangepaste cellijn of de conventionele cellijn. De primaire uitkomstparameters zijn de kwantitatieve alloantilichaam- en virus specifieke antilichaamrespons. Omdat het gaat om een proof of concept studie zullen de gevaccineerde kalveren niet gechallenged worden en de totale antibodyrespons tegen virale componenten zal gebruikt worden als een correlaat voor een beschermend vaccin-geïnduceerde immuunrespons.

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 EU richtlijn)
 - Zwerfdieren (10h)

- Hergebruik (1e lid 2)
- Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
- Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
- Dodingsmethode niet volgens bijlage IV EU 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 EU richtlijn.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief is ingeschat als licht als gevolg van het 3x subcutaan vaccineren, het wekelijks afnemen van bloed en de eventuele stress die de dieren hiervan ondervinden.
12. De integriteit van de dieren wordt fysiek aangetast vanwege het vaccineren en de bloedafnames.
13. Vanwege de opzet van het experiment worden geen humane eindpunten verwacht.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Het is voornamelijk niet mogelijk om de antilichaamproductie na vaccinatie *in vitro* of *in silico* te meten. Om de doelstelling van dit project te kunnen behalen zijn derhalve *in vivo* experimenten noodzakelijk.
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. Voor het berekenen van het aantal benodigde dieren worden statistische methoden toegepast. En ten behoeve van de vermindering van dierproeven zullen deze experimenten uitgevoerd worden in zowel mannelijke als vrouwelijke kalveren. De DEC is van mening dat het maximale aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en proportioneel t.o.v. de gekozen strategie en looptijd.
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. Er is gekozen voor het gebruik van runderen omdat dit het doeldier is.
17. Er is geen sprake van wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Dieren van beide geslachten zullen in gelijke mate worden ingezet.
19. De dieren worden niet gedood in het kader van het project.

20. De vraag over hergebruik is niet van toepassing omdat de dieren niet worden gedood in het kader van het experiment. Na afloop van het experiment zullen de dieren worden opgenomen in de onderwijspool.

NTS

21. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

1. De morele vraag die de DEC dient te beantwoorden is of het belang van dit onderzoek, waarin onderzocht wordt of het gebruik van een alternatieve vaccinatiecellijn het risico op het induceren van een allo-immuunrespons verminderd en of een dergelijk vaccin een zelfde immuunrespons induceert als conventionele vaccins, de onvermijdelijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de gebruikte proefdieren kan rechtvaardigen.
2. Er vindt een beperkte aantasting van welzijn en integriteit van de proefdieren plaats, met licht ongerief. Daar staat tegenover dat uit dit onderzoek zal blijken of er een allo-immuunrespons optreedt bij toediening van een vaccin, welke is geproduceerd op een alternatieve cellijn, en wat de werkzaamheid van dit vaccin is voor de ziekte BNP bij kalveren (het doeldier). Infectieziekten kunnen voor een groot deel voorkomen worden door dieren te vaccineren met veilige en effectieve vaccins. Door sommige vaccins worden er echter antistoffen tegen diersoortigen eiwitten aangemaakt, wat in de nakomelingen vaak leidt tot ongerief of zelfs tot de dood van het dier. Het doeldier is er dus bij gebaat wanneer er een vaccin ontwikkeld wordt waarbij deze allo-immuunrespons niet optreedt. Op termijn kan dit onderzoek, voor de ziekte BNP maar ook voor overige vaccin-geïnduceerde allo-immuunrespons aandoeningen bij dier, een bijdrage leveren aan het verbeteren van de veiligheid van vaccins. De DEC kent daar veel gewicht aan toe.
Het is aannemelijk dat de translationele doelstellingen behaald zullen worden. Daarvoor is de inzet van proefdieren noodzakelijk, maar de onderzoekers doen al het mogelijke om het ongerief voor de dieren en het aantal dieren tot een minimum te beperken en na afloop van de studie zullen de kalveren teruggeplaatst worden in de onderwijspool.
3. Op grond van het bovenstaande is de DEC van oordeel dat onderzoek doen naar de het gebruik van een alternatieve vaccinatiecellijn, teneinde de allo-immuunrespons te verminderen, een substantieel belang vertegenwoordigt en dat dit substantiële belang opweegt tegen de beperkte aantasting van het welzijn en de integriteit van de proefdieren. Het gebruik van de proefdieren zoals beschreven in de aanvraag is daarmee gerechtvaardigd.

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.

Wanneer een beslissing

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat uw aanvraag compleet is. 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.

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.



Melding

Bijlagen via de post

- U wilt één of meerdere bijlagen naar ons versturen? Voeg *altijd* deze Melding Bijlagen toe. Wij weten dan welke documenten van u zijn en hoeveel documenten u opstuurt.
- Meer informatie vindt u op www.centralecommissiedierproeven.nl
- Of bel met ons: 0900 28 000 28 (10 ct/min).

1 Uw gegevens

- 1.1 Vul de gegevens in.
- | | | |
|----------------|--|------------|
| Naam aanvrager | | |
| Postcode | | Huisnummer |
- 1.2 Bij welke aanvraag hoort de bijlage?
Het aanvraagnummer staat in de brief of de ontvangstbevestiging.
- | | |
|----------------|--|
| Aanvraagnummer | |
|----------------|--|

2 Bijlagen

- 2.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
Vul de naam of omschrijving van de bijlage in.
- | | |
|--------------------------|--|
| <input type="checkbox"/> | |
| <input type="checkbox"/> | |
| <input type="checkbox"/> | |

3 Ondertekening

- 3.1 Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:
- | | | |
|--------------|---|------|
| Naam | | |
| Datum | - | - 20 |
| Handtekening | | |
- Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

[REDACTED]

Van: [REDACTED]
Verzonden: dinsdag 11 april 2017 15:36
Aan: 'info@zbo-ccd.nl'
CC: [REDACTED]
Onderwerp: aanvullende informatie aanvraag AVD1080020171125
Bijlagen: 20170302 nts_aanpassing final 20171104.pdf; 20170302 nts_aanpassing final 20171104.docx

L.S.,
Naar aanleiding van telefonisch overleg, enkele minuten geleden stuur ik u bij deze de aangepaste versie van de NTS van aanvraag AVD1080020171125.
Zoals overeengekomen heb ik onder 1.2 de looptijd van het project aangepast naar 1 jaar!
Neem aan dat de NTS hiermee aan uw wens voldoet, mocht dat niet zo zijn, dan hoor ik dat graag.
Vriendelijke groet,

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

Antwoord op de vragen gesteld door CCD brief 31-3-2017 van project Immunization study to test the safety of a novel vaccine producer cell line AVD1080020171125

1) In uw aanvraag geeft u aan extra dieren nodig te hebben in het geval van uitval. Zou u willen uitleggen waarom uitval in dit project verwacht is?

Jonge kalveren zijn vatbaar voor infecties en in de melkveehouderij wordt er in deze leeftijdscategorie vaak uitval waargenomen. Er wordt rekening gehouden met deze uitval niet gerelateerd aan de proef zelf.

2) U geeft aan NSAID's te willen toepassen als de dieren klinische ziekteverschijnselen vertonen. Zouden deze geneesmiddelen de uitkomst van uw onderzoek niet beïnvloeden?

Het verwachte effect van NSAID's op de inductie van een adaptieve immuunrespons is zeer klein en kortdurend.

3) In uw NTS staat de looptijd van het project op drie maanden. Dit komt niet overeen met de looptijd van het project in het aanvraagformulier. Zou u de NTS op dit punt willen aanpassen?

De NTS is aangepast in lijn met de rest van de aanvraag.

4) In uw NTS zijn er minder bekende woorden bij het brede publiek, zoals: recombinante genen, ad lib, cellijn, afweerrespons, exogeen enz. We verzoeken u de NTS op een meer voor het publiek toegankelijk manier te schrijven.

Zie nieuwe NTS

Vriendelijke groet

████████████████████, 2017-04-03



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht

Postbus 12007

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

AVD1080020171125

Bijlagen

1

Datum 11 april 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 22 maart 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Immunization study to test the safety of a novel vaccine producer cell line" met aanvraagnummer AVD1080020171125. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 4 en 11 april 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. U heeft de vragen van de CCD met betrekking tot het extra aangevraagde dieren en het effect van NSAID's op de uitkomsten van uw onderzoek beantwoord. Daarnaast heeft u de Niet-technische samenvatting tekstueel aangepast.

Beslissing

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

U kunt met uw project "Immunization study to test the safety of a novel vaccine producer cell line" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 mei 2017 tot en met 1 mei 2018.

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 20 maart 2017. 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:
11 april 2017
Aanvraagnummer:
AVD1080020171125

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:


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: Universiteit Utrecht
Adres: Postbus 12007
Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT
Deelnemersnummer: 10800

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 mei 2017 tot en met 1 mei 2018, voor het project "Immunization study to test the safety of a novel vaccine producer cell line" met aanvraagnummer AVD1080020171125, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Utrecht.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED] Voor de uitvoering van het project is dierenarts/ onderzoeker (UD) verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 22 maart 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 22 maart 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 11 april 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 20 maart 2017, ontvangen op 22 maart 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 4 en 11 april 2017

| Naam proef | Diersoort/ Stam | Aantal dieren | Ernst | Opmerkingen |
|---|--|---------------|------------|-------------|
| 3.4.4.1 Immunisatie van kalveren | | | | |
| | Runderen (Bos taurus) / kalveren van 3-6 maanden oud | 14 | 100% Licht | |



Aanvraagnummer:
AVD1080020171125

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:
AVD1080020171125

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.

| Inventaris Wob-verzoek W17-09 | | | | | | | | | | |
|-------------------------------|---|-----------------|------|--------|-------|-------------------|--------|--------|------|---|
| nr. | document NTS 20171164 | wordt verstrekt | | | | weigeringsgronden | | | | |
| | | reeds openbaar | niet | geheel | deels | 10.1.c | 10.2.e | 10.2.g | 11.1 | |
| 1 | Aanvraagformulier | | | | x | | x | x | | |
| 2 | NTS | | | x | | | | | | |
| 3 | NTS aangepast | x | | | | | | | | |
| 4 | Projectvoorstel | | | | x | | | x | | |
| 5 | Bijlage animal procedure 1 | | | x | | | | | | |
| 6 | Bijlage animal procedure 2 | | | x | | | | | | |
| 7 | Bijlage animal procedure aangepast | | | x | | | | | | |
| 8 | Ontvangstbevestiging en factuur | | | | x | | x | x | | |
| 9 | DEC advies | | | | x | | x | x | | |
| 10 | Mail verzoek en antwoord aanvullende informatie | | | | x | | x | x | | |
| 11 | Advies CCD | | x | | | | | | | x |
| 12 | Beschikking en vergunning | | | | x | | x | x | | |

24 MAART 2017



Centrale Commissie Dierproeven

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? Ja > Vul uw deelnemernummer in **90700**
 Nee > U kunt geen aanvraag doen
Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.

1.2 Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.
 Naam instelling of organisatie **InnoSer Laboratories**
 Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde **[REDACTED]**
 KvK-nummer **61886890**
 Straat en huisnummer **Zernikedreef** **9**
 Postbus
 Postcode en plaats **2333 CK Leiden**
 IBAN **NL22 ABNA0581 547756**
 Tenaamstelling van het rekeningnummer **[REDACTED]**

1.3 Vul de gegevens van het postadres in.
Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.
 (Titel) Naam en voorletters **[REDACTED]** Dhr. Mw.
 Functie **[REDACTED]**
 Afdeling
 Telefoonnummer **[REDACTED]**
 E-mailadres

1.5 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.
 (Titel) Naam en voorletters **[REDACTED]** Dhr. 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 Dhr. Mw.
- Functie _____
- Afdeling _____
- Telefoonnummer _____
- E-mailadres _____
- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?
- Ja > *Stuur dan het ingevulde formulier Melding Machtiging mee met deze aanvraag*
- Nee

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 1 - 4 - 2017 _____
- Einddatum 31 - 3 - 2022 _____
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Onderzoek naar de biodistributie en de effectiviteit van nieuwe, op oligonucleotiden gebaseerde, teststoffen voor de behandeling van het Hurler syndroom.
- 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 de ziekte van Hurler.
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC DEC Rug/UMCG _____
- Postadres _____
- E-mailadres secrdec.umcg@umcg.nl _____

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1287 Lege
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen. Via een eenmalige incasso
 Na ontvangst van de factuur
- Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*

5 Checklist bijlagen

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

6 Ondertekening

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

Centrale Commissie
 Dierproeven
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondergetekende verklaart:

- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
- dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
- dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
- dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegeven de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
- dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam

Functie

Plaats

Datum

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 de ziekte van Hurler.
- 1.2 Looptijd van het project | 5 jaar
- 1.3 Trefwoorden (maximaal 5) | Biodistributie, kinetiek, Hurler

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) | <p>Het doel van dit project is om te testen of onze, op oligonucleotiden gebaseerde, teststoffen de juiste cellen in de organen van het lichaam bereiken en of er positieve effecten zijn bij muizen die de ziekte van Hurler hebben.</p> <p>Onze teststoffen, oligonucleotiden, richten zich specifiek op de verandering van het RNA, RNA is de voorloper van vele onder andere eiwitten en enzymen. Bij de ziekte van Hurler, is het Mucopolysaccharidose I (MPS I) aangetast (Clarke et al, 2002), het wordt veroorzaakt door veranderingen in DNA van een enzym (Idua). Dit enzym speelt een belangrijke rol bij de afbraak van glycosaminoglycanen (GAGs) in de vetcellen. Bij het syndroom van Hurler stapelen GAG's zich uiteindelijk op in de cellen, waardoor mensen onder andere last hebben van achterlijkheid, botafwijkingen, groeiachterstand, blindheid, hartafwijkingen, slaapproblemen en longstoornissen.</p> <p>Voor het ontwikkelen van nieuwe medicijnen tegen deze ernstige ziekte willen we graag oligonucleotiden testen. Ons oligonucleotidenplatform richt zich specifiek op de verandering van het RNA en met als doel het herstel van de productie/functie van het IDUA enzym en daarmee uiteindelijk het herstellen van de ziekte van Hurler.</p> |
| 3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang? | <p>Het doel van het huidige project is om antwoord te geven op de vraag of onze oligonucleotiden positieve effecten laat zien in het Hurler muis model, dat doen we door het bepalen van de: verdeling en de effecten van onze teststoffen in zowel een wildtype model, als een ziektemodel. Naar aanleiding van de uitkomsten van deze experimenten kunnen we de medicijnen verder het ontwikkelingstraject in helpen en daarmee een bijdrage leveren in de ontwikkeling van nieuwe medicijnen tegen de ziekte van Hurler.</p> |
| 3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt? | <p>1760 muizen in totaal: 800 wildtype muizen 960 Hurler muizen</p> |
| 3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren? | <p>Het welzijn van de dieren wordt aangetast door het feit dat de dieren stoffen krijgen toegediend via verschillende toedieningstechnieken, ook wordt er bloed afgenomen. Waar noodzakelijk wordt ongerief zoveel mogelijk beperkt door anesthesie toe te passen.</p> |
| 3.5 Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst? | <p>100% van de dieren wordt vooraf ingedeeld als matig.</p> |

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 proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.

Proefdiervrije alternatieven kunnen helaas niet worden gebruikt omdat we de gegevens nodig hebben om verder het ontwikkeltraject te komen. Het gehele en intacte dier is noodzakelijk om de effecten van verdeling in het lichaam (de zogenaamde: absorptie, distributie, metabolisme en excretie) in de dieren kaart te brengen. Alle teststoffen worden van tevoren in diverse studies met cellen van patiënten en celmateriaal van het Hurler muis model getest op effectiviteit, toxiciteit en immunogeniciteit.

4.2 **Vermindering**

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

Er worden altijd het maximale aantal dieren gebruikt dat nodig is om een uitspraak te kunnen doen over de lichaamsverdeling van de betreffende stof. We geven maximaal 40 op per experiment, maar zullen waarschijnlijk per stof met minder dieren toe kunnen. De uiteindelijke aantallen zijn nodig om meerdere formuleringen en injectietechnieken toe te kunnen passen.

Iedere wijziging zal worden afgestemd met de IVD alvorens de proef uit te breiden.

4.3 **Verfijning**

Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diermodel(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.

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 er is een relevant ziektemodel (Hurler) beschikbaar, waarmee de vertaalbaarheid naar de mens vergroot wordt.

Vermeld welke algemene maatregelen genomen

Het welzijn van de dieren wordt zorgvuldig gemonitord, de dieren krijgen voldoende water, voer, beddingmateriaal en kooiverrijking. Bovendien worden de dieren gehanteerd door ervaren personen en (indien noodzakelijk) wordt anesthesie

[

worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.

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

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED] We denken hiermee de expressie (en dus functie) van Idua te herstellen en hiermee de onderliggende oorzaak van de ziekte van Hurler aan te pakken.

De chemische modificaties van de oligonucleotiden welke gebruikt zullen worden voor deze RNA-editing benadering zijn al in diverse klinische studies succesvol getest (voornamelijk exon skipping en niet RNA editing) en veilig bevonden na systemische en lokale (oog, CNS, long en spier) toediening.

Clarke LA. *Mucopolysaccharidosis Type I*. 2002 Oct 31 [Updated 2016 Feb 11]. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., editors. *GeneReviews*[®] [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2016. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1162/>

Scott, H. S., Litjens, T., Hopwood, J. J., & Morris, C. P. (1992). A common mutation for mucopolysaccharidosis type I associated with a severe Hurler syndrome phenotype. *Human Mutation*, 1(2), 103–108. <http://doi.org/10.1002/humu.1380010204>

Hein, L. K., Bawden, M., Muller, V. J., Sillence, D., Hopwood, J. J., & Brooks, D. A. (2004). α -L-iduronidase premature stop codons and potential read-through in mucopolysaccharidosis type I patients. *Journal of Molecular Biology*, 338(3), 453–462. <http://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.03.012>

Han, L., Diao, L., Yu, S., Xu, X., Li, J., Zhang, R., ... Liang, H. (2015). The Genomic Landscape and Clinical Relevance of A-to-I RNA Editing in Human Cancers. *Cancer Cell*, 28(4), 515–528. <http://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.08.013>

Hein, L. K., Bawden, M., Muller, V. J., Sillence, D., Hopwood, J. J., & Brooks, D. A. (2004). α -L-iduronidase premature stop codons and potential read-through in mucopolysaccharidosis type I patients. *Journal of Molecular Biology*, 338(3), 453–462. <http://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.03.012>

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 of onze testcompound positieve effecten laat zien in het Hurler muis model specifiek voor de p.Trp402X mutatie (Wang et al., 2010; Wang et al., 2012).

De studies in muizen zijn essentieel voor het bepalen van de: biodistributie, farmacokinetiek en daarmee de effectieve dosering van onze teststoffen voor verder klinisch onderzoek in Hurler patiënten.

De studies zijn haalbaar omdat we beschikken over de juiste capaciteiten, er is een geschikt laboratorium (AAALAC geaccrediteerd), al ons personeel voldoet aan de geldende wet en regelgeving en we zorgen dat we continu getraind worden. De verschillende (deel)studies zijn qua aantallen goed uit te voeren en haalbaar binnen de grenzen van dit project.

Wang D, Belakhov V, Kandasamy J, Baasov T, Li SC, Li YT, et al. The designer aminoglycoside NB84 significantly reduces glycosaminoglycan accumulation associated with MPS I-H in the Idua-W392X mouse. Mol Genet Metab. 2012;105(1):116–25.

Wang D, Shukla C, Liu X, Schoeb TR, Clarke LA, Bedwell DM, et al. Characterization of an MPS I-H knock-in mouse that carries a nonsense mutation analogous to the human IDUA-W402X mutation. Mol Genet Metab. 2010 Jan;99(1):62–71.

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 ziekte van Hurler, het gaat om 1:100.000 geboren kinderen met zeer ernstige afwijkingen, een lage kwaliteit van leven en een beperkte levensverwachting.

Momenteel zijn er twee behandelmethodeën: stamcel therapieën, of toediening van het zuivere enzym (Idua). Stamceltherapie is echter niet zonder gevaren en wordt mede daarom niet vaak uitgevoerd. Het enzym zal na systemische toediening niet de hersenen bereiken omdat **het eiwit te groot is om de bloed-hersen barrière te passeren** en zal voor de meeste patiënten daarom een beperkt effect hebben.

Deze twee redenen zijn aanleiding om het huidige onderzoek te starten en op zoek te gaan naar een betere behandeling, een die niet afhankelijk is van het passeren van de bloed-hersen barrière, maar om de expressie van Idua te herstellen op RNA niveau. [REDACTED]

3.4 Onderzoeksstrategie

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

Het project beoogt in dit stadium antwoord te geven op de vraag in welke doseringsvorm, dosis, frequentie/regime en in welke tijdsperiode de grootste effecten van onze teststof worden gezien.

We zoeken in de aanvraag bepaalde vrijheidsgraden omdat we op zoek zijn naar de beste toedieningswijze/toedieningsgraad van ons nieuwe product. In vitro weten we dat deze techniek werkt en hebben we een aantal kandidaat stoffen gevonden. De translatie naar in vivo is essentieel omdat de distributie en opnamen van oligonucleotiden in vivo anders zijn dan in vitro. In vitro wordt vaak een transfectie reagent gebruikt, in vivo kunnen we die niet gebruiken door hun hoge mate van toxiciteit, daarom willen we onderzoeken wat in vivo de beste toedieningswijze is. Daarbij starten we basaal: zien we een verschil in lokale of systemische toediening? Zien we een verschil tussen verschillende formuleringen? Ook hierbij is het noodzakelijk dat we hier onderzoek kunnen doen teneinde ons product verder te ontwikkelen. Het kan voorkomen dat we bijvoorbeeld een

goed werkend product hebben waarbij we willen bestuderen of een slow-release formulering uiteindelijk lokaal/of systemisch (dat willen we onderzoeken) nog betere effecten laat zien. Het weloverwogen traject ontwikkelt zich tijdens de medicijnontwikkeling, niet iedere stap wordt van tevoren uitgeschreven, er is geen wet van meden en perzen. In aanvulling hierop, om uiteindelijk een product geregistreerd te krijgen is het verkrijgen van deze data essentieel. De EMA geeft aan dat er geen consistentie is in het veld, echter wel dat het noodzakelijk informatie op kan leveren voor de rest van het dossier.

http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002771.pdf.

(0) De effectiviteit en toxiciteit van de teststoffen wordt altijd eerst *in vitro* getest voordat er naar bio distributie gekeken wordt. Daarvoor worden o.a. patiënten cellen, maar ook embryonale stamcellen van de Idua-W392X muis (met een mutatie analoog aan de *p.Trp402X* mutatie in mensen, zie Wang et al, 2010/2012 hierboven) gebruikt, deze data is beschikbaar, maar vertrouwelijk.

(1) Daarna wordt de biodistributie en opname van fluorescent-gelabelde teststoffen bepaald in wildtype muizen; (2) vervolgens kijken we naar de biodistributie in ons Hurler model.

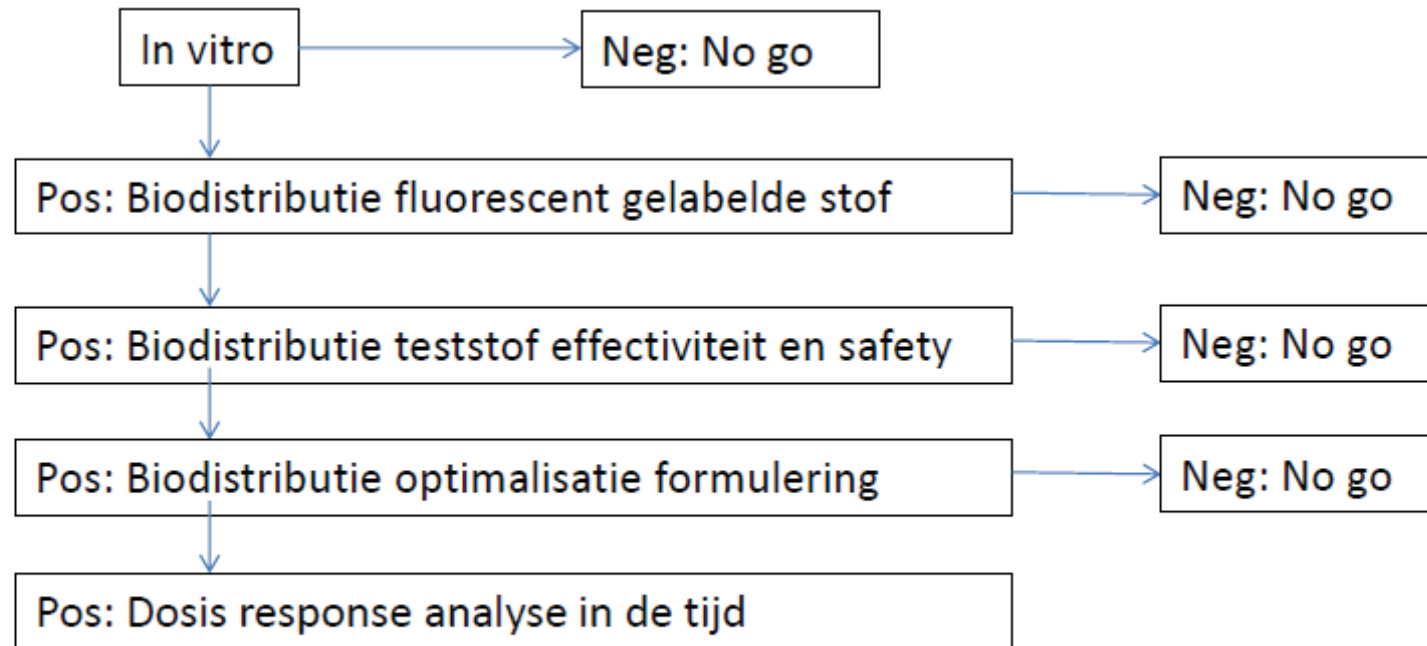
(3) Eerst worden de effecten van een enkele hoge dosering van onze teststof waarbij we op verschillende tijdstippen muizen opofferen; (4) vervolgens kijken we of we een dose-response curve kunnen maken op het optimale tijdpunt na dosering en aansluitend willen we meten wat het effect is van herhaalde doseringen.

Er is een flowdiagram bijgevoegd als pdf aan de protocollen.

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 viertal studies binnen het project beogen om uit alle geteste methoden de beste methode te destilleren die we kunnen gaan gebruiken in de verder ontwikkeling van het huidige oligonucleotide model. Zie hiervoor het flowdiagram:

1. -Biodistributie in wildtype muizen met fluorescent gelabelde stof;
2. -Biodistributie/kinetiek en safety in Hurler muizen;
3. -Biodistributie optimalisatie formulering;
4. -Dosis-respons optimalisatie in de tijd.



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 en effectiviteit van dezelfde nieuwe oligonucleotide teststoffen voor Hurler. De biodistributie zal worden bestudeerd door middel van histologie: detectie van fluorescent-gelabelde teststoffen, in-situ hybridisatie – en analytische methodes zoals HPLC. De effectiviteit zal worden bepaald in weefsels d.m.v. moleculaire en biochemische assays zoals digital droplet PCR, next-generation

sequencing en Western Blot. Daarnaast zal de enzymatische activiteit van Idua ex vivo worden bepaald. Ten slotte zal d.m.v. histologische analyse van diverse organen de opstapeling van GAGs worden bepaald.

In principe zal de samenhang grotendeels als volgt zijn:

Voor deze studies wordt er eerst in diverse in vitro studies gekeken naar de effectiviteit van de teststoffen in cellijnen van patiënten en embryonale fibroblasten van de Idua-W392X muis. Vervolgens zal ook gekeken worden naar toxiciteit en immunogeniciteit (in vitro) van deze teststoffen.

1. Als eerste wordt bepaald welke toedieningsmethode en formulering zich het beste leent voor de ontwikkeling. We starten hierbij eerst met een studie met een fluorescent-gelabelde teststof waarbij we in wildtype muizen de stof kunnen lokaliseren na toediening. Indien we de stof niet kunnen lokaliseren zullen we niet verder gaan, dit is een duidelijke no-go;
2. Ten tweede zullen we in de Idua-W392X muis een enkele relatief hoge, maar veilige, dosering testen waarbij we diverse weefsels zoals lever, hersenen, nieren, oog (retina) op verschillende tijdstippen willen isoleren om te kijken op welk tijdstip na dosering de effectiviteit het hoogste is en of er sprake is van een 'wash-out' van het effect periode en of er sprake is van een safety risico. Aan de hand van deze resultaten zullen we vaststellen of er een optimaal tijdstip is na doseren. Er is gekozen voor deze weefsels, want daar is de expressie van de ADAR enzymen het hoogst en zijn belangrijke doelwitorganen bij Hurler.
3. Ten derde zullen we op het optimale tijdstip de formuleringen optimaliseren, dan bekijken we of dezelfde, of liever een lagere concentratie in een ander vehicle of een andere toedieningstechniek betere effecten laat zien.
4. Ten vierde zullen we een meervoudige dosis-response relatie vastleggen, meerdere doseringen variërend in de tijd, om zo te kijken of de effecten vergoten of wat het maximale effect van de test stoffen is.

Bovengenoemde experimenten worden verdeeld in twee typen dierproef:

- 1) Studies met Wildtype muizen; deze worden gebruikt voor bio distributie en als positieve controle (aanwezigheid en functie Idua);
- 2) Studies met Hurler muizen (Idua-W392X muis).

Voor het beantwoorden van de vraag of onze testcompound positieve effecten laat zien in het Hurler muis model, hebben we de Hurler muis nodig. Vooraf vinden wij het essentieel om te weten of onze stof bij de beoogde organen komt. We meten daarbij de fluorescentie in een fluorescente muis. Indien we lokaal geen effecten zien op fluorescentie dan hoeven we geen experiment uit te voeren met het Hurler muis model. Omdat dit laatste model in potentie een hogere kans op ongerief heeft hebben we deze route gekozen. Hiermee doen we relatief meer studies

met het fluorescente model en minder met het Hurler model. De eerste is echter een veel nauwkeuriger en bovendien snellere meting en essentieel voor de selectie van onze stof in ons uiteindelijke ziektemodel. Bijlage I biedt ons de mogelijkheid relatief snel veel te testen, waarbij bijlage II meer voor een fase verder in het onderzoek is waarbij we ons richten op de effectiviteit.

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

| Volgnummer | Type dierproef |
|------------|---|
| 1 | Fluorescentie studie in wildtype muizen |
| 2 | Doseerstudies in Hurler muizen. |
| 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 | Fluorescentie studie in de wildtype 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.

De dieren krijgen de fluorescente gelabelde oligonucleotiden 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 de fluorescente 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);

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

Indien we de fluorescent-gelabelde teststof niet kunnen lokaliseren na toediening is dit een no-go, dan gaan we niet verder.

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 fluorescente gelabelde teststoffen via verschillende toedieningswijzen, we willen verschillende toedieningswijzen testen omdat Idua een belangrijke rol speelt in diverse weefsels en organen en daarom bestaat de kans dat er naast systemische toediening er ook lokale toedieningen worden getest (direct in de hersenen en het oog). Dit doen we om een beeld te krijgen van de beste doseringsstrategie van de oligonucleotiden.

In onderstaande tabel worden de verschillende technieken benoemd.

| Nr. | Aard | Duur | Frequentie | Ongeriefinschatting |
|--------------------------|--|-------|-------------|---------------------|
| <u>Toedieningswijzen</u> | | | | |
| 1 | IV injectie | 2 min | <u>1-28</u> | <u>2-3</u> |
| 2 | Intranasaal doseren | 1 min | <u>1-28</u> | <u>3</u> |
| 3 | Subcutaan injectie | 1min | <u>1-28</u> | <u>2-3</u> |
| 4 | Long toediening | 1min | <u>1-28</u> | <u>2-3</u> |
| 5 | Intravitreaal | 1 min | <u>1</u> | <u>3</u> |
| 6 | Intracerebrale injecties | 3 min | <u>1</u> | <u>3</u> |
| 7 | Intrathecale injecties | 3 min | <u>1</u> | <u>3</u> |
| <u>Afname technieken</u> | | | | |
| 8 | Bloedafname (Wangplexus) | 1 min | <u>1-4</u> | <u>2</u> |
| 9 | Bloedafname (Staartvene) | 1 min | <u>1-4</u> | <u>2</u> |
| 10 | Terminale bloedafname onder anesthesie | 1 min | <u>1</u> | <u>2</u> |
| <u>Andere technieken</u> | | | | |
| 11 | Huisvesten in metabolisme kooi | 4 uur | <u>1-2</u> | <u>2</u> |
| 12 | 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 dagelijks te doseren, we schatten het ongerief in op matig, middels naregistratie zal alles dat minder dan 10x wordt gedoseerd zonder verdoving ingeschat worden als gering.

Intranasaal, intravitreaal, intracerebrale en intrathecale toediening zal onder anesthesie gebeuren, vandaar een hogere ongeriefinschatting.

Na maximaal 28 dagen worden de dieren opgeofferd en wordt bekeken waar de teststof wordt gelokaliseerd.

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

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 vervolgstudies. Gegevens van ieder stadium van de dierproef worden gebruikt om het aantal dieren per groep te bepalen voor het volgende stadium. We gaan ongeveer 4 muizen per tijdstip doseren en onderzoeken, dat is uit een internationale referentie voortgekomen getal (Ette, E. I., Kelman, A. W., Howie, C. A., & Whiting, B. (1995). Analysis of animal pharmacokinetic data: Performance of the one point per animal design. Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics, 23(6), 551–566. <http://doi.org/10.1007/BF02353461>). Verder verwachten we 2-3 groepen nodig te hebben om een optimale formulering te definiëren, en we hebben 3 doseringslevels en we verwachten 5-6 tijdstippen nodig te hebben voor een kinetiek inschatting.

In totaal komen we hiermee op 3 (formuleringen x 4 muizen) + 6 (tijdstippen op de beoogde dosering) x 4 (muizen) dan 4 (muizen) x 4 (doseringen: 0, laag, midden hoog). Totaal komen we dan op $12+24+16 = 52$ dieren. Omdat we verwachten dat formuleringen vaak vrij standaard zijn (saline/PBS) en er soms minimale effecten te verwachten zijn en we een keuze theoretisch al kunnen maken vermoeden we toch met 40 dieren toe te kunnen komen.

Deze aantallen zullen per experiment onderbouwd worden doormiddel van powercalculaties en vooraf met de IvD afgestemd worden. In 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).

B. De dieren

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

De muis zal waar mogelijk surplus uit eigen fok zijn, wildtypes (C57Black6J) waar geen experiment mee gedaan kan worden, of ze zullen worden besteld bij een proefdierleverancier. De muizen zullen tussen de 10 en 30 weken leeftijd worden gebruikt. 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). Er is geen sexe voorkeur, beide sexen kunnen worden gebruikt.

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.

Voor de start van de experimenten wordt zoveel mogelijk informatie uit in vitro data gehaald, dat kan uit humaan weefsel of celkweek zijn en zal bestaan uit: opname van de teststof door de cellen, functionele effecten, toxiciteit en immunogeniciteit.

Met betrekking tot het experiment zelf 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. Dat leidt uiteindelijk tot een weloverwogen traject dat doorlopen wordt, er wordt niet alles getest met slechts een formulering, en slechts een dosering, we 'testen niet om te testen', in die zin hopen we aan vermindering bij te dragen.

Omdat de ziekte van Hurler op zoveel plaatsen in het organisme effecten kan hebben is alleen het meten van GAG in urine niet toereikend. Daarnaast bestaat het vermoeden dat een meetbare verandering van GAG levels in Urine na interventie lastig te behalen is, al zijn we het met de DEC eens dat dit ook de voorkeur heeft, zeker voor de translatie naar de kliniek. Een correlatie tussen urine waarden en bepaalde mate van herstel, bereikt door onze therapie, is nog niet bekend. Het is meer waarschijnlijk dat onze therapie lage levels van Idua eiwit kan herstellen – welke voornamelijk op moleculair, biochemisch of m.b.v. histologische assays bepaald kan worden. Hiervoor hebben we weefsels nodig. Juist door het combineren van verschillende functionele / semi-functionele assays op weefsels van hetzelfde dier zijn we tot een vermindering van het beoogde aantal muizen gekomen.

We zullen de dieren daarnaast zo goed als mogelijk met de laatste technieken qua anesthesie behandelen indien anesthesie noodzakelijk is.

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 noodzakelijk voor het in kaart brengen van de biodistributie van fluorescente oligonucleotiden (met als doel ADAR-

gemedieerde RNA-editing), 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 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.

In sporadisch gevallen is het mogelijk dat meervoudige doseringen tot bijvoorbeeld ontstekingen leiden, zodra er een zichtbare ontsteking is of als de dieren > 20% afnemen in gewicht in een week tijd worden de dieren uit de proef genomen. Humane eindpunten worden ook bij de dagelijkse verzorging gemonitord, we werken louter met bevoegd en bekwaam personeel dat zich houdt aan de interne afspraken. Hieronder zijn er toedieningswijze een of meerdere humane eindpunten gedefinieerd.

| Nr. | Aard | Duur (Min) | Frequentie | Ongeriefschatting | Humane eindpunten |
|-------------------|---------------------|------------|------------|-------------------|--|
| Toedieningswijzen | | | | | |
| 1 | IV injectie | 2 | 1-28 | 2-3 | De verwachting is bij herhaaldelijk injecteren dat er geen effecten te zien zullen zijn. Indien dieren een hematoom ontwikkelen door veelvuldig aanprikken zullen we de dieren offeren. |
| 2 | Intranasaal doseren | 1 | 1-28 | 3 | Dit gebeurt onder anesthesie en de stof wordt toegediend via de 'eigen' ademhaling, we verwachten hier geen humaan eindpunt mee te bereiken. Indien een dier onverhoopt in ademnood komt zullen we de dosering stoppen en het dier bij laten komen en later nogmaals doseren. Indien we daar hetzelfde zien zullen we het dier uit de proef nemen. |
| 3 | Subcutaan injectie | 1 | 1-28 | 2-3 | Hier verwachten we geen humaan eindpunt te bereiken. Indien we meerdere injecties toepassen zal iedere volgende injectie op een andere zijde (links of rechts) worden gezet. |
| 4 | Long toediening | 1 | 1-28 | 2-3 | Dit is een toediening via een nebulizer en hier hebben we goede ervaringen mee. We verwachten hier geen uitval noch een humaan eindpunt. |
| 5 | Intravitreaal | 1 | 1 | 3 | Dit is een eenmalige toediening onder anesthesie, hier verwachten we door de frequentie geen humane eindpunten. Indien er een infectie optreedt in het oog zal het dier onmiddellijk worden geofferd, zodra bij de injectie al duidelijk is dat het niet goed gaat, als het glasvocht er bijvoorbeeld uit loopt dan wordt het dier onmiddellijk geofferd. Komen we tijdens de dagelijkse controles erachter dat dieren blind raken dan nemen we de dieren uit voorzorg uit de proef. |

| | | | | | |
|----|--------------------------|---|------|---|---|
| 6 | Intracerebrale injecties | 3 | 1 | 3 | Hier verwachten we geen humaan eindpunt te bereiken. Dit wordt onder anesthesie uitgevoerd en hiervoor is uitvoerig getraind om de juiste lokalisatie in de hersenen te vinden. Zodra we tekenen van geheel of gedeeltelijk verlamming constateren dan wordt het dier geofferd, indien we ataxie constateren zullen we de dieren intensiever dan dagelijks volgen, indien wij het idee hebben dat het dier meer dan matig ongerief ervaart zullen het afvoeren. |
| 7 | Intrathecale injecties | 3 | 1 | 3 | Hier verwachten we geen humaan eindpunt te bereiken. Dit wordt onder anesthesie uitgevoerd en hiervoor is uitvoerig getraind om de juiste lokalisatie in het ruggenmerg te vinden. Hier kunnen we na het ontwaken uit narcose onmiddellijk waarnemen of een dier niet goed geïnjecteerd is. Zodra we tekenen van (geheel of gedeeltelijke) verlamming constateren dan wordt het dier geofferd. |
| | Andere technieken | | | | |
| 8 | Wegen | 1 | 1-28 | 2 | Geen humaan eindpunt. |
| 9 | Beeldvorming | 1 | 1-28 | 2 | Geen, dit is het imagen onder anesthesie. |
| 10 | Anesthesie | 1 | 4-8 | 2 | Geen, echter anesthesie in het algemeen kan voor ademhalingsproblemen zorgen tijdens de anesthesie. Afhankelijk wat er gebeurt kan de hoeveelheid O2 iets worden aangepast. Na afloop zal de muis rustig bijkomen, de verwachting is niet dat hierbij een humaan eindpunt optreedt. |

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

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 moeten 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. | 90700 | |
| 1.2 | Vul de naam van de instelling of organisatie in. | InnoSer Laboratories | |
| 1.3 | Vul het volgnummer en het type dierproef in. | Volgnummer | Type dierproef |
| | | 2 | Doseerstudie Hurler 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 nieuwe oligonucleotiden in de Hurler muis. De Hurler muis, ofwel de Idua-W392X muis (Wang et al., 2010) is een muis met een afwijking in het Idua gen. Deze mutatie in de muis is analoog aan de p.Trp 402X mutatie in patienten met Hurler en een van de weinige beschikbare modellen voor dit ziektebeeld.

Deze muizen worden gedoseerd met verschillende formuleringen, toedieningswijze op verschillende tijdstippen.

De muizen krijgen de stof een- of meermalig toegediend via een specifiek geselecteerde methode op basis van de verwachtingen en vervolgens wordt er een analyse gedaan naar de effecten. Het experiment bestaat telkens uit dezelfde soort handelingen met 4 doelen:

1. Bepalen van de dosering waarbij optimale effecten worden bereikt d.m.v. diverse moleculaire, biochemische, enzymatische en histologische assays welke zowel de correctie op het RNA niveau (moleculair), Idua eiwit niveau en GAG levels (biochemisch) en de functie van Idua (enzymatisch,

- histologisch en functioneel) kunnen meten;
- 2. Bepaling van de optimale toedieningsroute;
- 3. Biodistributie van de nieuwe oligonucleotiden;

De uitleesparameters zijn als volgt:

Moleculair: Idua mRNA kwantificering en sequencing in diverse weefsels

Enzymatisch: Idua assay in weefsel

Biochemisch:

-Eiwit expressie van Idua;

-GAG bepaling in urine;

-GAG bepaling in weefsel;

Histologie: onderzoeken of cytoplasmische inclusie plaats hebben gevonden;

Functioneel:

-Morfologische afwijkingen;

-Gezichtskenmerken;

-Botontwikkeling in de Femur;

-Botmineraaldichtheid;

Aan de hand van de uitkomstparameters worden verdere stappen in de ontwikkeling tot een nieuw medicijn gedaan, dat kan zijn een andere toedieningswijze en/of andere formulering, zodanig dat de oligonucleotide zijn maximale effect heeft zodat er verder gegaan kan worden in het preklinisch traject naar de betreffende aandoening.

Dit type dierproef bestaat uit drie onderdelen:

1. Een enkele dosering wordt getest waarbij we de weefsels op verschillende tijdstippen willen isoleren om te kijken wat het beste tijdstip is en of er sprake is van een wash-out periode; De tijdstippen zijn gebaseerd op *in vitro* studies en eerdere bio distributiestudies met soortgelijke oligonucleotiden teststoffen waar een relatief hoge halfwaardetijd in weefsels was gevonden. Deze tijdstippen zijn o.a.: 24hr, 48hr, 7 en 14 dagen.

2. Pas daarna wordt een dosis-respons relatie gelegd op het optimale tijdstip, hierbij worden diverse doses getest (laag-middel-hoog) en proberen we tot een optimale doseringsvorm te komen;

3. Als laatste zullen we een meervoudige dosis-response relatie vastleggen, meerder doseringen variërend in de tijd. De meervoudige dosering zal gebaseerd zijn op de optimale dose (zie 2 hierboven) en de stabiliteit/effectiviteit in weefsels.

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. De toedieningswijzen zijn grotendeels gebaseerd op de uitkomsten van dierproef 1, omdat die uitkomsten onbekend zijn noemen we hier alle mogelijkheden op, dit is een veelvoud van hetgeen we in de praktijk waarschijnlijk gaan testen.

In onderstaande tabel worden de verschillende technieken benoemd.

| Nr. | Aard | Duur | Frequentie | Ongeriefinschatting |
|-----|--|-------|-------------|---------------------|
| | <u>Toedieningswijzen</u> | | | |
| 1 | IV injectie | 2 min | <u>1-28</u> | <u>2-3</u> |
| 2 | Intranasaal doseren | 1 min | <u>1-28</u> | <u>3</u> |
| 3 | Subcutaan injectie | 1min | <u>1-28</u> | <u>2-3</u> |
| 4 | Long toediening | 1min | <u>1-28</u> | <u>2-3</u> |
| 5 | Intravitreaal | 1 min | <u>1</u> | <u>3</u> |
| 6 | Intracerebrale injecties | 3 min | <u>1</u> | <u>3</u> |
| 7 | Intrathecale injecties | 3 min | <u>1</u> | <u>3</u> |
| | <u>Afname technieken</u> | | | |
| 8 | Bloedafname (Wangplexus) | 1 min | <u>1-4</u> | <u>2</u> |
| 9 | Bloedafname (Staartvene) | 1 min | <u>1-4</u> | <u>2</u> |
| 10 | Terminale bloedafname onder anesthesie | 1 min | <u>1</u> | <u>2</u> |
| | <u>Andere technieken</u> | | | |
| 11 | Huisvesten in metabolisme kooi | 4 uur | <u>1-2</u> | <u>2</u> |
| 12 | 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 dagelijks te doseren, maar dat zal lang niet altijd gelden. Intranasaal, intravitreaal, intracerebrale en intrathecale toediening zal onder anesthesie gebeuren, vandaar een hogere ongeriefinschatting. Indien een toediening vaker dan 10x wordt uitgevoerd zullen we deze naregistreren als matig, dat zal niet altijd het geval zijn, indien het minder dan 10x is zal het als gering worden geregistreerd.

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 twee technieken wang of staart.

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

Wang D, Shukla C, Liu X, Schoeb TR, Clarke LA, Bedwell DM, et al. Characterization of an MPS I-H knock-in mouse that carries a nonsense mutation analogous to the human IDUA-W402X mutation. *Mol Genet Metab.* Jan;99(1):62–71 (2010) .

Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M and Vorstenbosch C. A Good Practice Guide to the Administration of Substances and Removal of Blood, Including Routes and Volumes. *J. Appl. Toxicol.* 21, 15–23 (2001).

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

Er zijn diverse kwantitatieve uitleesparameters [GAGs in urine en weefsels, histologische scores, botdichtheid en moleculaire/biochemische parameters] welke gebruikt kunnen worden voor statistische onderbouwing van de groepsgroottes. Een pilot studie waarbij de verschillen van diverse uitleesparameters tussen muizen met de IDUA mutatie en gezonde nestgenoten worden vergeleken zal inzicht geven in de groepsgrootte

voor de studies.

We gaan ongeveer 4 muizen per tijdstip doseren en onderzoeken, dat is uit een internationale referentie voortgekomen getal (Ette, E. I., Kelman, A. W., Howie, C. A., & Whiting, B. (1995). Analysis of animal pharmacokinetic data: Performance of the one point per animal design. Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics, 23(6), 551–566. <http://doi.org/10.1007/BF02353461>). Verder verwachten we 2-3 groepen nodig te hebben om een optimale formulering te definiëren, en we hebben 3 doseringslevels en we verwachten 5-6 tijdstippen nodig te hebben voor een kinetiek inschatting.

In totaal komen we hiermee op 3 (formuleringen x 4 muizen) + 6 (tijdstippen op de beoogde dosering) x 4 (muizen) dan 4 (muizen) x 4 (doseringen: 0, laag, midden hoog). Totaal komen we dan op 12+24+16 = 52 dieren. Omdat we verwachten dat formuleringen vaak vrij standaard zijn (saline/PBS) en er soms minimale effecten te verwachten zijn en we een keuze theoretisch al kunnen maken vermoeden we toch met 40 dieren toe te kunnen komen.

Gegevens van elk 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.

B. De dieren

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

De Hurler muis heeft een 'nonsense' mutatie op het Idua codon (analoog aan humane p.Trp 402X mutatie) en is daarmee het ideale model voor de ziekte van Hurler. Deze muizen ondervinden gering ongerief door de aangebrachte modificatie, de muizen zijn vitaal en vruchtbaar, er is sprake van verdikking van de femur na 15 weken en de botdichtheid is verhoogd na 35 weken. De levensverwachting is 69 weken, dat is korter dan wildtype muizen (uit de Jax database), mede daarop baseren wij het verwachtte ongerief van gering.

Voor de behandeling zullen voornamelijk muizen tussen de 10 en 30 weken gebruikt worden, omdat in dit stadium de GAG ophoping in weefsels en excretie in de urine significant verschillend is ten opzichte van gezonde muizen.

Daarnaast ligt de overlevingskans tot 30 weken rond de 90% (Wang et al., 2010). Op basis van soortgelijke studies, verwachten we per jaar 6 studies uit te voeren met gemiddeld 40 dieren per studie. Over een periode van 5 jaar zijn dit 960 dieren. Specifieke aantallen per experiment zullen met de IvD worden afgestemd en zullen worden onderbouwd d.m.v. power calculaties.

(Wang D, Shukla C, Liu X, Schoeb TR, Clarke LA, Bedwell DM, et al. Characterization of an MPS I-H knock-in mouse that carries a nonsense mutation analogous to the human IDUA-W402X mutation. Mol Genet Metab. 2010;99: 62–71).

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.

Qua monitoring zal van de dieren worden bijgehouden hoeveel bloed er is afgenomen en er geen maximale waarden (Diehl et al., 2001) worden overschreden.

Voor de start van de experimenten wordt zoveel mogelijk informatie uit in vitro data gehaald, dat kan uit humaan weefsel of celkweek zijn waarbij gebruik zal worden gemaakt met embryonale fibroblasten van de Hurler muis, pas daarna worden alle vervolgstappen genomen om zo min mogelijk dieren te gebruiken.

Met betrekking tot het experiment zelf 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. Dat leidt uiteindelijk tot een weloverwogen traject dat doorlopen wordt, er wordt niet alles getest met een formulering, en een dosering, we 'testen niet om te testen', in die zin hopen wij ook aan vermindering bij te dragen. Mede door de uitkomsten uit dierproef 1 in te zetten verwachten we minder dieren met het ziektemodel te gebruiken.

Omdat de ziekte van Hurler op zoveel plaatsen in het organisme effecten kan hebben is alleen het meten van GAG in urine niet toereikend. Daarnaast bestaat het vermoeden dat een meetbare verandering van GAG levels in Urine na interventie lastig te behalen is, al zijn we het met de DEC eens dat dit ook de voorkeur heeft, zeker voor de translatie naar de kliniek. Een correlatie tussen urine waardes en bepaalde mate van herstel, bereikt door onze therapie, is nog niet bekend. Het is meer waarschijnlijk dat onze therapie lage levels van Idua eiwit kan herstellen – welke voornamelijk op moleculair, biochemisch of m.b.v. histologische assays bepaald kan worden. Hiervoor hebben we weefsels nodig. Juist door het combineren van verschillende functionele / semi-functionele assays op weefsels van hetzelfde dier zijn we tot een vermindering van het beoogde aantal muizen gekomen.

We zullen de dieren daarnaast de laatste technieken qua anesthesie gebruiken (indien anesthesie noodzakelijk).

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 noodzakelijk voor het in kaart brengen van de effecten op een model voor de ziekte van Hurler met 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 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.

In sporadisch gevallen is het mogelijk dat meervoudige doseringen tot bijvoorbeeld ontstekingen leiden, zodra er een zichtbare ontsteking is of als de dieren > 20% afnemen in gewicht in een week tijd worden de dieren uit de proef genomen. Humane eindpunten worden ook bij de dagelijkse verzorging gemonitord, we werken louter met bevoegd en bekwaam personeel dat zich houdt aan de interne afspraken. Hieronder zijn er toedieningswijze een of meerdere humane eindpunten gedefinieerd.

| Nr. | Aard | Duur (Min) | Frequentie | Ongerief-inschatting | Humane eindpunten |
|-------------------|---------------------|------------|------------|----------------------|--|
| Toedieningswijzen | | | | | |
| 1 | IV injectie | 2 | 1-28 | 2-3 | De verwachting is bij herhaaldelijk injecteren dat er geen effecten te zien zullen zijn. Indien dieren een hematoom ontwikkelen door veelvuldig aanprikken zullen we de dieren offeren. |
| 2 | Intranasaal doseren | 1 | 1-28 | 3 | Dit gebeurt onder anesthesie en de stof wordt toegediend via de 'eigen' ademhaling, we verwachten hier geen humaan eindpunt mee te bereiken. Indien een dier onverhoopt in ademnood komt zullen we de dosering stoppen en het dier bij laten komen en later nogmaals doseren. Indien we daar hetzelfde zien zullen we het dier uit de proef nemen. |
| 3 | Subcutaan injectie | 1 | 1-28 | 2-3 | Hier verwachten we geen humaan eindpunt te bereiken. Indien we meerdere injecties toepassen zal iedere volgende injectie op een andere zijde (links of rechts) worden gezet. |
| 4 | Long toediening | 1 | 1-28 | 2-3 | Dit is een toediening via een nebulizer en hier hebben we goede ervaringen mee. We verwachten hier geen uitval noch een humaan eindpunt. |
| 5 | Intravitreaal | 1 | 1 | 3 | Dit is een eenmalige toediening onder anesthesie, hier verwachten we door de frequentie geen humane eindpunten. Indien er een infectie optreedt in het oog zal het dier onmiddellijk worden geofferd, zodra bij de injectie al duidelijk is dat het niet goed gaat, als het glasvocht er bijvoorbeeld uit loopt dan wordt het dier onmiddellijk geofferd. Komen we tijdens de dagelijkse controles erachter dat dieren blind raken dan nemen we de dieren uit voorzorg uit |

| | | | | | |
|-------------------|--------------------------|---|------|---|---|
| | | | | | de proef. |
| 6 | Intracerebrale injecties | 3 | 1 | 3 | Hier verwachten we geen humaan eindpunt te bereiken. Dit wordt onder anesthesie uitgevoerd en hiervoor is uitvoerig getraind om de juiste lokalisatie in de hersenen te vinden. Zodra we tekenen van geheel of gedeeltelijk verlamming constateren dan wordt het dier geofferd, indien we ataxie constateren zullen we de dieren intensiever dan dagelijks volgen, indien wij het idee hebben dat het dier meer dan matig ongerief ervaart zullen het afvoeren. |
| 7 | Intrathecale injecties | 3 | 1 | 3 | Hier verwachten we geen humaan eindpunt te bereiken. Dit wordt onder anesthesie uitgevoerd en hiervoor is uitvoerig getraind om de juiste lokalisatie in het ruggenmerg te vinden. Hier kunnen we na het ontwaken uit narcose onmiddellijk waarnemen of een dier niet goed geïnjecteerd is. Zodra we tekenen van (geheel of gedeeltelijke) verlamming constateren dan wordt het dier geofferd. |
| Andere technieken | | | | | |
| 8 | Wegen | 1 | 1-28 | 2 | Geen humaan eindpunt. |
| 9 | Beeldvorming | 1 | 1-28 | 2 | Geen, dit is het imagen onder anesthesie. |
| 10 | Anesthesie | 1 | 4-8 | 2 | Geen, echter anesthesie in het algemeen kan voor ademhalingsproblemen zorgen tijdens de anesthesie. Afhankelijk wat er gebeurt kan de hoeveelheid O2 iets worden aangepast. Na afloop zal de muis rustig bijkomen, de verwachting is niet dat hierbij een humaan eindpunt optreedt. |

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

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. | 90700 | | | | |
|------------|--|---|------------|----------------|---|---------------------------|
| 1.2 | Vul de naam van de instelling of organisatie in. | InnoSer Laboratories | | | | |
| 1.3 | Vul het volgnummer en het type dierproef in. | <table border="1"> <thead> <tr> <th>Volgnummer</th> <th>Type dierproef</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2</td> <td>Doseerstudie Hurler muis.</td> </tr> </tbody> </table> | Volgnummer | Type dierproef | 2 | Doseerstudie Hurler muis. |
| Volgnummer | Type dierproef | | | | | |
| 2 | Doseerstudie Hurler 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 nieuwe oligonucleotiden in de Hurler muis. De Hurler muis, ofwel de Idua-W392X muis (Wang et al., 2010) is een muis met een afwijking in het Idua gen. Deze mutatie in de muis is analoog aan de p.Trp 402X mutatie in patienten met Hurler en een van de weinige beschikbare modellen voor dit ziektebeeld.

Deze muizen worden gedoseerd met verschillende formuleringen, toedieningswijze op verschillende tijdstippen.

De muizen krijgen de stof een- of meermalig toegediend via een specifiek geselecteerde methode op basis van de verwachtingen en vervolgens wordt er een analyse gedaan naar de effecten. Het experiment bestaat telkens uit dezelfde soort handelingen met 4 doelen:

1. Bepalen van de dosering waarbij optimale effecten worden bereikt d.m.v. diverse moleculaire, biochemische, enzymatische en histologische assays welke zowel de correctie op het RNA niveau (moleculair), Idua eiwit niveau en GAG levels (biochemisch) en de functie van Idua (enzymatisch,

- histologisch en functioneel) kunnen meten;
- 2. Bepaling van de optimale toedieningsroute;
- 3. Biodistributie van de nieuwe oligonucleotiden;

De uitleesparameters zijn als volgt:

Moleculair: Idua mRNA kwantificering en sequencing in diverse weefsels

Enzymatisch: Idua assay in weefsel

Biochemisch:

-Eiwit expressie van Idua;

-GAG bepaling in urine;

-GAG bepaling in weefsel;

Histologie: onderzoeken of cytoplasmische inclusie plaats hebben gevonden;

Functioneel:

-Morfologische afwijkingen;

-Gezichtskenmerken;

-Botontwikkeling in de Femur;

-Botmineraaldichtheid;

Aan de hand van de uitkomstparameters worden verdere stappen in de ontwikkeling tot een nieuw medicijn gedaan, dat kan zijn een andere toedieningswijze en/of andere formulering, zodanig dat de oligonucleotide zijn maximale effect heeft zodat er verder gegaan kan worden in het preklinisch traject naar de betreffende aandoening.

Dit type dierproef bestaat uit drie onderdelen:

1. Een enkele dosering wordt getest waarbij we de weefsels op verschillende tijdstippen willen isoleren om te kijken wat het beste tijdstip is en of er sprake is van een wash-out periode; De tijdstippen zijn gebaseerd op *in vitro* studies en eerdere bio distributiestudies met soortgelijke oligonucleotiden teststoffen waar een relatief hoge halfwaardetijd in weefsels was gevonden. Deze tijdstippen zijn o.a.: 24hr, 48hr, 7 en 14 dagen.

2. Pas daarna wordt een dosis-respons relatie gelegd op het optimale tijdstip, hierbij worden diverse doses getest (laag-middel-hoog) en proberen we tot een optimale doseringsvorm te komen;

3. Als laatste zullen we een meervoudige dosis-response relatie vastleggen, meerder doseringen variërend in de tijd. De meervoudige dosering zal gebaseerd zijn op de optimale dose (zie 2 hierboven) en de stabiliteit/effectiviteit in weefsels.

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. De toedieningswijzen zijn grotendeels gebaseerd op de uitkomsten van dierproef 1, omdat die uitkomsten onbekend zijn noemen we hier alle mogelijkheden op, dit is een veelvoud van hetgeen we in de praktijk waarschijnlijk gaan testen.

In onderstaande tabel worden de verschillende technieken benoemd.

| Nr. | Aard | Duur | Frequentie | Ongeriefinschatting |
|-----|--|-------|-------------|---------------------|
| | <u>Toedieningswijzen</u> | | | |
| 1 | IV injectie | 2 min | <u>1-28</u> | <u>2-3</u> |
| 2 | Intranasaal doseren | 1 min | <u>1-28</u> | <u>3</u> |
| 3 | Subcutaan injectie | 1min | <u>1-28</u> | <u>2-3</u> |
| 4 | Long toediening | 1min | <u>1-28</u> | <u>2-3</u> |
| 5 | Intravitreaal | 1 min | <u>1</u> | <u>3</u> |
| 6 | Intracerebrale injecties | 3 min | <u>1</u> | <u>3</u> |
| 7 | Intrathecale injecties | 3 min | <u>1</u> | <u>3</u> |
| | <u>Afname technieken</u> | | | |
| 8 | Bloedafname (Wangplexus) | 1 min | <u>1-4</u> | <u>2</u> |
| 9 | Bloedafname (Staartvene) | 1 min | <u>1-4</u> | <u>2</u> |
| 10 | Terminale bloedafname onder anesthesie | 1 min | <u>1</u> | <u>2</u> |
| | <u>Andere technieken</u> | | | |
| 11 | Huisvesten in metabolisme kooi | 4 uur | <u>1-2</u> | <u>2</u> |
| 12 | 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 dagelijks te doseren, maar dat zal lang niet altijd gelden. Intranasaal, intravitreaal, intracerebrale en intrathecale toediening zal onder anesthesie gebeuren, vandaar een hogere ongeriefinschatting. Indien een toediening vaker dan 10x wordt uitgevoerd zullen we deze naregistreren als matig, dat zal niet altijd het geval zijn, indien het minder dan 10x is zal het als gering worden geregistreerd.

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 twee technieken wang of staart.

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

Wang D, Shukla C, Liu X, Schoeb TR, Clarke LA, Bedwell DM, et al. Characterization of an MPS I-H knock-in mouse that carries a nonsense mutation analogous to the human IDUA-W402X mutation. *Mol Genet Metab.* Jan;99(1):62–71 (2010) .

Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M and Vorstenbosch C. A Good Practice Guide to the Administration of Substances and Removal of Blood, Including Routes and Volumes. *J. Appl. Toxicol.* 21, 15–23 (2001).

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

Er zijn diverse kwantitatieve uitleesparameters [GAGs in urine en weefsels, histologische scores, botdichtheid en moleculaire/biochemische parameters] welke gebruikt kunnen worden voor statistische onderbouwing van de groepsgroottes. Een pilot studie waarbij de verschillen van diverse uitleesparameters tussen muizen met de IDUA mutatie en gezonde nestgenoten worden vergeleken zal inzicht geven in de groepsgrootte

voor de studies.

We gaan ongeveer 4 muizen per tijdstip doseren en onderzoeken, dat is uit een internationale referentie voortgekomen getal (Ette, E. I., Kelman, A. W., Howie, C. A., & Whiting, B. (1995). Analysis of animal pharmacokinetic data: Performance of the one point per animal design. Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics, 23(6), 551–566. <http://doi.org/10.1007/BF02353461>). Verder verwachten we 2-3 groepen nodig te hebben om een optimale formulering te definiëren, en we hebben 3 doseringslevels en we verwachten 5-6 tijdstippen nodig te hebben voor een kinetiek inschatting.

In totaal komen we hiermee op 3 (formuleringen x 4 muizen) + 6 (tijdstippen op de beoogde dosering) x 4 (muizen) dan 4 (muizen) x 4 (doseringen: 0, laag, midden hoog). Totaal komen we dan op 12+24+16 = 52 dieren. Omdat we verwachten dat formuleringen vaak vrij standaard zijn (saline/PBS) en er soms minimale effecten te verwachten zijn en we een keuze theoretisch al kunnen maken vermoeden we toch met 40 dieren toe te kunnen komen.

Gegevens van elk 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.

B. De dieren

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

De Hurler muis heeft een 'nonsense' mutatie op het Idua codon (analoog aan humane p.Trp 402X mutatie) en is daarmee het ideale model voor de ziekte van Hurler. Deze muizen ondervinden gering ongerief door de aangebrachte modificatie, de muizen zijn vitaal en vruchtbaar, er is sprake van verdikking van de femur na 15 weken en de botdichtheid is verhoogd na 35 weken. De levensverwachting is 69 weken, dat is korter dan wildtype muizen (uit de Jax database), mede daarop baseren wij het verwachtte ongerief van gering.

Voor de behandeling zullen voornamelijk muizen tussen de 10 en 30 weken gebruikt worden, omdat in dit stadium de GAG ophoping in weefsels en excretie in de urine significant verschillend is ten opzichte van gezonde muizen.

Daarnaast ligt de overlevingskans tot 30 weken rond de 90% (Wang et al., 2010). Op basis van soortgelijke studies, verwachten we per jaar 6 studies uit te voeren met gemiddeld 40 dieren per studie. Over een periode van 5 jaar zijn dit 1200 dieren. Specifieke aantallen per experiment zullen met de IvD worden afgestemd en zullen worden onderbouwd d.m.v. power calculaties.

(Wang D, Shukla C, Liu X, Schoeb TR, Clarke LA, Bedwell DM, et al. Characterization of an MPS I-H knock-in mouse that carries a nonsense mutation analogous to the human IDUA-W402X mutation. Mol Genet Metab. 2010;99: 62–71).

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.

Qua monitoring zal van de dieren worden bijgehouden hoeveel bloed er is afgenomen en er geen maximale waarden (Diehl et al., 2001) worden overschreden.

Voor de start van de experimenten wordt zoveel mogelijk informatie uit in vitro data gehaald, dat kan uit humaan weefsel of celkweek zijn waarbij gebruik zal worden gemaakt met embryonale fibroblasten van de Hurler muis, pas daarna worden alle vervolgstappen genomen om zo min mogelijk dieren te gebruiken.

Met betrekking tot het experiment zelf 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. Dat leidt uiteindelijk tot een weloverwogen traject dat doorlopen wordt, er wordt niet alles getest met een formulering, en een dosering, we 'testen niet om te testen', in die zin hopen wij ook aan vermindering bij te dragen. Mede door de uitkomsten uit dierproef 1 in te zetten verwachten we minder dieren met het ziektemodel te gebruiken.

Omdat de ziekte van Hurler op zoveel plaatsen in het organisme effecten kan hebben is alleen het meten van GAG in urine niet toereikend. Daarnaast bestaat het vermoeden dat een meetbare verandering van GAG levels in Urine na interventie lastig te behalen is, al zijn we het met de DEC eens dat dit ook de voorkeur heeft, zeker voor de translatie naar de kliniek. Een correlatie tussen urine waardes en bepaalde mate van herstel, bereikt door onze therapie, is nog niet bekend. Het is meer waarschijnlijk dat onze therapie lage levels van Idua eiwit kan herstellen – welke voornamelijk op moleculair, biochemisch of m.b.v. histologische assays bepaald kan worden. Hiervoor hebben we weefsels nodig. Juist door het combineren van verschillende functionele / semi-functionele assays op weefsels van hetzelfde dier zijn we tot een vermindering van het beoogde aantal muizen gekomen.

We zullen de dieren daarnaast de laatste technieken qua anesthesie gebruiken (indien anesthesie noodzakelijk).

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 noodzakelijk voor het in kaart brengen van de effecten op een model voor de ziekte van Hurler met 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 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.

In sporadisch gevallen is het mogelijk dat meervoudige doseringen tot bijvoorbeeld ontstekingen leiden, zodra er een zichtbare ontsteking is of als de dieren > 20% afnemen in gewicht in een week tijd worden de dieren uit de proef genomen. Humane eindpunten worden ook bij de dagelijkse verzorging gemonitord, we werken louter met bevoegd en bekwaam personeel dat zich houdt aan de interne afspraken. Hieronder zijn er toedieningswijze een of meerdere humane eindpunten gedefinieerd.

| Nr. | Aard | Duur (Min) | Frequentie | Ongerief-inschatting | Humane eindpunten |
|-------------------|---------------------|------------|------------|----------------------|--|
| Toedieningswijzen | | | | | |
| 1 | IV injectie | 2 | 1-28 | 2-3 | De verwachting is bij herhaaldelijk injecteren dat er geen effecten te zien zullen zijn. Indien dieren een hematoom ontwikkelen door veelvuldig aanprikken zullen we de dieren offeren. |
| 2 | Intranasaal doseren | 1 | 1-28 | 3 | Dit gebeurt onder anesthesie en de stof wordt toegediend via de 'eigen' ademhaling, we verwachten hier geen humaan eindpunt mee te bereiken. Indien een dier onverhoopt in ademnood komt zullen we de dosering stoppen en het dier bij laten komen en later nogmaals doseren. Indien we daar hetzelfde zien zullen we het dier uit de proef nemen. |
| 3 | Subcutaan injectie | 1 | 1-28 | 2-3 | Hier verwachten we geen humaan eindpunt te bereiken. Indien we meerdere injecties toepassen zal iedere volgende injectie op een andere zijde (links of rechts) worden gezet. |
| 4 | Long toediening | 1 | 1-28 | 2-3 | Dit is een toediening via een nebulizer en hier hebben we goede ervaringen mee. We verwachten hier geen uitval noch een humaan eindpunt. |
| 5 | Intravitreaal | 1 | 1 | 3 | Dit is een eenmalige toediening onder anesthesie, hier verwachten we door de frequentie geen humane eindpunten. Indien er een infectie optreedt in het oog zal het dier onmiddellijk worden geofferd, zodra bij de injectie al duidelijk is dat het niet goed gaat, als het glasvocht er bijvoorbeeld uit loopt dan wordt het dier onmiddellijk geofferd. Komen we tijdens de dagelijkse controles erachter dat dieren blind raken dan nemen we de dieren uit voorzorg uit |

| | | | | | |
|-------------------|--------------------------|---|------|---|---|
| | | | | | de proef. |
| 6 | Intracerebrale injecties | 3 | 1 | 3 | Hier verwachten we geen humaan eindpunt te bereiken. Dit wordt onder anesthesie uitgevoerd en hiervoor is uitvoerig getraind om de juiste lokalisatie in de hersenen te vinden. Zodra we tekenen van geheel of gedeeltelijk verlamming constateren dan wordt het dier geofferd, indien we ataxie constateren zullen we de dieren intensiever dan dagelijks volgen, indien wij het idee hebben dat het dier meer dan matig ongerief ervaart zullen het afvoeren. |
| 7 | Intrathecale injecties | 3 | 1 | 3 | Hier verwachten we geen humaan eindpunt te bereiken. Dit wordt onder anesthesie uitgevoerd en hiervoor is uitvoerig getraind om de juiste lokalisatie in het ruggenmerg te vinden. Hier kunnen we na het ontwaken uit narcose onmiddellijk waarnemen of een dier niet goed geïnjecteerd is. Zodra we tekenen van (geheel of gedeeltelijke) verlamming constateren dan wordt het dier geofferd. |
| Andere technieken | | | | | |
| 8 | Wegen | 1 | 1-28 | 2 | Geen humaan eindpunt. |
| 9 | Beeldvorming | 1 | 1-28 | 2 | Geen, dit is het imagen onder anesthesie. |
| 10 | Anesthesie | 1 | 4-8 | 2 | Geen, echter anesthesie in het algemeen kan voor ademhalingsproblemen zorgen tijdens de anesthesie. Afhankelijk wat er gebeurt kan de hoeveelheid O2 iets worden aangepast. Na afloop zal de muis rustig bijkomen, de verwachting is niet dat hierbij een humaan eindpunt optreedt. |

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

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



> 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
AVD9070020171164

Bijlagen

2

Datum 24 maart 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 23 maart 2017. Het gaat om uw project "Onderzoek naar de biodistributie en de effectiviteit van nieuwe, op oligonucleotiden gebaseerde, teststoffen voor de behandeling van het Hurler syndroom.". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD9070020171164. 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:

24 maart 2017

Aanvraagnummer:

AVD9070020171164

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
24 maart 2017
Aanvraagnummer:
AVD9070020171164

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

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

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 april 2017
Geplande einddatum: 31 maart 2022
Titel project: Onderzoek naar de biodistributie en de effectiviteit van nieuwe, op oligonucleotiden gebaseerde, teststoffen voor de behandeling van het Hurler syndroom.
Titel niet-technische samenvatting: Onderzoek naar de biodistributie van nieuwe, op oligonucleotiden gebaseerde, teststoffen voor de behandeling van de ziekte van Hurler.
Naam DEC: DEC Rug/ UMCG
E-mailadres DEC: secredec.umcg@umcg.nl

Datum:

24 maart 2017

Aanvraagnummer:

AVD9070020171164

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1.287,-
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: 
Plaats: Leiden
Datum: 23 maart 2017



> 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
AVD9070020171164

Bijlagen

2

Datum 24 maart 2017

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 24 maart 2017

Vervaldatum: 23 april 2017

Factuurnummer: 171164

| Omschrijving | Bedrag |
|---|------------|
| Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD9070020171164 | € 1.287,00 |

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.

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 **8089**
2. Titel van het project: **Onderzoek naar de biodistributie en de effectiviteit van nieuwe, op oligonucleotiden gebaseerde, teststoffen voor de behandeling van het Hurler syndroom**
3. Titel van de NTS: **Onderzoek naar de biodistributie van nieuwe, op oligonucleotiden gebaseerde, teststoffen voor de behandeling van de ziekte van Hurler.**
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning**
 - wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: **DEC-RUG**
 - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
 - e-mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC **09-02-2017**
 - aanvraag compleet **09-02-2017**
 - in vergadering besproken **16-02-2017**
 - anderszins behandeld **02-03-2017, 08-03-2017, 14-03-2017**
 - termijnonderbreking(en) van / tot **22-02-2017 tot 27-02-2017, 02-03-2017 tot 07-03-2017, 08-03-2017 tot 13-03-2017**
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen **n.v.t.**
 - aanpassing aanvraag **27-02-2017, 07-03-2017, 14-03-2017**
 - advies aan CCD: **17-03-2017**
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.
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 **22-02-2017, 02-03-2017, 08-03-2017**

Vragen/opmerkingen

- 1/Kunt u nader aangeven waarom U op voorhand in beide bijlagen herhaling en duplicering uitsluit?
- 2/Oligonucleotiden sorteren hun effect met name in de celkern. Is het niet relevanter de concentratie van GAG's in weefsels als uitleesparameter (al dan niet in combinatie met de orgaanfluorescentie door de teststof) te bepalen dan de hoeveelheid teststof in het plasma?
- 3/U geeft aan dat de biosafety bij Hurler muizen zal worden onderzocht en waarschijnlijk ook impliciet bij wildtype muizen. Er zijn aanwijzingen voor toxische effecten van oligonucleotiden bij toediening aan de mens (zie ondermeer van Poelgeest. Am J Kidney Dis 2013;62:796-800). Welke toxische effecten verwacht u met name bij de wildtype en Hurler muizen na toediening van uw teststoffen?
- 4/Gezien de beoogde toedieningsfrequentie en de lokalisatie van sommige toedieningen zouden toch wel humane eindpunten geformuleerd moeten kunnen worden in beide bijlagen met een beetje (meer) fantasie.
- 5/Kunt u nader schetsen/onderbouwen waarom ongeveer 40 dieren per teststof nodig zijn?
- 6/ Kunt u aangeven waarom wildtype muizen tussen de 5 en 16 weken leeftijd worden gebruikt in vergelijking tot 10-30 weken oude Hurler muizen?
- 7/Indien u de concentratie van GAG's in de urine als uitleesparameter bij de Hurler muizen gebruikt voor de effectiviteit van de betreffende oligonucleotide kunt u herhaalde metingen aan hetzelfde dier doen ter vaststelling van ondermeer de wash-out periode, een dosis-effect-curve, meervoudige dosis-response relatie, etc en daarmee mogelijk vermindering bewerkstelligen. Het aankruisen van C (hergebruik van dieren) met Nee lijkt te vermoeden dat u dit niet als mogelijkheid ziet. Waarom?
- 8/U lijkt uw doel al redelijk te zijn genaderd. Waarom voorziet u de komende 5 jaar dan steeds 4 studies te moeten uitvoeren met wildtype dieren? In dit licht komt de stelling dat u op basis van soortgelijke studies verwacht over 5 jaar 30 studies uit te voeren met gemiddeld 40 Hurler muizen per studie ook wat merkwaardig over.
- 9/NTS: mogelijk wat te hoog gegrepen voor een leek.

Vervolg vragen:

- 1/Uw onderzoek is louter translationeel van aard. In dit kader geeft u ook aan dat het essentieel is dat plasma wordt gemeten zodat *'we ook voor de klinische fase iets hebben aan de data, in de kliniek kunnen we geen organen isoleren om levels te bepalen. Hier zijn we afhankelijk van plasmawaarden en zullen daarom in onze datasets ook effecten aan plaswaarden proberen te koppelen zodat we hier humaan een uitspraak kunnen doen over de optimale klinische dosis'*. Het lijkt buiten kijf te staan dat uw onderzoek aan de Hurlermuis geëxtrapoleerd moet kunnen worden naar de klinische toepassing bij de mens. Het gendefect leidt tot een systemische disfunctie en het lijkt daarom essentieel dat de door u beoogde oligonucleotiden systemisch werkzaam moeten zijn, waardoor locale toediening obsoleet lijkt. In uw bijlagen geeft u een uitputtend overzicht van de optionele toedieningslocalisaties en hun frequenties. In relatie hiermee is hetgeen u nu als humaan eindpunt toevoegt bezwaarlijk serieus te nemen. Gelieve de humane eindpunten in overeenstemming te brengen met het scala aan optionele toedieningslocalisaties en hun frequenties, waarbij het aanbeveling lijkt te verdienen advies van een dierenarts in te roepen. Mogelijk is zelfs te prefereren de locale toedieningslocalisaties uit de lijst te schrappen, die niet relevant lijken voor toepassing bij (humane) patiënten.
- 2/De DEC-RuG heeft U de suggestie aan de hand gedaan om GAG-bepalingen in urine te doen, waardoor herhaalde metingen aan hetzelfde dier mogelijk zijn teneinde te komen tot vermindering van gebruik van proefdieren. Ondanks dat u voornemens bent deze bepaling te gaan uitvoeren heeft dit in het geheel niet geresulteerd in een vermindering van de beoogde aantallen proefdieren.
- 3/Onder uw antwoord op vraag 2a geeft u aan dat u wilt "meten of het werkt". Dit suggereert natuurlijk dat u uiteindelijk geïnteresseerd bent in het (klinische) effect op de Hurlermuis. Bij het achterwege blijven van een klinisch effect van toediening van oligonucleotiden lijkt bepaling van weefselconcentraties minder zinvol, nietwaar?
- 4/In deze versie van het project voorstel leest de DEC-RuG nog steeds dat met betrekking tot het experiment zelf er zoveel mogelijk data gehaald worden 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. Dat leidt uiteindelijk tot een weloverwogen traject dat doorlopen wordt, er wordt niet alles getest met een formulering, en een dosering, we "testen niet om te testen", in die zin hopen wij ook aan vermindering bij te dragen. In een dergelijk project voorstel is het wel zaak meer zicht te geven op "het weloverwogen traject" dat doorlopen wordt en niet te blijven steken in algemeenheden temeer daar *in vitro* u vrij ver bent "in het ontdekken van belangrijke zaken, of iets werkt en in welke *in vitro* doses".
- 5/U merkt ook op dat, mede door de uitkomsten uit dierproef 1 in te zetten, u verwacht minder dieren met het ziektemodel te gebruiken. De doelstelling van uw projectvoorstel is : Het doel van het huidige project is om antwoord te geven op de vraag of onze testcompound positieve effecten laat zien in het Hurler muis model specifiek voor de p.Trp402X mutatie. De vraag rijst nu bij de DEC-RuG of bijlage 1 überhaupt noodzakelijk is voor de beantwoording van deze vraag temeer daar u in bijlage 2 tevens voornemens bent tot bepaling van de optimale toedieningsroute en biodistributie van de nieuwe oligonucleotiden bij de Hurlermuis.

Laatste vragen:

- 1/Van Uw lijst handelingen maken ondermeer intravitreale, intrathecale en intracerebrale injecties deel uit. In geval van beide laatste toedieningswijzen is zelfs sprake van herhaalde toediening. Zouden in het licht daarvan neurologische verschijnselen, zoals ataxie, blindheid, parese en paralyse niet misstaan als humane eindpunten.

- 2/U geeft aan dat de overlevingskans van Hurlermuizen tot 30 weken rond de 90% ligt (Wang et al., 2010). Treedt uitval van de 10% der dieren eerder dan 30 weken leeftijd op door spontane sterfte of wordt dit ondervangen door het bereiken van een humaan eindpunt? Zo ja, welk humaan eindpunt?
- 3/U heeft niet intramusculaire toediening als aantrekkelijk translationele toedieningswijze opgenomen, nietwaar?
- 4/Van welk orgaan verwacht U eigenlijk de belangrijkste bijdrage aan het ziektebeeld gezien de lokale toediening?
- 5/Injectie van oligonucleotiden in een orgaan hoeft natuurlijk niet te leiden tot een effect in het gehele betreffende orgaan, maar er zou sprake kunnen zijn van onwerkzaamheid van een lokaal oligonucleotidendepot. In hoeverre heeft U dit reeds onderzocht in weefselweek en/of orgaanpreparaten/organoiden?
- 6/Het heeft er alle schijn van dat het voor de hand ligt te veronderstellen dat de toediening van de oligonucleotiden met name kans van slagen heeft bij systemische werkzaamheid na al dan niet systemische toediening. In Uw go/no go schema wordt de indruk gewekt dat U de werkzaamheid van alle toedieningsvormen wilt gaan testen. Zou het ook een mogelijkheid zijn een go/no go schema te ontwerpen, waarin de werkzaamheid van systemische toediening als uitgangspunt wordt genomen al dan niet naast een toediening in het centrale zenuwstelsel?

- Datum antwoord: **27-02-2017, 07-03-2017, 13-03-2017**

- Verstrek(e) antwoord(en):

- 1/ Op voorhand sluiten we herhaling en duplicering niet expliciet uit, het traject volgt elkaar op. We kunnen dezelfde stof testen, in twee modellen, dat is het hele doel erachter. Eerst opname en distributie bepalen dmv fluorescentie; vervolgens, indien onze teststof op de juiste plek komt, gaan we in een ziekte model kijken.
- 2/ Lokalisatie in de celkern van de teststof is in het Hurler model niet nodig bij deze techniek (over het algemeen wel bij oligonucleotides). Plasmalevels bepalen is hier slechts een onderdeel van meerdere metingen, we willen ook meten of het werkt. We hebben dit aangegeven onder A:
Hoeveelheid teststof in het plasma na toediening (voor PK doeleinden en translatie naar klinische doses);
Macroscopische lokalisatie na toediening (hoeveelheid fluorescentie per orgaan);
Nucleaire lokalisatie van de stof m.b.v. confocale microscopie;
Het is essentieel dat plasma wordt gemeten zodat we ook voor de klinische fase iets hebben aan de data, in de kliniek kunnen we geen organen isoleren om levels te bepalen. Hier zijn we afhankelijk van plasmawaarden en zullen daarom in onze datasets ook effecten aan plaswaarden proberen te koppelen zodat we hier humaan een uitspraak kunnen doen over de optimale klinische dosis.
- 3/ Er zijn bij onze type oligonucleotides met specifieke chemische modificaties weinig tot geen toxische effecten, de betreffende referentie spreekt over LNA (welke zeer sterk binden aan (serum) eiwitten). De door ons gebruikte oligo's zijn minder immunogeen, hebben een lagere eiwitbinding en worden relatief makkelijker afgebroken dan de LNA variant. Dit type oligo wordt momenteel in diverse klinische studies getest: Zie onder andere: Viney, N. J., van Capelleveen, J. C., Geary, R. S., Xia, S., Tami, J. A., Yu, R. Z., ... Tsimikas, S. (2016). Antisense oligonucleotides targeting apolipoprotein(a) in people with raised lipoprotein(a): two randomised, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging trials. *The Lancet*, 388(10057), 2239–2253. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31009-1](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31009-1).
- 4/ Dat is aangepast naar "In sporadisch gevallen is het mogelijk dat meervoudige doseringen tot bijvoorbeeld ontstekingen leiden, zodra er een zichtbare ontsteking is of als de dieren > 20% afnemen in gewicht in een week tijd worden de dieren uit de proef genomen."
- 5/ We gaan ongeveer 4 muizen per tijdstip doseren en onderzoeken, dat is uit een internationale referentie voortgekomen getal (Ette, E. I., Kelman, A. W., Howie, C. A., & Whiting, B. (1995). Analysis of animal pharmacokinetic data: Performance of the one point per animal design. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, 23(6), 551–566. <http://doi.org/10.1007/BF02353461>). Verder verwachten we 2-3 groepen nodig te hebben om een optimale formulering te definiëren, en we hebben 3 doseringslevels en we verwachten 5-6 tijdstippen nodig te hebben voor een kinetiek inschatting. In totaal komen we hiermee op 3 (formuleringen x 4 muizen) + 6 (tijdstippen op de beoogde dosering) x 4 (muizen) dan 4 (muizen) x 4 (doseringen: 0, laag, midden hoog). Totaal komen we dan op 12+24+16 = 52 dieren. Omdat we verwachten dat formuleringen vaak vrij standaard zijn (saline/PBS) en er soms minimale effecten te verwachten zijn en we een keuze theoretisch al kunnen maken vermoeden we toch met 40 dieren toe te kunnen komen. Dit is onder de statistische onderbouwing in beide experimenten beschreven.
- 6/ Dank voor deze tip, er is geen enkele reden om de wildtypes in een andere leeftijdsrange te gebruiken, die worden van 10-30 ook gebruikt. Dat is aangepast.
- 7/ Dit is een goed punt, we zullen GAG in de urine meten. Echter de levels op orgaanniveau zijn bepalend. Het is op orgaanniveau (hersenen bijvoorbeeld) noodzakelijk om te bekijken of er verbeteringen plaatsvinden, dat is niet af te leiden uit urineniveaus.
- 8/ In vitro zijn we vrij ver in het ontdekken van belangrijke zaken, of iets werkt en in welke in vitro doses. Echter, of dat ook in zoogdieren vergelijkbaar is en wat voor plasmalevels en orgaanniveaus haalbaar zijn, zoals hier beschreven is absoluut noodzakelijk.
In vitro data wordt vaak verkregen door experimenten waarbij de celwand bijvoorbeeld doorlaatbaar gemaakt wordt met transfectie reagentia, dat is in vivo niet haalbaar (ivm tox). Voor de uiteindelijke vertaling naar zoogdieren is die data echter zeer noodzakelijk.
Ook hebben we aangegeven dat in het algemeen (3.a) er veel bekend is over oligonucleotiden en dat ze relatief veilig zijn, echter iedere oligonucleotide wordt specifiek ontwikkeld en heeft daardoor zijn eigen benadering nodig. Om dan tot het uiteindelijke doel te komen is de huidige aanvraag noodzakelijk.
Enkele referenties als bijlage bijgesloten dat oligo's goed bestudeerd moeten worden, alleen in vitro data is niet goed genoeg. Juliano, R. L. (2016). The delivery of therapeutic oligonucleotides. *Nucleic Acids Research*, (16), gkw236. <http://doi.org/10.1093/nar/gkw236>, Levin, A. A. (2017). Targeting Therapeutic Oligonucleotides. *The New England Journal of Medicine*, 376(1), 86–88. <http://doi.org/10.1056/NEJMcibr1613559>
- 9/ De NTS is wat eenvoudiger geschreven.

Antwoorden vervolgvragen:

1/De aanvrager is van mening dat het doen van onderzoek naar verschillende toedieningswijzen noodzakelijk is omdat de ziekte van Hurler in allerlei organen effecten kan hebben. Hierbij kunnen lokaal hogere concentraties andere effecten tonen dan systemische toedieningen. Omdat we in vitro weten dat onze stof werkt willen we de mogelijkheid vragen om dit via meerdere toedieningswijzen toe te dienen aan muizen. De humane eindpunten zijn per toediening weergegeven. Zie de tabel hieronder:

| Nr. | Aard | Duur (Min) | Frequentie | Ongeriefschatting | Humane eindpunten |
|--------------------------|--------------------------|------------|------------|-------------------|--|
| Toedieningswijzen | | | | | |
| 1 | IV injectie | 2 | 1-28 | 2-3 | De verwachting is bij herhaaldelijk injecteren dat er geen effecten te zien zullen zijn. Indien dieren een hematoom ontwikkelen door veelvuldig aanprikken zullen we de dieren offeren. |
| 2 | Intranasaal doseren | 1 | 1-28 | 3 | Dit gebeurt onder anesthesie en de stof wordt toegediend via de 'eigen' ademhaling, we verwachten hier geen humaan eindpunt mee te bereiken. Indien een dier onverhoopt in ademnood komt zullen we de dosering stoppen en het dier bij laten komen en later nogmaals doseren. Indien we daar hetzelfde zien zullen we het dier uit de proef nemen. |
| 3 | Subcutaan injectie | 1 | 1-28 | 2-3 | Hier verwachten we geen humaan eindpunt te bereiken. Indien we meerdere injecties toepassen zal |
| | | | | | iedere volgende injectie op een andere zijde (links of rechts) worden gezet. |
| 4 | Long toediening | 1 | 1-28 | 2-3 | Dit is een toediening via een nebulizer en hier hebben we goede ervaringen mee. We verwachten hier geen uitval noch een humaan eindpunt. |
| 5 | Intravitreaal | 1 | 1 | 3 | Dit is een eenmalige toediening onder anesthesie, hier verwachten we door de frequentie geen humane eindpunten. Indien er een infectie optreedt in het oog zal het dier onmiddellijk worden geofferd. |
| 6 | Intracerebrale injecties | 3 | 2 | 3 | Hier verwachten we geen humaan eindpunt te bereiken. Dit wordt onder anesthesie uitgevoerd en hiervoor is uitvoerig getraind om de juiste lokalisatie in de hersenen te vinden. |
| 7 | Intrathecale injecties | 3 | 2 | 3 | Hier verwachten we geen humaan eindpunt te bereiken. Dit wordt onder anesthesie uitgevoerd en hiervoor is uitvoerig getraind om de juiste lokalisatie in het ruggenmerg te vinden. |
| Andere technieken | | | | | |
| 8 | Wegen | 1 | 1-28 | 2 | Geen humaan eindpunt. |
| 9 | Beeldvorming | 1 | 1-28 | 2 | Geen, dit is het imago onder anesthesie. |
| 10 | Anesthesie | 1 | 4-8 | 2 | Geen, echter anesthesie in het algemeen kan voor ademhalingsproblemen zorgen tijdens de anesthesie. Afhankelijk wat er gebeurt kan de gevoeligheid O2 iets worden aangepast. Na afloop zal de muis rustig bijkomen, de verwachting is niet dat hierbij een humaan eindpunt optreedt. |

2/Dat klopt, dit zijn indicatieve metingen, omdat de ziekte van Hurler op zoveel plaatsen in het organisme effecten kan hebben is alleen het meten van GAG in urine niet toereikend. Daarnaast bestaat het vermoeden dat een meetbare verandering van GAG levels in Urine na interventie lastig te behalen is, al zijn we het met de DEC eens dat dit ook de voorkeur heeft, zeker voor de translatie naar de kliniek. Een correlatie tussen urine waarden en bepaalde mate van herstel, bereikt door onze therapie, is nog niet bekend. Het is meer waarschijnlijk dat onze therapie lage levels van Idua eiwit kan herstellen – welke voornamelijk op moleculair, biochemisch ofm.b.v. histologische assays bepaald kan worden. Hiervoor hebben we weefsels nodig. Juist door het combineren van verschillende functionele / semi-functionele assays op weefsels van hetzelfde dier zijn we tot een vermindering van het beoogde aantal muizen gekomen. (zie D)

3/ Het bepalen van weefselconcentraties is juist dan zinvol, alleen op die manier kunnen we conclusies trekken uit bijvoorbeeld een verschil in systemische of lokale toediening en de concentratie in een orgaan waar we wel of geen resultaat zien.

4/ We zoeken in de aanvraag bepaalde vrijheidsgraden omdat we op zoek zijn naar de beste toedieningswijze/toedieningsaard van ons nieuwe product. In vitro weten we dat deze techniek werkt en hebben we een aantal kandidaat stoffen gevonden. De translatie naar in vivo is essentieel omdat de distributie en opnamen van oligonucleotiden in vivo anders zijn dan in vitro. In vitro wordt vaak een transfectie reagent gebruikt, in vivo kunnen we die niet gebruiken door hun hoge mate van toxiciteit, daarom willen we onderzoeken wat in vivo de beste toedieningswijze is. Daarbij starten we basaal: zien we een verschil in lokale of systemische toediening? Zien we een verschil tussen verschillende formuleringen? Ook hierbij is het noodzakelijk dat we hier onderzoek kunnen doen teneinde ons product verder te ontwikkelen. Het kan voorkomen dat we bijvoorbeeld een goed werkend product hebben waarbij we willen bestuderen of een slow-release formulering uiteindelijk lokaal/of systemisch (dat willen we onderzoeken) nog betere effecten laat zien. Het weloverwogen traject ontwikkelt zich tijdens de medicijnontwikkeling, niet iedere stap wordt van tevoren uitgeschreven, er is geen wet van meden en perzen.

o In aanvulling hierop, om uiteindelijk een product geregistreerd te krijgen is het verkrijgen van deze data essentieel. De EMA geeft aan dat er geen consistentie is in het veld, echter wel dat het noodzakelijk informatie op kan leveren voor de rest van het dossier. (http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002771.pdf) (zie 3.4.1.)

5/ U heeft gelijk, voor het beantwoorden van de vraag of onze testcompound positieve effecten laat zien in het Hurler muis model, hebben we de Hurler muis nodig. Vooraf vinden wij het essentieel om te weten of onze stof bij de beoogde organen komt. We meten daarbij de fluorescentie in een fluorescente muis. Indien we lokaal geen effecten zien op fluorescentie dan hoeven we geen experiment uit te voeren met het Hurler muis model. Omdat dit laatste model in potentie een hogere kans op ongerief heeft hebben we deze route gekozen. Hiermee doen we relatief meer studies met het fluorescente model en minder met het Hurler model. De eerste is echter een veel nauwkeuriger en bovendien snellere meting en essentieel voor de selectie van onze stof in ons uiteindelijke ziektemodel. Bijlage I biedt ons de mogelijkheid relatief snel veel te testen, waarbij bijlage II meer voor een fase verder in het onderzoek is waarbij we ons richten op de effectiviteit (zie 3.4.3).

Laatste antwoorden:

1/Na intern beraad kiezen wij er voor om slechts eenmaal deze invasieve injecties toe te dienen, ook voegen wij deze specifieke in de DEC aanvraag toe, niet alleen in het werkprotocol:

Intravitreaal: deze toedieningstechniek zal maximaal eenmaal gedaan worden, zodra bij de injectie al duidelijk is dat het niet goed gaat, als het glasvocht er bijvoorbeeld uit loopt dan wordt het dier onmiddellijk geofferd. Komen we tijdens de dagelijkse controles erachter dat dieren blind raken dan nemen we de dieren uit voorzorg uit de proef;

Intrathecaal: deze toedieningstechniek zal maximaal eenmaal gedaan worden, hier kunnen we na het ontwaken uit narcose onmiddellijk waarnemen of een dier niet goed geïnjecteerd is. Zodra we tekenen van (geheel of gedeeltelijke) verlamming constateren dan wordt het dier geofferd;

Intracerebraal: deze toedieningstechniek zal maximaal eenmaal gedaan worden, hier kunnen we na het ontwaken uit narcose onmiddellijk waarnemen of een dier niet goed geïnjecteerd is. Zodra we tekenen van geheel of gedeeltelijk verlamming constateren dan wordt het dier geofferd, indien we ataxie constateren zullen we de dieren intensiever dan dagelijks volgen, indien wij het idee hebben dat het dier meer dan matig ongerief ervaart zullen het afvoeren.

Humane eindpunten worden ook bij de dagelijkse verzorging gemonitord, bijgevoegd een lijst die binnen ons bedrijf wordt gehanteerd. We werken louter met bevoegd en bekwaam personeel dat zich houdt aan de interne afspraken. Bijgevoegd daarom onze instructie dagelijkse controles

2/ Volgens het paper is dit spontane sterfte, binnen de USA wordt echter minder naar humane eindpunten gekeken, we zullen hier zelf op toezien en indien we een verandering in gedrag waarnemen zullen we de proefdierdeskundige/13f3a3/dierenarts inschakelen.



6/ Onderzoek met oligonucleotiden heeft aangetoond dat na systemische toediening de oligonucleotiden met name naar de lever en nieren gaan (Juliano, 2016) . Daarnaast kunnen oligonucleotiden vanwege hun grootte de bloed-brein en bloed-retina barrière niet passeren (Evers et al, 2014). Eigen onderzoek en (Fey et al, 2014) heeft aangetoond dat lokale toediening in de longen een zeer efficiënte opname in de longcellen laat zien vergeleken met intraveneus of andere systemische toedieningsvormen. Voor ons zijn dat redenen om niet te willen starten met een systemische toediening, maar ons te richten op alle facetten. **Referenties:**

-Clarke LA. Mucopolysaccharidosis Type I. 2002 Oct 31 [Updated 2016 Feb 11]. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2017.

-Østergaard, M. E., Southwell, A. L., Kordasiewicz, H., Watt, A. T., Skotte, N. H., Doty, C. N., ... Seth, P. P. (2013). Rational design of antisense oligonucleotides targeting single nucleotide polymorphisms for potent and allele selective suppression of mutant Huntingtin in the CNS. *Nucleic Acids Research*, 41(21), 9634–9650. <http://doi.org/10.1093/nar/gkt725>

-Gérard, X., Perrault, I., Munnich, A., Kaplan, J., & Rozet, J.-M. (2015). Intravitreal Injection of Splice-switching Oligonucleotides to Manipulate Splicing in Retinal Cells. *Molecular Therapy—Nucleic Acids*, 4(9), e250. <http://doi.org/10.1038/mtna.2015.24>

-Fey, R. a, Templin, M. V, McDonald, J. D., Yu, R. Z., Hutt, J. a, Gigliotti, A. P., ... Reed, M. D. (2014). Local and systemic tolerability of a 2'O-methoxyethyl antisense oligonucleotide targeting interleukin-4 receptor-α delivery by inhalation in mouse and monkey. *Inhalation Toxicology*, 26(8), 452–63. <http://doi.org/10.3109/08958378.2014.907587>

-Juliano, R. L. (2016). The delivery of therapeutic oligonucleotides. *Nucleic Acids Research*, (16), gkw236. <http://doi.org/10.1093/nar/gkw236>

-Evers, M. M., Tran, H.-D., Zalachoras, I., Meijer, O. C., den Dunnen, J. T., van Ommen, G.-J. B., ... van Roon-Mom, W. M. C. (2014). Preventing formation of toxic N-terminal huntingtin fragments through antisense oligonucleotide-mediated protein modification. *Nucleic Acid Therapeutics*, 24(1), 4–12. <http://doi.org/10.1089/nat.2013.0452>

- 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)? 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 / een wijziging op een bestaande vergunning. **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. **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 lijken niet allemaal noodzakelijk om de doelstelling te behalen. Het is helder welke handelingen en ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft zowel binnen de doelstellingen als tussen de doelstellingen criteria beschreven op basis van welke criteria deze zal besluiten het project wel of niet te continueren. 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. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

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 Wet Natuurbescherming).

Voor zover de DEC de mogelijke tegenstrijdigheid kan beoordelen is er geen aanleiding om deze strijdigheid met andere relevante wettelijke bepalingen aanwezig te achten. De DEC wil wel stellen dat deze signaleringsfunctie niet tot de wettelijke taken van de DEC behoort. Mochten de DEC-RuG signalen bereiken aangaande mogelijke tegenstrijdigheid met wettelijke bepalingen dan zal zij onverwijld de vergunninghouder daarvan op de hoogte stellen.

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 van dit project is om na te gaan of de beschreven testcompounds positieve effecten laten zien in het Hurler muis model specifiek voor de p.Trp402X mutatie.

Het uiteindelijke doel is om een betere behandeling van de ziekte van Hurler te ontwikkelen.

Er is geen directe en reële relatie tussen het directe en uiteindelijke doel. Het uiteindelijke doel zal waarschijnlijk binnen de looptijd van het project niet gehaald worden. Het project is gericht op fundamenteel en translationeel onderzoek m.b.t. de hierboven beschreven (directe) doel. De aanvrager heeft duidelijk gemaakt wat dit project kan bijdragen aan het onderzoeksveld en 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 fundamentele/translationele project zijn de proefdieren, en mensen met de ziekte van Hurler.

Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: de integriteit van de dieren zal worden aangetast door genetische modificatie, de dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en ongerief ondergaan als gevolg van het toedienen van teststoffen en bloedafnames. Aan het einde van de proef zullen de dieren opgeofferd worden.

Waarden die voor mensen bevorderd worden: een potentieel betere behandeling van de ziekte van Hurler.

6. Is er aanleiding voor de DEC om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken?

Voor zover de DEC de beschreven effecten op het milieu kan beoordelen is er geen aanleiding om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu te betrekken. De DEC wil wel stellen dat deze signaleringsfunctie niet tot de wettelijke taken van de DEC behoort. Mochten de DEC-RuG signalen bereiken aangaande mogelijke effecten op het milieu dan zal zij onverwijld de vergunninghouder daarvan op de hoogte stellen.

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

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 ervan 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 doelstelling en de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen naar de mening van de DEC leiden tot het behalen van de doelstelling op basis van met name bijlage 2 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 huisvesting en verzorging volgens de richtlijn gebeurt. Dit op basis van de daartoe strekkende verklaring van zowel de vertegenwoordiger van de vergunninghouder als de aanvrager onder respectievelijk punt 6 van de ondertekening van de aanvraag en punt F van de bijlage.**

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*). **Dit is goed ingeschat. De DEC vertrouwt erop dat**

de aanvrager al het mogelijke zal doen om het 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 het dier wordt aangetast door genetische verandering, het toedienen van teststoffen en bloedafnames. Aan het einde van de proef zullen de dieren opgeofferd worden.**
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 criteria voor humane eindpunten in deze aanvraag voldoende beschreven.**

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. Biodistributie, farmacokinetiek en daarmee de effectieve dosering van de teststoffen zijn in vitro niet na te bootsen.**
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 en power analyses.**
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 ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen.**

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. **NvT (betreft geen wettelijk vereist onderzoek)**

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 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.

*Rechtvaardigen de doelstellingen van het project "**Onderzoek naar de biodistributie en de effectiviteit van nieuwe, op oligonucleotiden gebaseerde, teststoffen voor de behandeling van het Hurler syndroom**", dat gericht is op de verbetering van de behandelmethode van patiënten met het Hurlersyndroom het matige ongerief, dat de muizen wordt aangedaan in het onderhavige project?*

Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: **matig nadeel.**

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

Algemeen: **vergroting van medische kennis met betrekking tot de behandeling van het Hurlersyndroom.**

*De DEC-RuG is van mening dat de belangen van de samenleving in het algemeen en de patiënten en hun naasten in het bijzonder binnen het project "**Onderzoek naar de biodistributie en de effectiviteit van nieuwe, op oligonucleotiden gebaseerde, teststoffen voor de behandeling van het Hurler syndroom**" 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 stress ondervinden. De integriteit van de dieren zal worden aangetast door het al dan niet herhaald toedienen van een oligonucleotide, herhaalde bloedafname, eventuele herhaalde anesthesie en de opoffering aan het eind van de proeven. Dit zal ook repercussies hebben op hun natuurlijke gedrag.*

Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit project echter leiden tot een relevante uitbreiding van medisch-wetenschappelijke kennis over het behandelen van het syndroom van Hurler. Voor de betreffende patiënten is verbetering van hun welzijn en mogelijk uitzicht op herstel van groot belang. Dit verhoogt hun levensverwachting en geeft een betere kwaliteit van leven. Tevens zal de kwaliteit van leven van hun naasten verbeterd worden.

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

*De DEC-RuG beantwoordt de centrale morele vraag: Rechtvaardigt de doelstelling van het project "**Onderzoek naar de biodistributie en de effectiviteit van nieuwe, op oligonucleotiden gebaseerde, teststoffen voor de behandeling van het Hurler syndroom**", dat gericht is op de verbetering van de behandeling van het syndroom van Hurler, de opoffering en het matige ongerief, dat de dieren wordt aangedaan in het voorliggende project 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 doelstelling en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project **op basis van met name bijlage 2**. De onderzoekers beschikken over de benodigde kennis en technische expertise. Er is geen sprake van duplicatie.*

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 en de effectiviteit van nieuwe, op oligonucleotiden gebaseerde, teststoffen voor de behandeling van het Hurler syndroom**" 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.

Opmerking: Gezien het onder 3.2 in het projectvoorstel beschreven doel lijkt bijlage 1 niet strikt noodzakelijk voor het behalen van dit doel vermits deze bijlage 1 noodzakelijk is in het kader van toekomstige geneesmiddelregistratie.

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

2. 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*).

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

[REDACTED]

Van: [REDACTED]
Verzonden: woensdag 12 april 2017 15:52
Aan: 'Info-zbo'
Onderwerp: RE: NTS aanvraag AVD9070020171164
Bijlagen: format_nts-Hurlerv12_vragenCCd.doc

Let op, in de bijlage van deze e-mail, verzonden door [REDACTED] is een macro aangetroffen. Macro's kunnen misbruikt worden om malware op uw systeem te installeren. Open de bijlage alleen als de e-mail afkomstig is van een door u vertrouwde afzender.

Indien dit niet het geval is dient u deze e-mail direct te verwijderen zonder de bijlage te openen.

DICTU Servicedesk

LS,
Excuses, dat heb ik over het hoofd gezien.
Met vriendelijke groet/Best regards,
[REDACTED]



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

Van: Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]
Verzonden: woensdag 12 april 2017 15:49
Aan: [REDACTED]
Onderwerp: RE: NTS aanvraag AVD9070020171164

Geachte [REDACTED]

Bedankt voor de documenten, maar in de nieuwe NTS staat nu 1760 muizen in totaal: 800 wildtype muizen 1200 Hurler muizen. Het zou 2000 muizen in totaal moeten zijn.

Wilt u dit aanpassen?

Alvast dank.

Met vriendelijke groet,

██████████
Uitvoeringsexpert

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl

Van: ██████████
Verzonden: woensdag 12 april 2017 15:42
Aan: 'Info-zbo'
Onderwerp: RE: NTS aanvraag AVD9070020171164

Let op, in de bijlage van deze e-mail, verzonden door ██████████ is een macro aangetroffen. Macro's kunnen misbruikt worden om malware op uw systeem te installeren. Open de bijlage alleen als de e-mail afkomstig is van een door u vertrouwde afzender.

Indien dit niet het geval is dient u deze e-mail direct te verwijderen zonder de bijlage te openen.

DICTU Servicedesk

Ls,
Hartelijk dank voor de telefonische terugkoppeling, bijgevoegd de geupdate versies,
Met vriendelijke groet/Best regards,

██████████



██████████
██████████
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 11 april 2017 15:38
Aan: ██████████
CC: ██████████
Onderwerp: NTS aanvraag AVD9070020171164

Geachte ██████████

De CCD heeft uw aanvraag met nummer AVD9070020171164 en titel 'Onderzoek naar de biodistributie van nieuwe, op oligonucleotiden gebaseerde, teststoffen voor de behandeling van de ziekte van Hurler' besproken.

Voordat we de beschikking naar u toe kunnen sturen hebben we een nieuwe versie van de Niet-technische samenvatting nodig waarin minder vaktechnische woorden worden gebruikt. De NTS moet begrijpelijk voor het brede publiek zijn. Woorden zoals: oligonucleotiden, RNA, mucopolysacharidose, glucosaminoglycanen, immunogeniciteit enz. zijn te technisch voor het publiek.

Daarnaast schrijft u onder kopje 4.2 Vermindering: 'Er worden altijd het maximale aantal dieren gebruikt dat nodig is'. Bedoelt u niet 'het minimale aantal dieren'? In de wet staat dat het minimum aantal dieren nodig om een uitspraak te kunnen maken mag worden gebruikt.

Graag ontvangen we een nieuwe NTS die op een meer voor de leek begrijpelijke manier is geschreven en waarin de hierboven genoemde zin is aangepast.

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort totdat we de nieuwe NTS hebben ontvangen.

Met vriendelijke groet,


Uitvoeringsexpert

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

.....
T: 0900 2800028
E: info@zbo-ccd.nl

[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
AVD9070020171164
Bijlagen
1

Datum 12 april 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 

Op 23 maart 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Onderzoek naar de biodistributie en de effectiviteit van nieuwe, op oligonucleotiden gebaseerde, teststoffen voor de behandeling van het Hurler syndroom." met aanvraagnummer AVD9070020171164. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 12 april 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. U heeft een aangepaste versie van de Niet-technische samenvatting ingediend en het aantal dieren in bijlage dierproeven 2 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 10a1, lid 2 van de wet, zijn er algemene voorwaarden gesteld.

U kunt met uw project "Onderzoek naar de biodistributie en de effectiviteit van nieuwe, op oligonucleotiden gebaseerde, teststoffen voor de behandeling van het Hurler syndroom." starten. De vergunning wordt afgegeven van 12 april 2017 tot en met 31 maart 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 Rug/ UMCG gevoegd. Dit advies is opgesteld op 17 maart 2017. 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:

12 april 2017

Aanvraagnummer:

AVD9070020171164

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:



Algemeen Secretaris

Bijlagen:

- Vergunning
- Hiervan deel uitmakend:
 - DEC-advies
 - Weergave wet- en regelgeving

Datum:
12 april 2017
Aanvraagnummer:
AVD9070020171164



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 12 april 2017 tot en met 31 maart 2022, voor het project "Onderzoek naar de biodistributie en de effectiviteit van nieuwe, op oligonucleotiden gebaseerde, teststoffen voor de behandeling van het Hurler syndroom." met aanvraagnummer AVD9070020171164, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Rug/ UMCG. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED] and operations.
De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 23 maart 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 23 maart 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 12 april 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 17 maart 2017, ontvangen op 23 maart 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 12 april 2017

| Naam proef | Diersoort/ Stam | Aantal dieren | Ernst | Opmerkingen |
|--|--|---------------|---------------|-------------|
| 3.4.4.1 Fluorescentie studie in de wildtype muis. | | | | |
| | Muizen (Mus musculus) / | 800 | 100% Matig | |
| 3.4.4.2 Doseerstudie Hurler muis. | | | | |
| | Muizen (Mus musculus) / Idua-W392X muis | 1.200 | 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.

Aanvraagnummer:
AVD9070020171164

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:

AVD9070020171164

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 onvereenigbaar 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:

AVD9070020171164

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.

| Inventaris Wob-verzoek W17-09 | | | | | | | | | |
|-------------------------------|--|-----------------|------|--------|-------|-------------------|--------|--------|------|
| | | wordt verstrekt | | | | weigeringsgronden | | | |
| nr. | document | reeds openbaar | niet | geheel | deels | 10.1.c | 10.2.e | 10.2.g | 11.1 |
| | NTS20171245 | | | | | | | | |
| 1 | Aanvraagformulier | | | | x | | x | x | |
| 2 | Projectvoorstel oud | | | | x | | x | x | |
| 3 | Niet-technische samenvatting oud | | | x | | | | | |
| 4 | Bijlage beschrijving dierproeven 1 oud | | | | x | | x | x | |
| 5 | Bijlage beschrijving dierproeven 2 oud | | | | x | | | x | |
| 6 | Bijlage beschrijving dierproeven 3 oud | | | x | | | | | |
| 7 | Bijlage beschrijving dierproeven 4 oud | | | x | | | | | |
| 8 | DEC-advies | | | | x | | x | x | |
| 9 | Ontvangstbevestiging | | | | x | | x | x | |
| 10 | Verzoek aanvulling aanvraag | | | | x | | x | x | |
| 11 | Projectvoorstel nieuw | | | | x | | x | x | |
| 12 | Bijlage beschrijving dierproeven 1 nieuw | | | | x | | x | x | |
| 13 | Bijlage beschrijving dierproeven 2 nieuw | | | | x | | | x | |
| 14 | Bijlage beschrijving dierproeven 3 nieuw | | | | x | | | x | |
| 15 | Bijlage beschrijving dierproeven 4 nieuw | | | | x | | | x | |
| 16 | Niet-technische samenvatting nieuw | x | | | | | | | |
| 17 | Advies CCD | | x | | | | | | x |
| 18 | Beschikking en vergunning | | | | x | | x | x | |



Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

- U bent van plan om één of meerdere dierproeven uit te voeren.
- Met dit formulier vraagt u een vergunning aan voor het project dat u wilt uitvoeren. Of u geeft aan wat u in het vergunde project wilt wijzigen.
- Meer informatie over de voorwaarden vindt u op de website www.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 | 10500 |
| | | <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 | Rijksuniversiteit Groningen |
| | | Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde | [REDACTED] |
| | | KvK-nummer | 1179037 |
| 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 | A. Deusinglaan 1 [REDACTED] |
| | | Postbus | |
| | | Postcode en plaats | 9713AV Groningen |
| | | IBAN | NL45ABNA0474567206 |
| 1.4 | Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker. | Tenaamstelling van het rekeningnummer | Rijksuniversiteit Groningen |
| | | (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 | <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 - 4 - 2017 |
| Einddatum | 1 - 4 - 2022 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Het verbeteren van uitkomst na niertransplantatie door gerichte interventie in het complement systeem.
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Het verbeteren van uitkomst na niertransplantatie door gerichte interventie in het complement systeem.
- 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] |
| E-mailadres | secrdec.umcg@umcg.nl |

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1684 Lege
- Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
- Via een eenmalige incasso
- Na ontvangst van de factuur
- Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*

5 Checklist bijlagen

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


6 Ondertekening


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

Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag


Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondergetekende verklaart:


- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
- dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
- dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
- dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
- dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.


Naam 

Functie 

Plaats Groningen

Datum 30-03-2017 

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

- 1.1 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

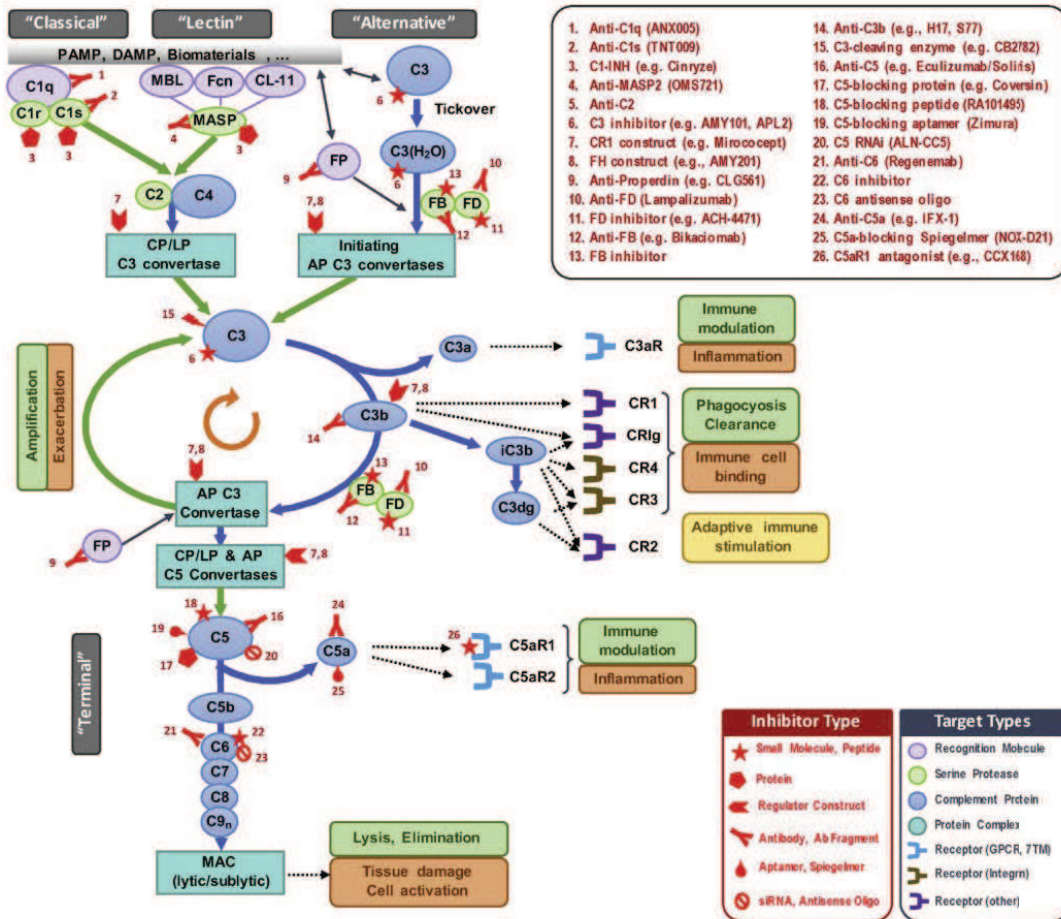
Licht het project toe. Beschrijf de aanleiding, de achtergrond en de context. Besteed aandacht aan de bij vraag 2 aangekruiste categorieën.

- 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.

Het succes van niertransplantatie op korte termijn is groot, maar veel donornieren gaan op lange termijn verloren. De kwaliteit van de nier vóór transplantatie speelt hierbij een grote rol. Vooral bij transplantatie met postmortale nieren is de kwaliteit verlaagd. Een mindere kwaliteit van de nier versterkt de schade die ontstaat tijdens de periode dat de nier niet doorbloed is en als de bloedtoevoer weer hersteld wordt tijdens de transplantatie (ischemie/reperfusie schade). Deze schade leidt tot een groter risico op het langzaam op gang komen van de nier (delayed graft function), op acute en chronische afstoting [Walport MJ. N Engl J Med 2001;344(14):1058-66]. Ontregeling van het complement systeem speelt een centrale rol in het ontstaan van deze schade in de [REDACTED]

[REDACTED] De resultaten laten zien dat de functie en overleving van nier transplantaten verslechterd als gevolg van complement activatie. Deze bevindingen plaatsen de rol van remming van het complement systeem in een nieuw perspectief. Om de functie en overleving van nier transplantaten te verbeteren is het nodig om nieuwe aangrijpingspunten te identificeren voor interventie; tijdens en voor de transplantatie en in de donor, en/of de ontvanger. De behandeling van complement gerelateerde nierziekten beruiste tot voor kort op zware afweer onderdrukkende medicatie, welke veel bijwerkingen gaven, waaronder systemische infecties. Proefdierstudies laten echter zien dat door gerichte interventie in het complement systeem deze bijwerkingen worden voorkomen. Daarnaast zijn deze gerichte interventies therapeutisch actief bij lage doseringen, wat ervoor zorgt dat een nieuwe groep aan geneesmiddelen in opkomst is. Dat deze proefdierstudies ook bruikbaar zijn in de kliniek blijkt uit het feit dat de eerste specifieke complement remmer inmiddels is geregistreerd onder de naam Eculizimab [Rother et al. Nature Biotechnology 2007;25:1256-64].

Het complement systeem is onderdeel van het aangeboren immuunsysteem, maar is ook betrokken bij de activatie van het verworven immuunsysteem. In totaal maken meer dan 30 eiwitten deel uit van het complement systeem. Activering van het complement systeem kan via drie routes: de klassieke route (door antistof complexen), de lectine route (door suikergroepen op ziekteverwekkers en beschadigde cellen van het eigen lichaam) en de alternatieve route (o.a. door oppervlaktemoleculen van bacteriën en apoptotische cellen). Alle drie de routes leiden tot de activatie van complement component 3 (C3). Na C3-activering kan de terminale route worden geactiveerd door de sequentiële activering van de componenten C5 tot C9. Samen vormen deze componenten een complex, het 'membrane attack complex', dat een porie vormt in de celwand, zodat deze lyseert [Ricklin et al. Nat Immunol 2010;11(9):785-797, Walport MJ. N Engl J Med 2001;344(14):1058-66]. Gezien de efficiëntie van het complement systeem is een strikte controle nodig om schade aan eigen weefsel en de eigen cellen te voorkomen. Op verschillende niveaus van het activatieproces vindt daarom regulatie plaats. Er zijn twee type regulatoren te onderscheiden: eiwitten in het plasma en eiwitten op het membraan van gastheercellen [Carroll et al. Adv Drug Del Rev 2011;63:965-75]. Samen zorgen deze complement regulerende eiwitten ervoor dat het complement systeem in evenwicht blijft. Dit evenwicht zorgt er enerzijds voor dat er (a) continu mogelijkheid is tot complement activatie en (b) anderzijds dat de complement activering een gecontroleerde reactie blijft [Zhang et al. J Clin Invest 1999;103(1):55-61]. Een ongecontroleerde activatie van het complement systeem, zowel up- als downregulatie, kan leiden tot destructie van circulerende bloedcellen of parenchymcellen en daarmee zorgen tot schade.



Figuur: Complement systeem – overzicht van alle complement componenten in zowel de drie activatieroutes van het complement systeem, als in de terminale pathway.

Deze recente bevindingen ondersteunen het idee dat met het gebruik van nieuwe interventiemethoden de bij niertransplantatie ontstane schade aan het transplantaat kan worden verminderd. Voor optimale toepassing van deze methoden is echter een beter begrip van de onderliggende mechanismen nodig en een volledige set van experimenten die de betrokken complement factoren en effecten van de middelen bepalen. Op deze manier kan de het succes van niertransplantatie de komende jaren sterk verbeteren.

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?

De hypothese luidt dat de activering van het complement systeem in de verschillende fasen van niertransplantatie: (1) in de donor, (2) tijdens preservatie, (3) tijdens transplantatie en (4) in de ontvanger resulteert in een verminderde transplantaatfunctie. Kortom: complement activatie vindt plaats van donor naar ontvanger. Hoewel onderzoek heeft aangetoond dat het complement systeem wordt op gereguleerd in al deze fasen, is het niet volledig opgehelderd wat het pathofysiologisch mechanisme hiervan is. Dit maakt het doel van onze studies tweeledig: (1) het onderzoeken van de pathofysiologische processen die ervoor zorgen dat het complement systeem tijdens al deze fasen van transplantatie wordt geactiveerd. (2) Het onderzoeken van verschillende interventiemethoden in het complement systeem om ervoor te zorgen dat nierschade tijdens niertransplantatie verminderd.

Hierdoor hebben wij de volgende onderzoeksvragen:

Hoofdvraag: Welke rol speelt het complement systeem bij de nierschade die ontstaat rondom niertransplantatie?

Deelvragen:

- Welk pathofysiologisch mechanisme speelt het complement systeem in niertransplantatie?
- Welke interventies in het complement systeem leiden tot een vermindering van nierschade tijdens niertransplantatie?

Haalbaarheid:

Om onze onderzoeksvragen te kunnen beantwoorden maken we gebruik van verschillende (dier)modellen, die elk een stap tussen de donor naar ontvanger vormen, namelijk:

1. Hersendoodinductie: We hebben uitgebreide expertise in het induceren van hersendood. Dit is geoptimaliseerd op ons eigen lab (de biotechnici) in samenwerking met het microchirurgisch team van de CDP.

2. Preservatie: Op het gebied van preservatie heeft onze onderzoeksgroep uitgebreide expertise. Verschillende organen uit verschillende species kunnen op ons lab worden geperfundeerd. Hierbij zullen we ons vooral richten op het perfusiemodel en minder op de cold storage van nieren.

3. Ischemie/Reperfusieschade: Met het ischemie/reperfusie model hebben onze biotechnici uitgebreide ervaring in samenwerking met het microchirurgisch team van de CDP.

4. Transplantatie: Op het gebied van niertransplantatie werken we samen met het microchirurgisch team van de CDP. Het microchirurgisch team kan ons bijstaan in het uitvoeren van dit model.

Al het benodigde apparaat is aanwezig op al dan niet ons lab of de CDP. Daarnaast hebben we een breed scala aan immunohistochemische en moleculaire technieken tot onze beschikking om complement componenten tot in detail te kunnen onderzoeken.

3.3 Belang

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

Niertransplantatie is de eerste keus behandeling voor patiënten met eindstadium nierfalen. Echter sterven er nog steeds patiënten die op de wachtlijst staan door het tekort aan orgaandonoren. De lange termijn overleving van donornieren is afhankelijk van verschillende factoren zoals:

- 1. De donor: levende versus postmortale donatie
 - 2. Preservatie: cold storage versus perfusie
 - 3. Transplantatie: warme en koude ischemietijden
 - 4. De ontvanger: wel of geen rejectie
- } Kortom: van donor naar ontvanger.

Remming van het complement systeem zal dan ook leiden tot een verbeterde transplantaatfunctie en overleving. Een groot probleem in het interveniëren in het complement systeem door middel van de 'oude' geneesmiddelen ten opzichte van onze huidige ideeën is significante remming van het systemisch circulerende complement. Omdat het complement systeem een onderdeel is van het aangeboren immuunsysteem speelt het complement systeem een belangrijke rol bij het voorkomen van infecties en ontstekingen in het lichaam. Het systemische remmen van het complement systeem, zoals de 'oude' geneesmiddelen doen, heeft dan ook als gevaar het risico op het ontstaan van infecties.

Een intact complement systeem is een voorwaarde voor een immuun competente toestand. Toename van kennis over complementeiwitten en over de regulatie van complement activering maken specifieke

interventie in het complement systeem mogelijk, zoals specifieke en selectieve remming van het complement systeem. Recente ontwikkelde medicijnen interveniëren dan ook op een specifieke plek in het complement systeem en op een selectieve manier. Kortom niet alle complement eiwitten, maar een paar specifieke complement eiwitten. Plus niet in het hele lichaam, maar specifiek in een bepaald orgaan of op de plaats van ontsteking. Doordat deze middelen specifiek en selectief aangrijpen heeft dit als bijkomend voordeel dat deze middelen werkzaam zijn bij een therapeutisch lage dosering. Hierdoor zal het systemisch circulerende complement niet geheel worden geremd, waardoor het risico op het ontstaan van infecties niet wordt verhoogd. Ook onze onderzoeksgroep heeft laten zien dat gerichte interventie (gebruik van nieuwe methoden) in het complement systeem effectief is in het verbeteren van de nierfunctie zonder het uitlokken van systemische infecties of het verhogen van de infectiegevoeligheid [unpublished data].

3.4 Onderzoeksstrategie

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

Het doel van ons onderzoek is tweeledig: (1) het onderzoeken van de pathofysiologische processen die ervoor zorgen dat het complement systeem tijdens al deze fasen van transplantatie wordt geactiveerd (=mechanistisch). (2) Het onderzoeken van verschillende interventiemethoden in het complement systeem om ervoor te zorgen dat nierschade tijdens niertransplantatie verminderd (=functioneel).

Mechanistisch

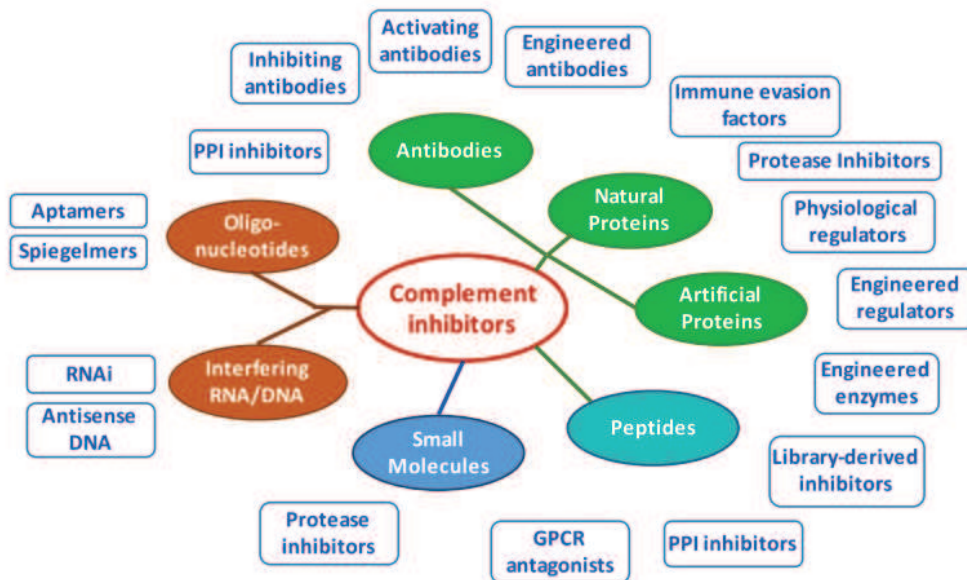
Om deelvraag (1) te kunnen beantwoorden zullen we kijken naar mechanismen van complement activatie. Om de mechanismen van complement activatie te onderzoeken maken we gebruik van KO-lijnen. Deze KO-lijnen worden gebruikt om te onderzoeken of het eiwit dat zij missen een rol speelt bij de activatie van het complement systeem. Secundair hieraan weten we aan de hand van dit onderzoek direct of deze eiwitten wel of niet een potentiële target bij interventie zijn. Momenteel heeft onze onderzoeksgroep 5 KO-lijnen beschikbaar in de CDP. Deze KO-lijnen representeren allen een ander onderdeel van het complement systeem.



Mochten een van de bovenstaande KO-lijnen niet worden gebruikt, dan zullen deze dieren ook niet worden gebruikt. Voor het gebruik van de KO-lijnen moet in vitro /in vivo data beschikbaar zijn over de potentie van deze lijnen.

Functioneel

Om deelvraag (2) te kunnen beantwoorden gaan we functioneel kijken naar de rol van het complement systeem. Hierbij zullen we op verschillende manieren in het complement systeem interveniëren. Onderstaand figuur geeft de mogelijke manieren van interventie in het complement systeem weer.



Figuur: overzicht van alle mogelijke middelen die specifiek in het complement systeem aangrijpen

De middelen die zullen worden gebruikt voor het interveniëren in het complement systeem moeten aan een aantal criteria voldoen:

- a. De middelen moeten specifiek aangrijpen op het complement systeem;
- b. De middelen moeten deels in vitro/in vivo zijn getest. Hieruit moet zijn gebleken dat deze middelen potentie hebben om het complement specifiek en effectief te kunnen remmen.

Bovenstaand zijn de mogelijke interventies, wanneer een van deze interventies niet wordt toegepast, zullen de hiervoor aangevraagde dieren niet worden gebruikt.

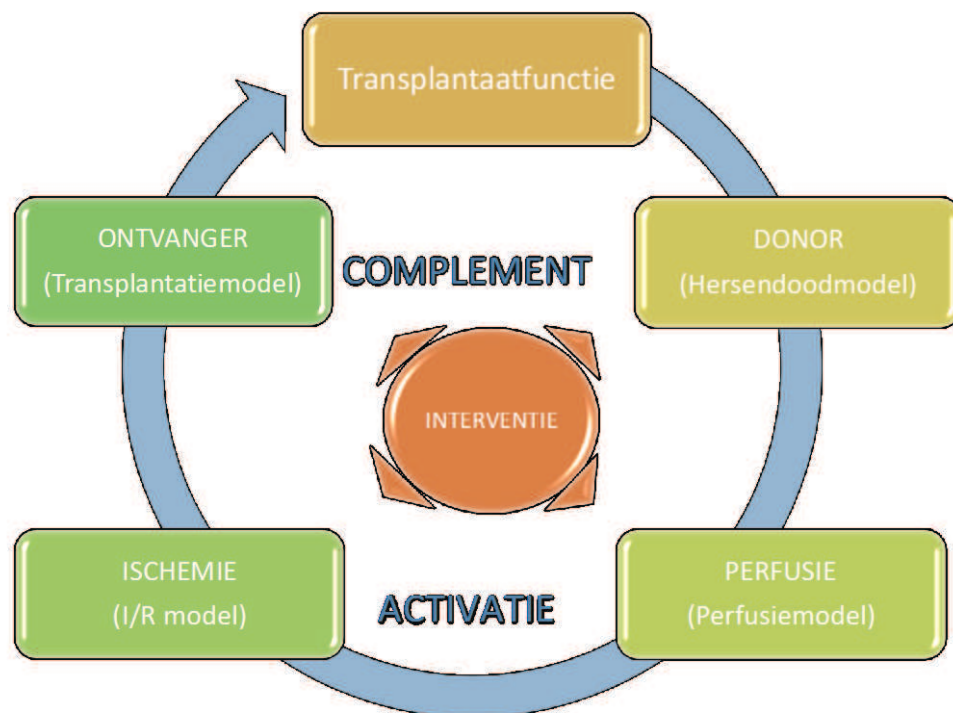
Zowel mechanistisch als functioneel willen we onderzoek doen in verschillende modellen. Elk van deze modellen simuleren een onderdeel van het transplantatieproces waarin het complement systeem wordt geactiveerd.

De modellen waarin mechanistisch en functioneel wordt gekeken zijn:

- Hersendoodinductie model – Bijlage 1
- Perfusiemodel – Bijlage 2
- Ischemie/Reperfusie model – Bijlage 3
- Transplantatiemodel – Bijlage 4

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

De modellen die worden gebruikt in ons project zullen niet altijd in onderstaande volgorde worden uitgevoerd. De reden hiervoor is dat in sommige modellen al een aantal mechanische en functionele onderzoeken zijn gedaan. Zo is er anno 2017 veel meer bekend over de rol van het complement systeem in ischemie/reperfusie dan in bijvoorbeeld hersendood. Met beide argumenten houden we rekening in de uitvoering van onze experimenten. De belangrijkste uitkomstparameter voor alle modellen is nierschade, gemeten aan de hand van inflammatiemarkers en nierfunctie.



Figuur: Van donor naar ontvanger vinden er tijdens transplantatie een aantal processen plaats die ieder op zichzelf staand (maar ook cumulatief) van invloed zijn op de transplantaatfunctie. Onze onderzoeksgroep heeft aangetoond dat het complement systeem tijdens al deze bovengenoemde stappen wordt geactiveerd. Zo zien we in de donor dat een hersendode donor significant meer complement depositie in de nier heeft vergeleken met een levende of hartsdode donor. Daarnaast zijn er verschillende perfusiemodellen welke allen in andere mate het complement systeem activeren. Zoals eerder onderzoek heeft laten zien wordt er tijdens ischemie/reperfusie ook complement geactiveerd doordat de epitheelcellen in de nier als gevolg van ischemie/reperfusie meer gevoelig worden voor complement activatie. Daarnaast zorgt complement activatie in de donor na transplantatie voor het aantrekken van afweercellen in de ontvanger. Kortom van donor tot ontvanger, in elke stap wordt het complement systeem geactiveerd met als gevolg een verminderde transplantaatfunctie. Onze diermodellen representeren en modelleren de stappen van donor en ontvanger en zijn daarom geschikte modellen om de mechanistische en functionele rol van het complement systeem te onderzoeken.

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.

Fasering:

❖ **Alle modellen**

Voor nieuwe middelen zal, voor zover noodzakelijk, eerst bekend moeten zijn wat het te verwachten effect is en de daarmee gepaard gaande bijwerkingen. Eventueel zal dit met in vitro werk worden gedaan of worden gebaseerd op eerdere literatuur. In de volgende fase zullen de nieuwe middelen worden toegepast in de eerder genoemde in vivo modellen.

❖ **Transplantatiemodel**

Voor het transplantatie model (bijlage 4) geldt dat het mechanistische/functionele experiment eerst moet zijn uitgevoerd in een ander model (beschreven in bijlage 1, 2 en 3) eventueel op basis van valide literatuurreferenties. Het tweede keuze moment (NO GO) zal zijn dat de methoden niet worden toegepast op het transplantatiemodel als uit een eerder model negatieve resultaten zijn verkregen.

Mijlpalen - Algemene GO/NO GO momenten:

GO/NO GO 1 - werkzaamheid middel: Door middel van pilot experimenten zal zo nodig worden onderzocht wat de juiste dosering van de nieuwe middelen moet zijn en/of de interventie strategie werkzaam is. Dit kan betekenen dat een middel ook eerst getest kan worden zonder de toepassing van een model. Dit om te kijken of het middel in vivo dezelfde uitkomsten geeft dan in vitro. Als zonder het toepasbare model blijkt dat het middel al niet werkzaam is, zal dit middel niet worden gebruikt in een model.

GO/NO GO 2 – ongerief dieren: Daarnaast zal in het pilot experiment worden gekeken hoe het ongerief van de dieren kan worden gereduceerd. Het keuze moment bij elk experiment is de uitkomst van het al dan niet uitgevoerde pilot experiment. Als uit het pilot experiment blijkt dat het ongerief van de dieren proportioneel hoog is of de dosis van de nieuwe middelen onverantwoord zijn, zal dit middel niet worden gebruikt. Dit zelfde geldt voor de KO-lijnen.

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

| Volgnummer | Type dierproef |
|------------|--------------------------|
| 1 | Hersendoodinductiemodel |
| 2 | Preservatietechnieken |
| 3 | Ischemie/Reperfusiemodel |
| 4 | Transplantatiemodel |
| 5 | |
| 6 | |
| 7 | |
| 8 | |
| 9 | |
| 10 | |



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.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

| | |
|------------------------------|--|
| 1.1 Titel van het project | Het verbeteren van uitkomst na niertransplantatie door gerichte interventie in het complement systeem. |
| 1.2 Looptijd van het project | 5 jaar |
| 1.3 Trefwoorden (maximaal 5) | Niertransplantatie, complement systeem, interventie |

2 Categorie van het project

| | |
|--|---|
| 2.1 In welke categorie valt het project. <i>U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.</i> | <input checked="" type="checkbox"/> Fundamenteel onderzoek |
| | <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 de gezondheid |
| | <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 Projectbeschrijving

| | |
|---|---|
| 3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang) | Het succes van niertransplantatie op korte termijn is groot, maar veel donornieren gaan op lange termijn verloren. De kwaliteit van de nier voor transplantatie speelt hierbij een grote rol. Vooral bij transplantatie met postmortale nieren is de kwaliteit verlaagd. Een mindere kwaliteit van de nier versterkt de schade die ontstaat door de periode dat de nier niet doorbloed is en weer doorbloed raakt tijdens de transplantatie (ischemie/reperfusie schade). Deze schade leidt tot groter risico op het langzaam op gang komen van de nier (delayed graft function), op acute afstoting en op chronische afstoting. Ontregeling van het complementsysteem speelt een centrale rol in |
|---|---|

het ontstaan van deze schade in de nier. Dierexperimenteel onderzoek heeft laten zien dat het complementsysteem geactiveerd wordt in alle fasen rondom niertransplantatie: de donor, tijdens preservatie, tijdens transplantatie en in de ontvanger. Deze complementactivatie verslechtert de functie en overleving van de nieren. Het is daarom belangrijk om nieuwe interventie mogelijkheden, welke aansturen op het complementsysteem, te onderzoeken. Dit draagt bij aan het verbeteren van niertransplantaatfunctie op lange termijn.

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

Het doel van onze studie is om de functie van het niertransplantaat te verbeteren door gericht en effectief te targeten in het complementsysteem. Hierdoor zullen we uiteindelijk een bijdrage kunnen leveren in het verbeteren van de nierfunctie na transplantatie op lange termijn.

Daarnaast zullen we door het onderzoeken van de interventiemogelijkheden ook meer kennis vergaren over de exacte rol van het complementsysteem in niertransplantatie.

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

De experimenten worden uitgevoerd in muizen en ratten. Het project bestaat uit vier delen, welke elk een deel van het transplantatieproces vertegenwoordigen. Het totale aantal dieren is 2740 voor dit hele project.

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

De verwachte negatieve gevolgen zijn afhankelijk van het gebruikte model. In twee van onze modellen kan het welzijn van de dieren worden aangetast. Door middel van standaardisatie van de procedures en het gebruiken van ervaren biotechnici wordt het ongerief zo laag mogelijk gehouden. Bij overschrijding van het vooraf ingeschatte ongerief zullen passende maatregelen worden genomen.

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

Het zwaarste ongerief is 'ernstig'. Het zwaarste ongerief zal bij ongeveer 19% van de dieren plaatsvinden. Overige dieren ondervinden matig (=19%), licht (41%) of geen (=terminaal) (21%) ongerief.

3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?

Om de nieren te kunnen analyseren zullen organen, bloed en urine worden verzameld. De dieren zullen daarom als onderdeel van het experiment worden gedood.

4 Drie V's

4.1 **Vervanging**
Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije

Het onderzoeken van het effect van gerichte interventie in het complementsysteem op nier transplantaatfunctie kan tot op heden alleen worden bestudeerd door middel van dierexperimenteel onderzoek. Tot nu toe zijn er geen modellen die ons in staat stellen de complexiteit van onze

alternatieven niet gebruikt kunnen worden.

vraagstelling in vitro goed te bestuderen.

4.2 **Vermindering**

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

Door middel van statistische testen zal vooraf worden bepaald hoeveel dieren nodig zijn om toeval van de resultaten uit te sluiten. Om het aantal dieren te verminderen zullen we alleen diermodellen gebruiken waar onze biotechnici voldoende ervaring mee hebben opgedaan. Hierdoor wordt de kans op spreiding van de resultaten verminderd. Daarnaast zullen we factoren die van invloed zijn op de uitkomst zoveel mogelijk standaardiseren, zodat het benodigde aantal dieren wordt beperkt.

4.3 **Verfijning**

Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diermodel(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.

De experimenten worden uitgevoerd in muizen en ratten. Voor allebei de diersoorten hebben we goede diermodellen die de humane situatie goed nabootsen. We gebruiken muizen, omdat in muizen transgenese kan worden toegepast. Wat ons in staat stelt de rol van een specifiek gen op de nier transplantaatfunctie te onderzoeken. Daarnaast gebruiken we ratten, omdat het in ratten mogelijk is niertransplantaties uit te voeren, waardoor we de humane situatie exact nabootsen. Hierdoor zijn we in staat onze resultaten goed te kunnen transleren naar de humane situatie.

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

In alle diermodellen is er sprake van adequate verdoving en pijnbestrijding. Hierdoor zullen de dieren geen pijn of angst ervaren tijdens de experimenten of tijdens het termineren.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen



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. | 10500 | |
| 1.2 | Vul de naam van de instelling of organisatie in. | Rijksuniversiteit Groningen | |
| 1.3 | Vul het volgnummer en het type dierproef in. | Volgnummer | Type dierproef |
| | | 3.4.4.1. | Hersendoodinductiemodel |

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.

Hoewel het aantal donornieren gedoneerd door levende en hartdode donoren toeneemt, wordt echter nog een substantieel deel van de donornieren verkregen via hersendode donoren. Donornieren van hersendode donoren geven inferieure resultaten in vergelijking met donatie bij leven of na hartdood [Terasaki et al. N Engl J Med 1995;10;333(6):333-336]. Een van de factoren die hiervoor predisponeert is de activatie van het complement systeem in hersendood. Geactiveerde complement componenten zorgen voor het ontstaan van een ontstekingsreactie in de nier. Deze hersendood geïnduceerde renale inflammatie zorgt voor schade van het transplantaat, met verslechtering van de nierfunctie als gevolg [redacted]

Keuze hersendoodinductiemodel:

Het hersendoodinductie model maakt het mogelijk zowel de mechanistische als functionele rol van het complement systeem te bestuderen. Het Ons model simuleert de humane hersendood situatie in die zin dat er een vergelijkbare mate van schade en daarmee inflammatie wordt veroorzaakt na hersendoodinductie als humaan gezien. Dit zorgt ervoor dat ons model een optimale face validity heeft.

Uitkomstparameters:

De uitkomstparameters in het hersendoodinductie model zijn de nierfunctie en mate van nierschade. Wij hebben voor deze uitkomstparameters gekozen omdat deze parameters in de humane situatie ook als maatstaf voor nierfunctie worden gebruikt. Daarnaast is in eerder onderzoek aangetoond dat de interleukine-6 expressie de meest uitgesproken inflammatoire marker in hersendood is, welke 60-100 maal is verhoogd in hersendode diermodellen [redacted]. De nierfunctie zal worden gemeten aan de hand van de hoeveelheid creatinine en ureum in het plasma. De mate van nierschade wordt bepaald aan de hand van de mate van inflammatie, waarbij interleukine expressies worden bepaald.

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.

Opzet:

Bij adequaat geanestheseerde dieren zal hersendoodinductie plaatsvinden. Hersendood zal worden geïnduceerd door een ballonkatheter in de extradurale ruimte te plaatsen en op te blazen. De manier waarop hersendood wordt geïnduceerd zorgt ervoor dat dezelfde mate van inflammatie wordt bereikt als bij de humane hersendode donoren. Hersendood wordt vastgesteld middels de afwezigheid van een adem prikkel en het verloop van de bloeddruk. Na hersendood zal de anesthesie stoppen en zullen de dieren worden geventileerd. De dieren worden tot maximaal 4 uur na hersendoodinductie gemonitord om vitale functies te meten. Hierna zullen de dieren worden getermineerd. Bloed, urine en organen worden verzameld en opgeslagen.

| Experiment (fases) | Hersendoodinductie | Monitoring | Terminatie + opslag |
|--------------------|--------------------|------------|---------------------|
| Tijdsbeloop (min) | T0-T30 | T30-T270 | T270 |

Niet aangegeven in tabel: Wanneer nieuwe middelen worden getest zal dit zowel voor als na de hersendoodinductie kunnen worden gedaan.

De reden dat nieuwe middelen voor hersendoodinductie worden toegediend is gebaseerd op het principe van 'proof of principle', zodat we er zeker van zijn dat het middel op de juiste plek komt, in de juiste tijdspanne. Dit omdat in de humane situatie de hersendode donor vaak 12-16 uur hersendood is voor donatie. Hierdoor is er genoeg tijd om in deze tijdspanne een medicijn toe te dienen welke op de juiste plaats komt. In ons model werken we echter met modellen waarin maximaal 4 uur hersendood plaatsvindt, waardoor het medicijn wellicht niet genoeg tijd heeft op de juiste plaats in het lichaam te komen. Hierdoor dienen we als 'proof of principle' het medicijn voor hersendood toe, gebaseerd op de halfwaardetijd van het middel. Tijdstip van toediening is daarom afhankelijk van de halfwaardetijd van het medicijn. Toedieningsweg wordt eveneens bepaald door type medicijn. Dit kan oraal, intraveneus, intramusculair, subcutaan of intra peritoneaal zijn.

Hersendood: rat versus muis

De hersendoodinductie in ratten en muizen is overeenkomstig. De manier waarop hersendood wordt geïnduceerd is hetzelfde in beide species. Het enige verschil is dat het hersendoodmodel in de rat 4 uur duurt en in de muis 3 uur. De reden voor dit verschil is dat muizen een sneller metabolisme hebben en het effect van 3 uur hersendood daarmee overeenkomstig is met het 4 uur durende hersendoodmodel in de muis

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

Op basis van eerdere experimenten kunnen we voor de meeste primaire uitkomstmaten een te verwachten effectgrootte voorspellen. Door middel van powercalculaties wordt daarmee het aantal dieren beperkt. Daarnaast zal door middel van standaardisatie de variatie worden beperkt en daarmee het aantal benodigde dieren tot een minimum worden beperkt.

B. De dieren

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

Diersoorten: Muizen en ratten. Zowel wildtypes als genetisch gemodificeerde dieren. Muizen worden gebruikt omdat genetische modificatie veelgebruikt en makkelijker te bewerkstelligen is in muizen, zoals KO modellen. Beide, zowel muizen en ratten, worden gebruikt voor de overige medicatie types beschreven in de bijlage Projectvoorstel.

Herkomst: Aankoop van commerciële, erkende leveranciers of andere instellingen. Via samenwerkingsverbanden of eigen fok. Momenteel hebben we 5 genetisch gemodificeerde foklijnen in de CDP in Groningen, benoemd in het projectvoorstel. De herkomst van de dieren zal afhangen van de onderzoeksvraag.

Levensstadia: Volwassen dieren. (ook de grootste humane groep).

Geschatte aantallen: Het hersendoodmodel zal gebruikt worden voor zowel mechanistische als functionele vraagstellingen. Op basis van poweranalyse zullen per groep 10 dieren worden aangevraagd, waarbij er maximaal 4 groepen in een experiment zitten. De inclusie van 8 dieren per groep is met een power van 80% en een standaarddeviatie van 10% voldoende [α 0.05]. Echter houden wij rekening met een additionele

uitval van maximaal 20% per groep, wat neer komt op 2 extra dieren per groep en daarmee dus 10 dieren per groep.

Uitval:

De uitval van maximaal 20% is gebaseerd op onze eerdere ervaringen met het hersendoodinductie model, waarbij uitval werd veroorzaakt door bijvoorbeeld overbelasting van het hart. Overbelasting van het hart wordt veroorzaakt doordat de dieren tijdens de 3-4 uur hersendoodperiode hemodynamisch stabiel worden gehouden met volume expanders in combinatie met vasoconstrictoren. Hierbij zien we soms dat de dieren vroegtijdig overlijden. Onze gegevens laten zien dat dit niet het gevolg is van overvulling of dat er een samenhang is met de hoeveelheid plasma expander die wordt toegediend, dit is dus het gevolg van individuele gevoeligheid voor de verschillende pathofysiologische processen geïnduceerd door hersendood. De procedure kent een maximale hoeveelheid plasma expander en vasoconstrictoren welke mogen worden toegediend.

Daarnaast vragen wij nog pilotdieren aan. Met de pilot kan de toedieningsweg, tijd van toediening en dosering van de medicatie worden getest. Dit al dan niet in combinatie met de hersendoodinductie (afhankelijk van de vraagstelling). Per experimentele groep vragen wij n=4 aan). Wanneer een pilot niet nodig is, zullen de pilotdieren niet worden gebruikt.

Opzet experiment:

| Diersoort | [A] pilotdieren | [B] max aantal groepen per pilot | [C] Aantal dieren per groep + uitval | [D] Max aantal groepen per experiment | [E] Aantal experimenten per jaar | [F] Totaal per jaar = [A]x[B]x[E] + [C]x[D]x[E] | Totaal 5 jaar = [F] x 5 |
|---------------|-----------------|----------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------|---|-------------------------|
| Muizen | 4 | 4 | 10 | 4 | 1 | 56 + | 280 + |
| Ratten | 4 | 4 | 10 | 4 | 2 | 96 + | 480 + |
| Totaal | | | | | | 152 = | 760 = |

Per jaar worden gemiddeld 3 hersendoodexperimenten in ratten en muizen uitgevoerd. Dit brengt het totaal op **152** dieren per jaar. Voor 5 jaar zijn dit **760** dieren.

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.

Vervanging: Tot op heden is er geen goede vervanging van het hersendoodinductiemodel door middel van in vitro experimenten. Hedendaags is er wel een brain slice model, waarbij gekeken kan worden naar het effect op hersencellen zelf. Echter is onze primaire uitkomstmaat nierfunctie en nierschade. Om dit te onderzoeken is het noodzakelijk een proefdiermodel te gebruiken. Door middel van in vitro experimenten wordt voorwerk verricht over de te verwachten effecten van de nieuwe middelen/strategieën.

Vermindering: Wij reduceren het aantal dieren door vooraf uitgevoerde powercalculaties. Meer dieren zullen tijdens het experiment niet worden gebruikt. Daarnaast zullen onze biotechnici de omstandigheden tijdens de proef optimaal houden, waardoor variatie wordt gereduceerd en daarmee het aantal benodigde dieren. Hoewel het effect van complementinterventie na hersendood op nierfunctie onze primaire uitkomstmaat is in dit model, zullen ook andere organen worden uitgenomen. Hierdoor zullen in de toekomst secundaire uitkomstmaten kunnen worden geanalyseerd, zonder dat er nieuwe experimenten moeten worden uitgevoerd.

Verfijning: Tijdens het hersendoodinductiemodel wordt gezorgd voor adequate algehele anesthesie. Tijdens de anesthesie zal door middel van adequate controle en monitoring van de dieren worden getracht het vooraf vastgestelde ongerief niet te overschrijden.

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.

De hersendoodinductie zal plaatsvinden onder adequate algehele anesthesie. Tijdens het boren van een gat in de schedel zal lokaal lidocaïne worden gegeven. Door middel van adequate controle en monitoring van de dieren zal het vooraf vastgestelde ongerief niet worden overschreden.

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.

Het hersendoodinductie model is een specifiek model ontwikkelt en operationeel gemaakt door onze eigen biotechnici. Over de wereld zijn maar een paar onderzoeksgroepen die dit hersendoodinductie model gebruiken. De toepassing van interventies specifiek gericht op het complement systeem op dit hersendoodinductie model is dan ook uniek in de wereld en wordt alleen toegepast door onze eigen onderzoeksgroep.

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.

Hersendood wordt onder algehele anesthesie geïnduceerd. Daarnaast zal lokaal lidocaïne worden toegediend ter preventie van pijn tijdens het boren van een opening in de schedel.

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.

Niet van toepassing

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

Niet van toepassing

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.

- Overbelasting van het hart (kan complicatie van hersendood zijn, in dergelijke gevallen wordt de proef gestopt)
- Gewichtsverlies van meer dan 15%
- Inactiviteit van het dier
- Conditie van de vacht
- Ontstekingsverschijnselen
- Bijwerkingen injecties

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

Dit hangt onder andere af van het gebruik van wildtype dieren of genetisch gemodificeerde dieren. Op basis van eerder uitgevoerde experimenten met dit hersendoodinductie model wordt het percentage geschat op 10-20% uitval. De verwachte ongerief op basis van de injecties is 'licht' en kwantitatief zeer laag (<2%). Dit is op basis van onze eerdere ervaringen met het geven van dergelijke injecties voor/na hersendood.

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.

Injecties: Licht

Hersendoodinductie: Terminaal

Totaal: Licht

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.

Uitname van organen is noodzakelijk voor het bereiken van de primaire eindpunten.

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. | 10500 | |
| 1.2 | Vul de naam van de instelling of organisatie in. | Rijksuniversiteit Groningen | |
| 1.3 | Vul het volgnummer en het type dierproef in. | Volgnummer | Type dierproef |
| | | 3.4.4.2 | Preservatietechnieken |

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.

De kwaliteit en levensduur van het transplantaat lijken voor een belangrijk deel bepaald te worden door de omstandigheden waarin de organen worden gepreserveerd. Tot voor kort werden donornieren gespoeld met een koude, zuurstofloze vloeistof. Vervolgens werden ze verpakt en op ijs gezet en zo snel mogelijk naar het ziekenhuis van de ontvanger gebracht. De koeling op ijs zorgt ervoor dat het metabolisme van het orgaan bijna volledig stil komt te liggen. Dat beperkt de schade aan het orgaan. Ondanks dat deze methode 30 jaar is gebruikt, is de methode zelf vrij grof. Goede organen die overleven dit proces, die kunnen tegen een stootje. Maar organen die enigszins beschadigd uit de donor komen, kunnen veel minder hebben, wat gevolgen kan hebben voor de transplantaatfunctie. Een nieuwe techniek is de machinale preservatie, ook wel perfusie genoemd. Hierbij worden de organen gespoeld met zuurstofrijke vloeistof en blijven die tijdens de bewaring continu rondpompen. Het orgaan wordt daarbij niet altijd meer gekoeld. Deze methode houdt de kwaliteit van organen als de nier beter in stand. Vandaar dat onderzoek naar het effect van perfusiemethoden en het ontwikkelen van nieuwe perfusiemethoden belangrijk is.

Keuze perfusiemodel:

We hebben gekozen voor het perfusiemodel omdat deze techniek relatief nieuw en veelbelovend is. Op ons lab zijn de perfusiemodellen geoptimaliseerd voor meerdere organen. Het model van deze pompen is gebaseerd op de humane situatie, waardoor de resultaten goed zijn te vergelijken met de humane perfusiemodellen. Momenteel hebben we voor meerdere organen een perfusiemodel: long, lever en nieren.

Primaire uitkomstparameters:

De uitkomstparameters zijn de nierfunctie en mate van nierschade. Wij hebben voor deze

uitkomstparameters gekozen omdat deze parameters in de humane situatie ook als maatstaf voor nierfunctie worden gebruikt. De nierfunctie zal worden gemeten aan de hand van de hoeveelheid creatinine en ureum in het urine. De mate van nierschade wordt bepaald aan de hand van de mate van inflammatie, waarbij interleukine expressies worden bepaald. Omdat onze primaire uitkomstparameters in urine worden bepaald zal urineproductie ten tijde van machineperfusie noodzakelijk zijn.

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.

Opzet:

Onder algehele anesthesie vindt dubbelzijdige nefrectomie plaats. Hierbij wordt de ureter vrij geprepareerd en gecanuleerd. Vervolgens wordt de aorta caudaal van de arteria renalis vrij geprepareerd en gecanuleerd. De arteria renalis en de vena renalis worden vervolgens eveneens gecanuleerd. Hierna vindt de nefrectomie plaats en wordt het dier getermineerd. Bloed, urine en organen worden verzameld en opgeslagen.

Door middel van de canules wordt de nier aangesloten op de perfusiemachine. Hier wordt afhankelijk van de vraagstelling druk- of volume gereguleerd vloeistof door de nier gepompt. De vloeistofsamenstelling is afhankelijk van de vraagstelling en gestandaardiseerd in een vooraf uitgevoerd pilot experiment. Tijdens het gehele experiment, zowel pilot als interventie, wordt de geproduceerde urine opgevangen.

Afhankelijk van de vraagstelling zal al dan niet een medicijn worden toegevoegd aan de perfusievloeistof. Tijdstmoment is afhankelijk van de vraagstelling. Een pilotexperiment zal vooraf worden uitgevoerd om te bepalen wat de optimale dosering, toedieningstijd en werkzaamheid van het medicament in de perfusievloeistof is. Daarnaast is het wellicht nodig om de condities van de perfusiemachine te bepalen, hierbij moet worden gedacht aan het bepalen van de juist druk waarmee de vloeistof wordt rond gepompt of de hoeveelheid zuurstof in de perfusievloeistof. Dit zal niet voor elk experiment nodig zijn, maar afhankelijk zijn van de vraagstelling. In de pilot zullen dan minimaal 1 parameter en maximaal 3 parameters worden getest (zoals medicatieparameters, druk, zuurstofconcentratie, temperatuur, volume en priming (=additieven) van de vloeistof). In het daadwerkelijke interventie experiment zullen we vervolgens perfusie met interventie en perfusie zonder interventie (en eventueel cold storage) met elkaar vergelijken. Kortom, maximaal 3 preservatie condities.

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

Op basis van eerdere experimenten kunnen we voor de meeste primaire uitkomstmaten een te verwachten effectgrootte voorspellen. Door middel van powercalculaties wordt daarmee het aantal dieren beperkt. Daarnaast zullen interindividuele verschillen tussen de dieren zo klein mogelijk worden gehouden om variatie tussen de dieren te beperken en daarmee het benodigde aantal dieren zo klein mogelijk te houden.

B. De dieren

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

Diersoorten: Ratten. Zowel wildtypes als genetisch gemodificeerde dieren. De perfusiemodellen zijn alleen geoptimaliseerd en ontworpen voor ratten. De reden hiervoor is, is dat de nieren van muizen te klein zijn om te canuleren en aan te sluiten op de perfusiemachines.

Herkomst: Aankoop van commerciële, erkende leveranciers of andere instellingen. Via samenwerkingsverbanden of eigen fok. De herkomst van de dieren zal afhangen van de onderzoeksvraag.

Levensstadia: Volwassen dieren.

Geschatte aantallen: Het preservatiemodel zal worden gebruikt om zowel mechanistische als functionele vraagstellingen te beantwoorden. Op basis van poweranalyse zullen per groep 10 dieren worden aangevraagd. De inclusie van 8 dieren per groep is met een power van 80% en een standaarddeviatie van 10% voldoende [α 0.05]. Echter houden wij rekening met een additionele uitval van maximaal 20% per groep, wat neer komt op 2 extra dieren per groep en daarmee dus 10 dieren per groep. Deze uitval van maximaal 20% is gebaseerd op onze eerdere ervaringen met het perfusie model, waarbij uitval werd veroorzaakt door bijvoorbeeld een afwijkende anatomie of het niet produceren van urine door de nier tijdens perfusie (urine is een belangrijkste uitkomstparameter).

Opzet experiment:

PILOT EXPERIMENT:

Groep 1: Parameter 1 (n=3)

Groep 2: Parameter 2 (n=3)

Groep 3: Parameter 3 (n=3)

Totaal per pilot experiment: **9** dieren.

INTERVENTIE EXPERIMENT

Groep 1: Experimentele groep → Pomp met medicijn (n=10)

Groep 2: Experimentele groep → Pomp zonder medicijn (n=10)

Per experiment gemiddeld **20** dieren gebruikt.

| Diersoort | [A] Dieren per groep in pilot | [B] Groepen in pilot | [C] Aantal dieren per exp groep + uitval | [D] Aantal groepen/ Exp | [E] Aantal Exp per jaar | [F] Totaal per jaar [A]x[B]x[E] + [C]x[D] x[E] | Totaal 5 jaar [F] x 5 |
|---------------|-------------------------------|----------------------|--|-------------------------|-------------------------|--|-----------------------|
| Ratten | 3 | 3 | 10 | 2 | 4 | 116 | 580 |

Per jaar worden gemiddeld 4 preservatie experimenten in ratten uitgevoerd. Dit brengt het totaal op **116** dieren per jaar. Voor 5 jaar zijn dit **580** dieren.

Er zijn minder pilot dieren nodig wanneer de opzet van het experiment, dus de perfusie, niet anders is dan bij een eerder experiment. Hierbij hebben we het over pompinstellingen en controleparameters. Hetzelfde geldt voor de controle groepen van de interventie experimenten.

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.

Vervanging: Momenteel is er geen goede andere mogelijkheid om de mogelijkheden van de perfusiemachines te testen dan door middel van proefdieren. Nieuwe ontwikkelingen laten steeds meer mogelijkheden voor artificiële modellen zien, echter staan deze technieken nog zodanig in de kinderschoenen dat we daarmee niet de totale mogelijkheden van de perfusiemachine mee kunnen testen.

Vermindering: Zo min mogelijk dieren worden gebruikt door middel van powercalculatie en door het meenemen van ervaringen uit eerdere experimenten. Uitval tijdens de nefrectomie is laag, bij afwijkende anatomie van een nier kan waar mogelijk de andere nier worden gebruikt.

Verfijning: Door algehele anesthesie tijdens de dubbelzijdige nefrectomie wordt gestreefd naar optimale pijnbestrijding.

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.

Adequate algehele anesthesie.

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.

Voor zover bekend uit de literatuur wordt dit model nog niet toegepast om te kijken naar de invloed van het complementsysteem op nierfunctie.

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.

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.

n.v.t.

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

n.v.t.

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.

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

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.

Nefrectomie: Terminaal

Totaal: Terminaal

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.

Uitname van organen is noodzakelijk voor het bereiken van de primaire eindpunten.

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. | 10500 | |
| 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in. | Rijksuniversiteit Groningen | |
| 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in. | Volgnummer | Type dierproef |
| | 3.4.4.3 | Ischemie/Reperfusie model |

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.

Elke niertransplantatie gaat gepaard met ischemie/reperfusie (I/R) schade. Door het toenemende tekort aan donoren worden steeds vaker organen van marginale donoren gebruikt voor transplantatie, waarbij ook sprake is van hogere ischemietijden [Mange et al. N ENgl J Med 2001;344:726-31]. I/R schade kan acute en chronische transplantaatdisfunctie veroorzaken en uiteindelijk leiden tot het falen van het niertransplantaat. Kortom er is een toenemende behoefte aan interventies gericht op het verminderen van I/R schade in de getransplanteerde nier. Een van de belangrijkste mechanismen die ten grondslag ligt aan het ontstaan van I/R schade is lokale inflammatie in het transplantaat. Eerder heeft onze onderzoeksgroep aangetoond dat het complementsysteem betrokken is bij het ontstaan van deze inflammatie [unpublished data].

Keuze ischemie/reperfusie model:

Door middel van het I/R model (eenzijdige reperfusie) zijn wij in staat om nieuwe manieren voor interventie tijdens de ischemie periode te testen. Ons model simuleert de humane I/R schade goed, waardoor er sprake is van een hoge face validity. De reden waarom we voor eenzijdige reperfusie hebben gekozen is omdat er meestal ook maar één transplantaat wordt terug getransplanteerd. Om te bepalen welke ischemietijd optimaal is zullen we vooraf een pilot experiment doen waarbij de beste ischemietijd wordt bepaald. Hierdoor kan met zekerheid worden vastgesteld of er voldoende mate van I/R schade optreedt in ons I/R model in relatie tot onze onderzoeksvraag.

Uitkomstparameters:

De uitkomstparameters in het I/R model zijn de nierfunctie en de mate van nierschade. Wij hebben deze uitkomstparameters gekozen omdat deze parameters in de humane situatie ook als maatstaf voor nierfunctie worden gebruikt. Daarnaast zijn beide parameters valide te meten in dit I/R model. De nierfunctie zal worden gemeten aan de hand van de hoeveelheid creatinine en ureum in het plasma en

urine. De mate van nierschade wordt bepaald aan de hand van de mate van inflammatie, waarbij interleukine expressies worden bepaald.

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.

Opzet:

Onder algehele anesthesie wordt middels mediane laparotomie het abdomen geopend. Vervolgens wordt renale ischemie geïnduceerd door het afklemmen van de renale arterie met twee klemmen. De duur van de ischemie is afhankelijk van de vraagstelling en kan zorgen voor het induceren van milde/matige/hoge nierschade. Na het verwijderen van de klemmen worden de nieren geïnspecteerd op het herstel van de reperfusie. Vervolgens wordt het abdomen gesloten. De dieren zullen afhankelijk van de vraagstelling 1-28 dagen postoperatief worden getermineerd. Bloed, urine en organen worden verzameld en opgeslagen.

| Experiment* (fases) | Inductie ischemie | Perioden van monitoring | Terminatie + opslag |
|---------------------|-------------------|-------------------------|---------------------|
| Tijdsbeloop (dagen) | T0 | T1-28 | T28 |

Niet aangegeven in tabel:

De duur zal minimaal 30 tot maximaal 45 minuten zijn, afhankelijk van de uitkomsten van onze pilot experimenten. In de pilotexperimenten zal de beste ischemietijd worden bepaald aan de hand van nierfunctie en nierschade, zoals bovengenoemd.

Wanneer nieuwe manieren worden getest zal dit zowel voor als na de operatie kunnen worden gedaan. Tijdstip van toediening is afhankelijk van de halfwaardetijd van het medicijn. Toedieningsweg wordt eveneens bepaald door type medicijn. Dit kan oraal, intraveneus, intramusculair, subcutaan of intra peritoneaal zijn.

*Voor zowel het pilot experiment als daadwerkelijke experiment gebruiken we in principe dezelfde proefopzet.

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

Op basis van eerdere experimenten kunnen we voor de meeste primaire uitkomstmaten een te verwachten effectgrootte voorspellen. Door middel van powercalculaties wordt daarmee het aantal dieren beperkt. Daarnaast zullen interindividuele verschillen tussen de dieren zo klein mogelijk worden gehouden om variatie tussen de dieren te beperken en daarmee het benodigde aantal dieren zo klein mogelijk te houden.

Daarnaast zullen we in het pilot experiment per keer één ischemietijd testen. Hierbij wordt op basis van de literatuur de meest gebruikte ischemietijd eerst getest. Mocht dit voldoende nierschade induceren zullen we de andere ischemietijd niet meer testen in het pilot experiment. Hiermee wordt het aantal dieren nodig voor het pilot experiment geminimaliseerd.

B. De dieren

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

Diersoorten: Muizen en ratten. Zowel wildtypes als genetisch gemodificeerde dieren. Muizen worden gebruikt omdat genetische modificatie veelgebruikt en makkelijker te bewerkstelligen is in muizen, zoals KO modellen. Beide, zowel muizen en ratten, worden gebruikt voor de overige medicatie types beschreven in de bijlage Projectvoorstel.

Herkomst: Aankoop van commerciële, erkende leveranciers of andere instellingen. Via samenwerkingsverbanden of eigen fok. Momenteel hebben we 5 genetisch gemodificeerde foklijnen in de CDP in Groningen. De herkomst van de dieren zal afhangen van de onderzoeksvraag.

Levensstadia: Volwassen dieren.

Geschatte aantallen: In het I/R model zullen zowel mechanistische als functionele vraagstellingen worden

getest. Op basis van poweranalyse zullen per groep 9 dieren worden aangevraagd. De inclusie van 8 dieren per groep is met een power van 80% en een standaarddeviatie van 10% voldoende [Alpha 0.05]. Echter houden wij rekening met een maximale uitval van 10% per groep, wat neer komt op 1 extra dier per groep. Deze uitval van maximaal 10% is gebaseerd op eerdere ervaringen met het I/R model, waarbij uitval werd veroorzaakt door te diepe anesthesie of overschrijding van het ongerief door te slechte nierfuncties. Voorafgaand zal zoals eerder benoemd een pilot experiment worden uitgevoerd, waarbij minimaal 1 ischemietijd en maximaal 3 ischemietijden worden getest. Hierbij hebben we genoeg aan 4 dieren per groep.

Opzet experiment:

PILOT EXPERIMENT:

Groep 1: experimentele groep → ischemietijd A (n=4)

Groep 2: experimentele groep → ischemietijd B (n=4)

Groep 3: experimentele groep → ischemietijd C (n=4)

Groep 4: controle groep → geen ischemie (n=4)

Totaal per pilot experiment: **16** dieren

INTERVENTIE EXPERIMENT:

Groep 1: Ischemietijd X → wel interventie (n=9)

Groep 2: Ischemietijd X → geen interventie (n=9)

Groep 3: Controle groep – geen ischemie → wel interventie (n=9)

Groep 4: Controle groep – geen ischemie → geen interventie (n=9)

Totaal per interventie experiment: **36** dieren

| Diersoort | [A] Dieren per groep in pilot | [B] Groepen in pilot | [C] Aantal dieren per groep +uitval | [D]Aantal groepen/ Exp | [E] Aantal Exp per jaar | [F] Totaal per jaar [A]x[B]x[E]+[C]x[D]x[E] | Totaal 5 jaar [F] x 5 |
|---------------|-------------------------------|----------------------|-------------------------------------|------------------------|-------------------------|---|-----------------------|
| Muizen | 4 | 4 | 9 | 4 | 1 | 52 | 260 |
| Ratten | 4 | 4 | 9 | 4 | 1 | 52 | 260 |
| Totaal | | | | | | 104 | 520 |

Per jaar worden er gemiddeld 2 I/R experimenten in ratten en muizen uitgevoerd. Dit brengt het totaal op **104** dieren per jaar. Voor 5 jaar zijn dit **520** dieren.

Er zijn minder pilot dieren nodig wanneer de opzet van het experiment, dus de ischemietijd, niet anders is dan bij een eerder experiment. Daarbij mag de tijd tussen het uitvoeren van de experimenten niet groter dan 1 jaar zijn in verband met verschillen in muizen/ratten lijnen. Hetzelfde geldt voor de controle groepen van de interventie experimenten.

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.

Vervanging: Momenteel is er nog geen optimaal in vitro model om het in vivo I/R model mee te simuleren. Door middel van in vitro experimenten wordt waar mogelijk voorwerk verricht over de te verwachten effecten van het middel tijdens de dierproef.

Vermindering: Wij reduceren het aantal dieren door vooraf uitgevoerde powercalculaties. Meer dieren zullen tijdens het experiment niet worden gebruikt. Daarnaast zullen onze biotechnici de omstandigheden tijdens de proef optimaal houden, waardoor variatie wordt gereduceerd en daarmee het aantal benodigde dieren. Daarnaast zullen we in het pilot experiment maar een ischemietijd per keer testen, waarbij wordt gestart met de in de literatuur meest optimale ischemietijd.

Verfijning: Door goede algehele anesthesie en pijnstilling perioperatief wordt de pijn geminimaliseerd. Daarnaast zullen de dieren de dagen na I/R goed worden gemonitord om de algehele conditie te beoordelen. Wanneer discomfort wordt overschreden zal het dier worden getermineerd.

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.

Perioperatief zal pijnmedicatie worden toegediend. Door adequate monitoring wordt voorkomen dat het vooraf vastgestelde ongerief niet wordt overschreven. Mocht dit wel het geval zijn zullen gepaste maatregelen worden genomen.

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.

Het I/R model is een bekend model, die in de literatuur meermaals wordt beschreven. Om er zeker van te zijn dat dit model niet eerder in dezelfde toepassing is gebruikt, zal voorafgaand een literatuurstudie worden gedaan en wordt de database van de CDP geraadpleegd. Dit zal vooraf naar de IvD worden gecommuniceerd.

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.

Na I/R worden de dieren individueel gehuisvest in verband met de abdominale wond.

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.

Waar nodig zal in overleg met de welzijnscommissie meer pijnstilling in de vorm van lokale pijnverlichting worden toegepast. Door goede monitoring van de dieren zal worden gemonitord of dit voldoende is of dat er andere gepaste maatregelen moeten worden genomen.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Door wondpijn, het bijkomen uit de narcose en het ontwikkelen van een nierinfarct.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Oorzaken wondpijn: niet goed sluiten van de wond, approximeren van de wond, wondinfectie.

Oorzaken slecht bijkomen van narcose: langdurig onder anesthesie.

Oorzaken ontwikkelen infarct: slechte reperfusie na ischemie.

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

Wondpijn: perioperatieve pijnstilling.

Narcose: goede monitoring na narcose, waar nodig antidotum.

Nierinfarct: symptomen van nierfalen monitoren, waar nodig relaparotomie of andere gepaste maatregelen.

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.

- Nierfalen. Voor het bepalen van de nierfunctie zal creatinine worden gemeten. De creatininelevels zullen worden gebruikt als maat voor de nierfunctie en kunnen daarmee ook als drempelwaarde fungeren voor de ontwikkeling van nierfalen.
- Gewichtsverlies van meer dan 15%
- Inactiviteit van het dier
- Conditie van de vacht
- Ontstekingsverschijnselen

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

Dit hangt af van het gebruik van wildtype dieren of genetische gemodificeerde dieren. Op basis van eerder uitgevoerde experimenten met het I/R model wordt het percentage geschat op maximaal 10%.

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.

Ischemie/reperfusie schade: Matig

Injecties: Licht

Totaal: Matig

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.

Uitname van organen is noodzakelijk voor het bereiken van de primaire eindpunten.

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. | 10500 | |
| 1.2 | Vul de naam van de instelling of organisatie in. | Rijksuniversiteit Groningen | |
| 1.3 | Vul het volgnummer en het type dierproef in. | Volgnummer | Type dierproef |
| | | 3.4.4.4. | Niertransplantatie model |

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.

Het grote tekort aan donororganen is onze drijfveer om te onderzoeken hoe efficiënter kan worden omgegaan met de beschikbare donornieren. Het tekort aan donornieren wordt veroorzaakt door de toenemende vraag aan donornieren bij een tekort in aanbod. Momenteel wachten veel mensen op een nier, het terugdringen van deze wachttijden is van belang. Niet alleen voor de ontvanger, maar ook omdat uit onderzoek is aangetoond dat transplantaatfunctie negatief geassocieerd is met de duur van dialyse in de ontvanger. Alhoewel allerlei factoren van invloed zijn op de uitkomst van de transplantatie, is het belangrijk ook kritisch te kijken naar de transplantatie zelf. Want ook tijdens transplantatie zelf wordt schade aan de nier veroorzaakt door ontstekingsprocessen. En ook hier speelt het complement systeem een belangrijke rol in.

Keuze van transplantatiemodel:

Ons transplantatiemodel modelleert de niertransplantatie op dezelfde manier als in de mens. De reden waarom het transplantatiemodel is opgenomen in deze aanvraag is omdat dit model ideaal is om te kijken naar graft survival. Hierdoor kunnen we kijken naar de rol/invloed van het complement systeem op graft survival. Daarnaast kunnen we door middel van interventie kijken of de graft survival verbeterd qua overlevingstijd (=kwalitatief) en qua aantallen (=kwantitatief). Dit is het enige model waarbij we zowel kwantitatief als kwalitatief kunnen kijken naar de invloed van complement interventie. Als aanvulling hierop stelt het transplantatie model ons in staat een follow-up te modelleren. Waarbij we in staat zijn zowel naar de acute als chronische gevolgen van transplantatie te kijken. Momenteel is het transplantatiemodel alleen beschikbaar in ratten, echter vragen wij in deze aanvraag ook muizen aan, omdat wij het model willen opzetten in muizen. Vandaar dat wij dit model voor beide diersoorten aanvragen.

Uitkomstparameters:

De uitkomstparameters zijn de nierfunctie en de mate van nierschade. Wij hebben deze uitkomstparameters gekozen omdat deze parameters in de humane situatie ook als maatstaf voor nierfunctie worden gebruikt. Daarnaast zijn beide parameters valide te meten in dit model. De nierfunctie zal worden gemeten aan de hand van de hoeveelheid creatinine en ureum in het plasma en urine. De mate van nierschade wordt bepaald aan de hand van de mate van inflammatie, waarbij interleukine expressies worden bepaald.

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.

Opzet:

DONOREN

Bij de donoren zal afhankelijk van de vraagstelling al dan niet een eerder genoemd model in bijlagen 1, 2 en 3 worden toegepast. Oftewel een combinatie van dit model met het hersendoodmodel, de preservatietechnieken of het ischemie/reperfusie model is mogelijk. Er vindt dubbelzijdige nefrectomie plaats onder algehele anesthesie. De volgende anatomische structuren worden vrijgeprepareerd: ureters, aorta caudaal van arteria renalis en de niervaten. Allen worden gecanuleerd en geflusht. Na nefrectomie wordt het dier getermineerd. Bloed, urine en organen worden uitgenomen en opgeslagen. Een van beide nieren wordt, afhankelijk van de anatomie gerecentreerd. De andere nier zal na uitname fungeren als controle voor de nierfunctie in de donor.

ONTVANGERS

De dieren die het transplantaat ontvangen zullen onder algehele anesthesie een enkelvoudige nefrectomie van een natieve nier ondergaan. Vervolgens krijgen de dieren een transplantaatnier. Na transplantatie zullen bloed en urine samples worden genomen. Na een bepaalde tijdsduur zullen de dieren worden getermineerd. Bloed, urine en organen worden uitgenomen en opgeslagen.

Afhankelijk van de vraagstelling wordt gebruik gemaakt van wildtype en/of genetisch gemodificeerde dieren. Daarnaast zal afhankelijk van de vraagstelling een middel worden toegediend in de donor en/of ontvanger. Dit kan oraal, intraveneus, intramusculair, subcutaan of intra peritoneaal zijn.

Een pilot experiment zal vooraf worden uitgevoerd om de optimale omstandigheden van transplantatie te bepalen. Hierbij moet worden gedacht aan het optimaliseren van de warme ischemietijden.

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

Op basis van eerdere experimenten kunnen we voor de meeste primaire uitkomstmaten een te verwachten effectgrootte voorspellen. Door middel van powercalculaties wordt daarmee het aantal dieren beperkt. Daarnaast zullen interindividuele verschillen tussen de dieren zo klein mogelijk worden gehouden om variatie tussen de dieren te beperken en daarmee het benodigde aantal dieren zo klein mogelijk te houden.

B. De dieren

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

Diersoorten: Muizen en ratten.

Herkomst: Aankoop van commerciële, erkende leveranciers of andere instellingen. Via samenwerkingsverbanden of eigen fok. Momenteel hebben we 5 genetisch gemodificeerde foklijnen in de CDP. De herkomst van de dieren zal afhangen van de onderzoeksvraag.

Levensstadia: Volwassen dieren.

Geschatte aantallen: Met het transplantatiemodel zullen zowel mechanistische als functionele vraagstellingen worden onderzocht. Op basis van poweranalyse zullen per groep 10 dieren worden aangevraagd. De inclusie van 8 dieren per groep is met een power van 80% en een standaarddeviatie van 10% voldoende [α 0.05].

Uitval:

Echter houden wij rekening met een maximale uitval van 20% per groep, wat neer komt op 2 extra dieren per groep. Deze uitval van maximaal 20% komt door bijvoorbeeld een afwijkende anatomie of technische complicatie. Voorafgaand zal zoals eerder benoemd een pilot experiment plaatsvinden. Hierbij wordt

minimaal 1 conditie getest en maximaal 3. Hierbij moet worden gedacht aan het optimaliseren van warme ischemietijden.

Opzet experiment:

PILOT EXPERIMENT:

Groep 1: Conditie A (n=4 donors, n=4 ontvangers)

Groep 2: Conditie B (n=4 donors, n=4 ontvangers)

Groep 3: Conditie C (n=4 donors, n=4 ontvangers)

Totaal per pilot experiment: **24** dieren

INTERVENTIE EXPERIMENT:

Groep 1: Tx → wel interventie (n=10 donors, n=10 ontvangers)

Groep 2: Tx → geen interventie (n=10 donors, n=10 ontvangers)

Groep 3: Controle groep → wel interventie (n=10 donors, n=10 ontvangers)

Groep 4: Controle groep → geen interventie (n=10 donors, n=10 ontvangers)

Totaal per interventie experiment: **80** dieren

| Dieren | [A]Donors pilot | [B]Ontvangers pilot | [C]Groups pilot | [D]Donors exp | [E]Ontvangers exp | [F]Groups exp | [G]Totaal /jaar [A+Bx C]+[D +ExF} | Totaal /5 jaar [G]x5 |
|--------|-----------------|---------------------|-----------------|---------------|-------------------|---------------|-----------------------------------|----------------------|
| Muizen | 4 | 4 | 3 | 10 | 10 | 4 | 104 | 520 |
| Ratten | 4 | 4 | 3 | 10 | 10 | 4 | 104 | 520 |
| Totaal | | | | | | | 208 | 1040 |

Per jaar wordt gemiddeld 1 transplantatie experiment in ratten uitgevoerd. Echter willen we het transplantatiemodel ook lopend maken in muizen. Dus gaan wij uit van 2 transplantatiemodellen per jaar. Dit brengt het totaal op **208** dieren per jaar. Voor 5 jaar zijn dit **1040** dieren. Mocht het niet lukken het transplantatiemodel lopend te maken in muizen, zullen de dieren aangevraagd onder kopje muizen niet worden gebruikt.

Criteria Transplantatiemodel muizen

GO/NO GO 1: Het transplantatiemodel zal alleen worden opgezet in muizen wanneer meerdere onderzoeksvragen worden beantwoord. Kortom we moeten aan de hand van de experimenten iets kunnen zeggen over: graft survival, de rol van het complement systeem op deze graft survival en de daarbij behorende acute/chronische complicaties.

GO/NO GO 2: Het transplantatiemodel zal alleen worden opgezet wanneer er een goede basis is. Dit houdt in dat er genoeg kennis is vergaard met de andere drie beschreven modellen. Kortom: mechanistische en functionele vraagstellingen zullen eerst moeten zijn getest of onderzocht in de andere modellen, voordat ze worden toegepast op het transplantatiemodel. De resultaten in de moeten positief zijn.

GO/NO GO 3: De pilot studie moet goede resultaten laten zien. Dit betekent dat binnen het aantal beschikbare dieren het model geoptimaliseerd moet zijn. Als tijdens deze pilot studie blijkt dat de gestelde doelen met betrekking tot bijvoorbeeld ischemietijd of bijvoorbeeld overlevingsduur na transplantatie niet haalbaar is, zal er niet worden doorgegaan met het valideren van dit model.

GO/NO GO 4: Als tijdens het experiment blijkt dat bepaalde groepen in het transplantatiemodel te kwetsbaar zijn [geen goede resultaten, veel ongerief of zelfs sterfte] zal het experiment worden stopgezet.

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.

Vervanging: Momenteel is er nog geen in vitro model aanwezig waarin ons beschreven project kan worden verricht.

Vermindering: zo min mogelijk dieren worden gebruikt door middel van powercalculatie en het meenemen van ervaringen uit eerdere experimenten. Bij het uitvoeren zullen we tevens gebruik maken van de expertise van het microchirurgisch team van de CDP. Daarnaast zullen we in het pilot experiment maar een conditie per keer testen, waarbij wordt gestart met de in de literatuur meest optimale conditie.

Verfijning: Perioperatief zal pijnstilling worden gegeven. De dagen na de operatie zullen de dieren extra worden gemonitord op ongerief. Er zal gelet worden op discomfort en zo nodig gepaste maatregelen worden genomen.

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.

Perioperatief zal pijnstilling worden gegeven. Daarnaast kunnen creatininelevels in het urine worden bepaald om inzicht te krijgen in de nierfunctie en het risico op het ontwikkelen van nierfalen.

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.

Voor zover bekend uit literatuurstudies is het transplantatiemodel nog niet eerder in deze context toegepast.

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.

Na transplantatie zullen de dieren individueel worden gehuisvest.

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.

Adequate anesthesie en pijnbestrijding perioperatief.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Door wondpijn, het bijkomen uit de narcose en het ontwikkelen van een nierinfarct.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Oorzaken wondpijn: niet goed sluiten van de wond, approximeren van de wond, wondinfectie.

Oorzaken slecht bijkomen van narcose: langdurig onder anesthesie.

Oorzaken ontwikkelen infarct: slechte reperfusie na ischemie.

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

Wondpijn: perioperatieve pijnstilling.

Narcose: goede monitoring na narcose, waar nodig antidotum.

Nierinfarct: symptomen van nierfalen monitoren of andere gepaste maatregelen.

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.

- Nierfalen. Voor het bepalen van de nierfunctie zal creatinine worden gemeten. De creatininelevels zullen worden gebruikt als maat voor de nierfunctie en kunnen daarmee ook als drempelwaarde fungeren voor de ontwikkeling van nierfalen.
- Gewichtsverlies van meer dan 15%
- Inactiviteit van het dier
- Conditie van de vacht
- Ontstekingsverschijnselen

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

Dit hangt af van het gebruik van wildtype dieren of genetische gemodificeerde dieren. Op basis van eerder uitgevoerde experimenten met het transplantatie model wordt het percentage geschat op 20%, zoals aangegeven in B.

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.

Donoren:

Dubbelzijdige nefrectomie en terminatie onder anesthesie [terminaal]

Injecties

[licht]

Ontvanger:

Niertransplantatie en enkelvoudige nefrectomie [ernstig]

Nefrectomie native nier [ernstig]

Injecties [licht]

Het totale ongerief bij de dieren is voor de donoren geschat op terminaal ongerief. Voor de dieren die het transplantaat ontvangen wordt het totale ongerief op ernstig geschat. Omdat de dieren zowel een dubbelzijdige nefrectomie als een niertransplantatie onder anesthesie zullen ondergaan.

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.

Uitname van organen is noodzakelijk voor het bereiken van de primaire eindpunten.

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 **8075**
2. Titel van het project: **Het verbeteren van uitkomst na niertransplantatie door gerichte interventie in het complement systeem**
3. Titel van de NTS: **Het verbeteren van uitkomst na niertransplantatie door gerichte interventie in het complement systeem.**
4. Type aanvraag:
X 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: **07-12-2017**
 - aanvraag compleet **07-12-2017**
 - in vergadering besproken **15-12-2017**
 - anderszins behandeld **16-03-2017**
 - termijnonderbreking(en) van / tot **19-12-2016 tot 09-03-2017**
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen **n.v.t.**
 - aanpassing aanvraag **09-03-2017**
 - advies aan CCD: **30-03-2017**
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.
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 **19-12-2016**

- **Vragen/opmerkingen t.a.v. de projectbeschrijving**

- In # 3.2 stelt u als projectdoel : 'De hypothese luidt dat de activering van het complement systeem in de verschillende fasen van de niertransplantatie: (1) in de donor, (2) tijdens preservatie, (3) tijdens transplantatie en (4) in de ontvanger resulteert in een verminderde transplantaatfunctie', met als centrale vraag: 'Welke nieuwe middelen/strategieën die specifiek aangrijpen in het complement systeem verbeteren de transplantaatfunctie?'
-
- In # 3.4 blijkt dat hierbij gedacht wordt aan: - *knock-out modellen, complement remmers, complement upregulatoren en complement regulatoire eiwitten.*
- Hierbij wordt niet vermeld of en zo ja welke middelen (bv remmers) inmiddels ontwikkeld zijn en toegepast zullen gaan worden (en in welke aantallen dieren). Ook wordt niet beschreven welke complement genen men zou willen 'outknocken'; in de bijlages wordt vermeld dat er 5 KO lijnen in het CDP aanwezig zijn maar informatie over welke dit zijn en hoe ze ingezet worden in het onderzoek (en in welke aantallen) ontbreekt. Informatie over specifiek te onderzoeken complement (up)regulatoren/pathways ontbreekt ook.
- Met andere woorden, hoe de aangevraagde aantallen dieren per bijlage en per benadering worden ingezet voor het beantwoorden van de onderzoeksvraag is niet navolgbaar.
- Zoals nu geformuleerd vraagt deze aanvraag in feite om een vrijbrief om de komende 5 jaar met de modellen (beschreven in de bijlages) verder te mogen gaan onder condities en met farmaca die 'we dan wel zullen zien'.
- De DEC vraagt u daarom om:
 - 1/ beter te concretiseren op welke complement factoren/pathways gericht wordt met de verschillende benaderingen (remmers, KO dieren etc) .
 - 2/ Hierbij zal niet alleen per model (lees bijlage) , maar ook per benadering (remmers, KO dieren etc) de benodigde aantallen nader onderbouwd moeten worden, bij voorkeur met gebruik van een poweranalyse.
 - 3/ T.a.v. het muis niertransplantatie model zou nog nader beschreven moeten worden wat de go/no go criteria zijn hiervoor.

- Datum antwoord: **09-03-2017**

- **Verstrekt(e) antwoord(en):**

Punt 1:

Beter te concretiseren op welke complement factoren/pathways gericht wordt met de verschillende benaderingen (remmers, KO dieren etc).

Aanpassingen:

- Projectvoorstel [REDACTED] #3.2 Doel. 'Hoewel onderzoek heeft aangetoond dat het... dat nierschade tijdens niertransplantatie verminderd.'
- Projectvoorstel [REDACTED] #3.2 Doel. 'Hoofdvraag: Welke rol speelt... tijdens niertransplantatie?'
- Projectvoorstel [REDACTED] #3.4 Onderzoeksstrategie. #3.4.1. 'Het doel van ons onderzoek is tweeledig:... waarin het complement systeem wordt geactiveerd.'
- Projectvoorstel [REDACTED] #3.4 Onderzoeksstrategie. #3.4.3. Kopje Transplantatiemodel. 'Voor het transplantatiemodel (bijlage 4)... uit een eerder model negatieve resultaten zijn verkregen.'
- Projectvoorstel [REDACTED] #3.4 Onderzoeksstrategie. #3.4.3. Kopje Mijlpalen. 'Dit kan betekenen dat een middel ook eerst... ,zal dit middel niet worden gebruikt in een model.'

Punt 2:

Hierbij zal niet alleen per model, maar ook per benadering (remmers, KO dieren etc) de benodigde aantallen nader onderbouwd moeten worden, bij voorkeur met gebruik van een poweranalyse.

Aanpassingen:

- Bijlage 3.4.4.1. Hersendoodinductie. #B de dieren. Hele stuk zijn aanpassingen gedaan. Specifiek: 'Het hersendoodmodel zal gebruik worden voor... functionele vraagstellingen.
- Bijlage 3.4.4.1. Hersendoodinductie. # B de dieren. Opzet experiment. Tabel aangepast.
- Bijlage 3.4.4.2. Preservatietechnieken. #B de dieren. Stuk geschatte aantallen aangepast.
- Bijlage 3.4.4.2. Preservatietechnieken. #B de dieren. Opzet experiment. 'Er zijn minder pilot dieren nodig... groepen van de interventie experimenten.'
- Bijlage 3.4.4.3. Ischemie/reperfusie. #B de dieren. Stuk geschatte aantallen aangepast.
- Bijlage 3.4.4.3. Ischemie/reperfusie. #B de dieren. Opzet experiment. 'Er zijn minder pilot dieren nodig.. groepen van de interventie experimenten.'
- Bijlage 3.4.4.4. Niertransplantatie #B de dieren. Stuk geschatte aantallen aangepast.

Punt 3:

T.a.v. het muis niertransplantatie model zou nog nader beschreven moeten worden wat de go/no go criteria zijn hiervoor.

Aanpassingen:

- Projectvoorstel ██████████ #3.4 Onderzoeksstrategie. #3.4.3. Kopje Transplantatiemodel. 'Voor het transplantatiemodel (bijlage 4)... uit een eerder model negatieve resultaten zijn verkregen.'
 - Bijlage 3.4.4.4. #Onderdeel A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters. # Keuze van transplantatiemodel. 'De reden waarom het transplantatiemodel is... het model willen opzetten in muizen.'
 - Bijlage 3.4.4.4. Niertransplantatie. #B de dieren. Criteria transplantatiemodel muizen toegevoegd.
- De in de antwoorden aangeduide concretisering hebben geleid tot adequate 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 / een wijziging op een bestaande vergunning. **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. **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 helder welke handelingen en ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft zowel binnen de doelstellingen als tussen de doelstellingen criteria beschreven op basis van welke criteria deze zal besluiten het project wel of niet te continueren. 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. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

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 Wet Natuurbescherming).

Voor zover de DEC de mogelijke tegenstrijdigheid kan beoordelen is er geen aanleiding om deze strijdigheid met andere relevante wettelijke bepalingen aanwezig te achten. De DEC wil wel stellen dat deze signaleringsfunctie niet tot de wettelijke taken van de DEC behoort. *Mochten de DEC-RuG signalen bereiken aangaande mogelijke tegenstrijdigheid met wettelijke bepalingen dan zal zij onverwijld de vergunninghouder daarvan op de hoogte stellen.*

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 van dit project is om de negatieve rol die activering van het complement systeem kan spelen in de verschillende fasen van niertransplantatie gedetailleerd in kaart te brengen.

Het uiteindelijke doel is om op basis van de vergaarde kennis (nieuwe) strategieën te ontwikkelen die de functionaliteit van de getransplanteerde nier kan verbeteren c.q. verlengen.

Er is een directe relatie tussen het directe en het uiteindelijke doel. Het uiteindelijke doel zal mogelijk niet binnen de looptijd van het project gehaald kunnen worden. Het project is gericht op fundamenteel en translationeel onderzoek m.b.t. het hierboven beschreven (directe) doel. De aanvrager heeft duidelijk gemaakt wat dit project kan bijdragen aan het onderzoeksveld en 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 fundamentele/translationele project zijn de proefdieren, en de patiënten met sterk verminderde nierfunctie.

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 als gevolg van met niertransplantatie samenhangende ingrepen bij zowel de donor als de ontvanger. Aan het einde van de proef zullen de dieren opgeofferd worden.

Waarden die voor nierpatiënten bevorderd worden: een potentiële verbetering en verlenging van de functionaliteit van de getransplanteerde nier.

6. Is er aanleiding voor de DEC om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken?

Voor zover de DEC de beschreven effecten op het milieu kan beoordelen is er geen aanleiding om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu te betrekken. De DEC wil wel stellen dat deze signaleringsfunctie niet tot de wettelijke taken van de DEC behoort. Mochten de DEC-RuG signalen bereiken aangaande mogelijke effecten op het milieu dan zal zij onverwijld de vergunninghouder daarvan op de hoogte stellen.

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 ervan 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.**

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 huisvesting en verzorging volgens de richtlijn gebeurt. Dit op basis van de daartoe strekkende verklaring van zowel de vertegenwoordiger van de vergunninghouder als de aanvrager onder respectievelijk punt 6 van de ondertekening van de aanvraag en punt F van de bijlage.**

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*). **Dit is naar de mening van de DEC realistisch ingeschat. De DEC vertrouwt erop dat de aanvrager al het mogelijke zal doen om het ongerief voor de proefdieren te identificeren, en waar mogelijk te**

verminderen.

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 het dier wordt aangetast door alle, chirurgische en niet-chirurgische, ingrepen die samenhangen met het voorbereiden en uitvoeren van een niertransplantatie, uiteindelijk leidend tot opoffering van zowel donor als ontvanger**
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 criteria voor humane eindpunten in deze aanvraag goed beschreven.**

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. De complexe rol die het complement systeem vóór, tijdens en na niertransplantatie kan spelen is in vitro niet na te bootsen.**
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 en power analyses.**
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 ongerief voor de proefdieren te identificeren, en waar mogelijk te verminderen. Dit blijkt onder andere uit de zorgvuldige beschrijving van de experimentele omstandigheden en beschikbare microchirurgische expertise bij de uitvoering van de experimenten.**
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 de onderhavige projectaanvraag worden mannelijke en vrouwelijke proefdieren in gelijke mate gebruikt. 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. Zowel de donoren als de ontvangers van het nier transplantaat worden na afloop opgeofferd, in voorkomende gevallen onder uitnemen van organen ter nadere ex vivo bestudering. De dieren worden gedood volgens een in bijlage IV vermelde dodingsmethode.**
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

Rechtvaardigen de doelstellingen van het project dat ten doel heeft **het verbeteren van de uitkomst na niertransplantatie door gerichte interventie in het complement systeem** het ongerief dat de proefdieren wordt aangedaan in het onderhavige project?

Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: **matig tot ernstig ongerief**.
Waarden die voor de doelgroep bevorderd worden: **potentieel groot voordeel**.
Algemeen: **identificatie van nieuwe aangrijpingspunten voor interventie in het complementsysteem, teneinde de functie en de overleving van niertransplantaten te verbeteren**.

De DEC-RUG is van mening dat de belangen van de samenleving – hier patiënten met (dreigend) nierfalen - zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de proefdieren waarmee dit onderzoek wordt uitgevoerd in het project '**Het verbeteren van uitkomst na niertransplantatie door gerichte interventie in het complement systeem**'. De betrokken proefdieren zullen in dit project matig tot ernstig ongerief ondervinden. Zij worden in hun welzijn geschaad door uitnemen van een nier al of niet gevolgd door het ontvangen van een niertransplantaat, uiteindelijk gevolgd door opoffering.

(Dreigend) nierfalen is een buitengewoon ernstige, chronische ziekte. Behalve nierdialyse, die de kwaliteit van leven sterk belast, is niertransplantatie een optie die in het algemeen succesvol is op korte termijn, maar die op langere termijn vaak leidt tot uitval van het transplantaat. Er zijn sterke aanwijzingen

dat activering van het complement systeem tijdens de verschillende fasen van de transplantatie, mede afhankelijk van de kwaliteit van de donornier, hierin een belangrijke rol speelt. Het voorliggende project beoogt aangrijpingspunten in het complementsysteem te identificeren die in aanmerking kunnen komen voor gerichte medicamenteuze interventie, potentieel leidend tot verbetering en verlenging van de transplantaat-functie en overleving van de patiënt. Vandaar dat de DEC-RUG het onderhavige onderzoek, zowel vanuit wetenschappelijk als vanuit maatschappelijk oogpunt, van substantieel belang acht.

Daarom beantwoordt de De DEC-RUG de centrale morele vraag: Rechtvaardigt de doelstelling van het project '**Het verbeteren van uitkomst na niertransplantatie door gerichte interventie in het complement systeem**' het matig tot ernstige ongerief, gevolgd door opoffering, dat de dieren wordt aangedaan, in het voorliggende project bevestigend.

Hoewel de DEC-RUG de intrinsieke waarde van het dier onderschrijft en oog heeft voor het te ondergane matige tot ernstige ongerief van de proefdieren, weegt het reële 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 hebben in voorgaande onderzoekprogramma's aangetoond te 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. Dit blijkt onder andere uit de gedetailleerde onderbouwing van het aantal benodigde dieren en de ingebouwde go/no go momenten bij sommige experimentele onderdelen van het project. De DEC-RUG is ervan overtuigd dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken. De DEC-RUG is er eveneens van 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 het voorgestelde project '**Het verbeteren van uitkomst na niertransplantatie door gerichte interventie in het complement systeem**', als ethisch gerechtvaardigd en voorziet de DEC-RUG derhalve het onderhavige projectvoorstel van een positief advies.

E. Advies

1. Advies aan de CCD
X De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

2. 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*).

Zoals aangegeven onder vraag 9 ('Correspondentie met de aanvrager') had de DEC vooral behoefte aan nadere specificatie van de voorgenomen (genetische of farmacologische) modificatie van complement factoren c.q. pathways. In de revisie van de aanvraag is de onderzoeker erin geslaagd de

verlangde precisering te verschaffen. In de discussie over deze projectaanvraag binnen de DEC zijn geen knelpunten of dilemma's aan de orde geweest.

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

Rijksuniversiteit Groningen

A. Deusinglaan 1
9713 AV GRONINGEN



**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
AVD1050020171245

Bijlagen

2

Datum 30 maart 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 30 maart 2017. Het gaat om uw project "Het verbeteren van uitkomst na niertransplantatie door gerichte interventie in het complement systeem.". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1050020171245. 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:

30 maart 2017

Aanvraagnummer:

AVD1050020171245

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
30 maart 2017
Aanvraagnummer:
AVD1050020171245

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10500
Naam instelling of organisatie: Rijksuniversiteit Groningen
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 1179037
Straat en huisnummer: A. Deusinglaan 1
Postcode en plaats: 9713 AV GRONINGEN
IBAN: NL45ABNA0474567206
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: Rijksuniversiteit Groningen

Gegevens 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

Datum:

30 maart 2017

Aanvraagnummer:

AVD050020171245

Over uw project

Geplande startdatum:

1 april 2017

Geplande einddatum:

1 april 2022

Titel project:

Het verbeteren van uitkomst na niertransplantatie door gerichte interventie in het complement systeem.

Titel niet-technische samenvatting:

Het verbeteren van uitkomst na niertransplantatie door gerichte interventie in het complement systeem.

Naam DEC:

DEC-RUG

Postadres DEC:

A. Deusinglaan 1, [REDACTED]

E-mailadres DEC:

secrdec.umcg@umcg.nl

Betaalgegevens

De leges bedragen:

€ 1.684,-

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:

Groningen

Datum:

30 maart 2017



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

[REDACTED]
A. Deusinglaan 1
9713 AV GRONINGEN
[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
AVD1050020171245

Bijlagen

2

Datum 30 maart 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 30 maart 2017
Vervaldatum: 29 april 2017
Factuurnummer: 171245

| Omschrijving | Bedrag |
|---|------------|
| Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD1050020171245 | € 1.684,00 |

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

Rijksuniversiteit Groningen

A. Deusinglaan 1
9713 AV GRONINGEN



**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
AVD1050020171245

Datum 12 april 2017
Betreft aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED],

Op 30 maart 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Het verbeteren van uitkomst na niertransplantatie door gerichte interventie in het complement systeem." met aanvraagnummer AVD1050020171245. 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

Kunt u in de NTS de termen 'complement systeem' en 'transgenese' uitleggen of daar andere termen voor gebruiken?

In de NTS moet per diersoort aangegeven worden hoeveel dieren er gebruikt worden. Kunt u het aantal dieren opsplitsen in het aantal muizen en het aantal ratten?

Onder 4.3 (algemeen maatregelen om negatieve gevolgen te beperken) geeft u aan dat de dieren geen angst zullen ervaren. Gezien de handelingen zullen de dieren wel degelijk angst ondervinden. Wilt u dit aanpassen?

Onduidelijkheden

Onder het belang van het onderzoek (Projectvoorstel 3.3) beschrijft u wat er al uitgevoerd is. Kunt u een nieuw Projectvoorstel sturen waarin u onder wetenschappelijk en maatschappelijk belang ingaat op het belang van onderliggend project?

Kunt u voor iedere bijlage aangeven of er mannelijke of vrouwelijke dieren gebruikt worden, of dat het geslacht van de dieren er niet toe doet en beide geslachten in gelijke mate worden gebruikt?

Datum:
12 april 2017
Aanvraagnummer:
AVD1050020171245

Voor Bijlage Dierproeven 3.4.4.1 vraagt u dieren aan voor de pilot. Wordt deze pilot ieder jaar uitgevoerd, of eenmalig? Indien dit eenmalig is, wilt u dan een nieuwe Bijlage Dierproeven sturen waarin het totaal aantal dieren is aangepast en het aantal in de NTS ook aanpassen?

De donordieren van Bijlage Dierproeven 3.4.4.4 hebben terminaal en licht ongerief, zo geeft u aan onder 2K. Kunt u, om het cumulatief ongerief te kunnen inschatten, aangeven of de injecties worden gegeven onder anesthesie, of vóór de operatie?

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

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: Rijksuniversiteit Groningen

Adres:

Postcode en plaats:

Aanvraagnummer: AVD1050020171245

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:

12 april 2017

Aanvraagnummer:

AVD1050020171245

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

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. XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX Universitair Medisch Centrum Groningen
- 1.3 Vul de titel van het project in. Het verbeteren van uitkomst na niertransplantatie door gerichte interventie in het complement systeem.

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

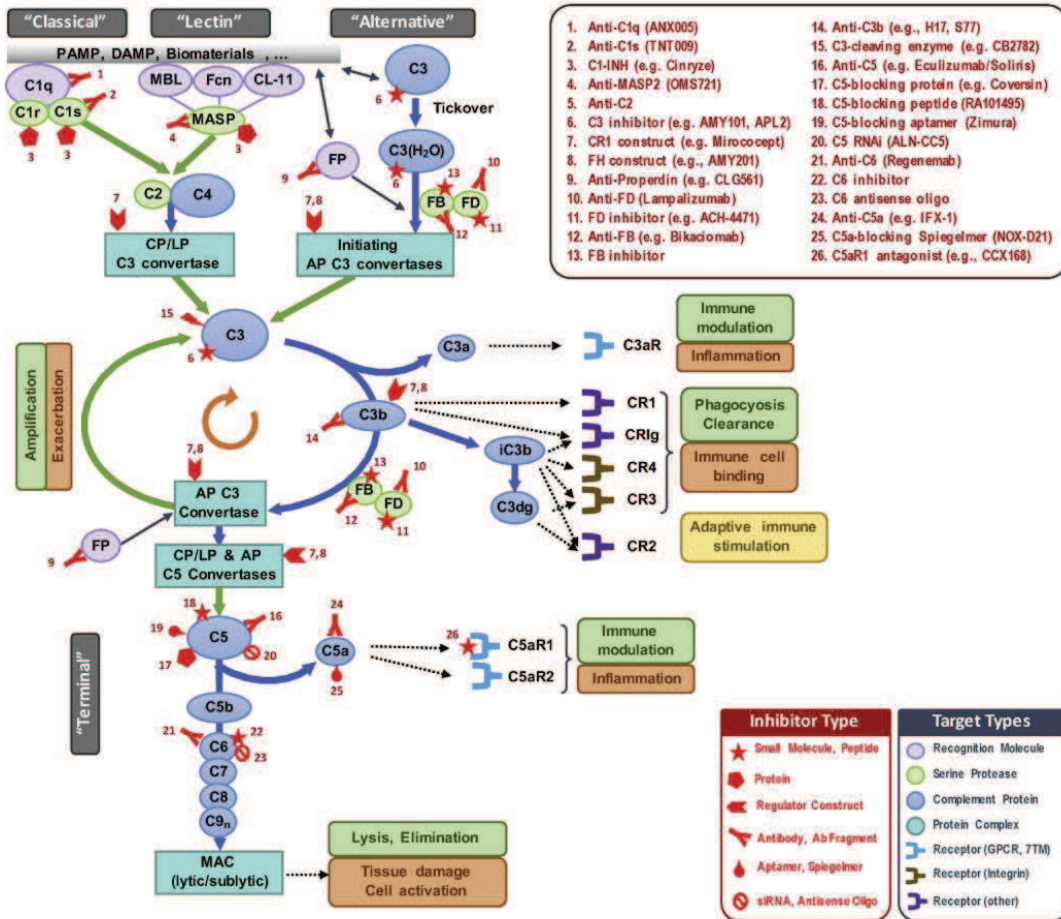
Licht het project toe. Beschrijf de aanleiding, de achtergrond en de context. Besteed aandacht aan de bij vraag 2 aangekruiste categorieën.

- 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.

Het succes van niertransplantatie op korte termijn is groot, maar veel donornieren gaan op lange termijn verloren. De kwaliteit van de nier vóór transplantatie speelt hierbij een grote rol. Vooral bij transplantatie met postmortale nieren is de kwaliteit verlaagd. Een mindere kwaliteit van de nier versterkt de schade die ontstaat tijdens de periode dat de nier niet doorbloed is en als de bloedtoevoer weer hersteld wordt tijdens de transplantatie (ischemie/reperfusie schade). Deze schade leidt tot een groter risico op het langzaam op gang komen van de nier (delayed graft function), op acute en chronische afstoting [Walport MJ. N Engl J Med 2001;344(14):1058-66]. Ontregeling van het complement systeem speelt een centrale rol in het ontstaan van deze schade in de nier [redacted]

[redacted]
[redacted]
[redacted]
[redacted] De resultaten laten zien dat de functie en overleving van nier transplantaten verslechterd als gevolg van complement activatie. Deze bevindingen plaatsen de rol van remming van het complement systeem in een nieuw perspectief. Om de functie en overleving van niertransplantaten te verbeteren is het nodig om nieuwe aangrijpingspunten te identificeren voor interventie; tijdens en voor de transplantatie en in de donor, en/of de ontvanger. De behandeling van complement gerelateerde nierziekten berustte tot voor kort op zware afweer onderdrukkende medicatie, welke veel bijwerkingen gaven, waaronder systemische infecties. Proefdierstudies laten echter zien dat door gerichte interventie in het complement systeem deze bijwerkingen worden voorkomen. Daarnaast zijn deze gerichte interventies therapeutisch actief bij lage doseringen, wat ervoor zorgt dat een nieuwe groep aan geneesmiddelen in opkomst is. Dat deze proefdierstudies ook bruikbaar zijn in de kliniek blijkt uit het feit dat de eerste specifieke complement remmer inmiddels is geregistreerd onder de naam Eculizimab [Rother et al. Nature Biotechnology 2007;25:1256-64].

Het complement systeem is onderdeel van het aangeboren immuunsysteem, maar is ook betrokken bij de activatie van het verworven immuunsysteem. In totaal maken meer dan 30 eiwitten deel uit van het complement systeem. Activering van het complement systeem kan via drie routes: de klassieke route (door antistof complexen), de lectine route (door suikergroepen op ziekteverwekkers en beschadigde cellen van het eigen lichaam) en de alternatieve route (o.a. door oppervlaktemoleculen van bacteriën en apoptotische cellen). Alle drie de routes leiden tot de activatie van complement component 3 (C3). Na C3-activering kan de terminale route worden geactiveerd door de sequentiële activering van de componenten C5 tot C9. Samen vormen deze componenten een complex, het 'membrane attack complex', dat een porie vormt in de celwand, zodat deze lyseert [Ricklin et al. Nat Immunol 2010;11(9):785-797, Walport MJ. N Engl J Med 2001;344(14):1058-66]. Gezien de efficiëntie van het complement systeem is een strikte controle nodig om schade aan eigen weefsel en de eigen cellen te voorkomen. Op verschillende niveaus van het activatieproces vindt daarom regulatie plaats. Er zijn twee type regulatoren te onderscheiden: eiwitten in het plasma en eiwitten op het membraan van gastheercellen [Carroll et al. Adv Drug Del Rev 2011;63:965-75]. Samen zorgen deze complement regulerende eiwitten ervoor dat het complement systeem in evenwicht blijft. Dit evenwicht zorgt er enerzijds voor dat er (a) continu mogelijkheid is tot complement activatie en (b) anderzijds dat de complement activering een gecontroleerde reactie blijft [Zhang et al. J Clin Invest 1999;103(1):55-61]. Een ongecontroleerde activatie van het complement systeem, zowel up- als downregulatie, kan leiden tot destructie van circulerende bloedcellen of parenchymcellen en daarmee zorgen tot schade.



Figuur: Complement systeem – overzicht van alle complement componenten in zowel de drie activatieroutes van het complement systeem, als in de terminale pathway.

Deze recente bevindingen ondersteunen het idee dat met het gebruik van nieuwe interventiemethoden de bij niertransplantatie ontstane schade aan het transplantaat kan worden verminderd. Voor optimale toepassing van deze methoden is echter een beter begrip van de onderliggende mechanismen nodig en een volledige set van experimenten die de betrokken complement factoren en effecten van de middelen bepalen. Op deze manier kan de het succes van niertransplantatie de komende jaren sterk verbeteren.

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?

De hypothese luidt dat de activering van het complement systeem in de verschillende fasen van niertransplantatie: (1) in de donor, (2) tijdens preservatie, (3) tijdens transplantatie en (4) in de ontvanger resulteert in een verminderde transplantaatfunctie. Kortom: complement activatie vindt plaats van donor naar ontvanger. Hoewel onderzoek heeft aangetoond dat het complement systeem wordt op gereguleerd in al deze fasen, is het niet volledig opgehelderd wat het pathofysiologisch mechanisme hiervan is. Dit maakt het doel van onze studies tweeledig: (1) het onderzoeken van de pathofysiologische processen die ervoor zorgen dat het complement systeem tijdens al deze fasen van transplantatie wordt geactiveerd. (2) Het onderzoeken van verschillende interventiemethoden in het complement systeem om ervoor te zorgen dat nierschade tijdens niertransplantatie verminderd.

Hierdoor hebben wij de volgende onderzoeksvragen:

Hoofdvraag: Welke rol speelt het complement systeem bij de nierschade die ontstaat rondom niertransplantatie?

Deelvragen:

- Welk pathofysiologisch mechanisme speelt het complement systeem in niertransplantatie? (=mechanistisch)
- Welke interventies in het complement systeem leiden tot een vermindering van nierschade tijdens niertransplantatie? (=functioneel)

Haalbaarheid:

Om onze onderzoeksvragen te kunnen beantwoorden maken we gebruik van verschillende (dier)modellen, die elk een stap tussen de donor naar ontvanger vormen, namelijk:

1. Hersendoodinductie: We hebben uitgebreide expertise in het induceren van hersendood. Dit is geoptimaliseerd op ons eigen lab (de biotechnici) in samenwerking met het microchirurgisch team van de CDP.

2. Preservatie: Op het gebied van preservatie heeft onze onderzoeksgroep uitgebreide expertise. Verschillende organen uit verschillende species kunnen op ons lab worden geperfundeerd. Hierbij zullen we ons vooral richten op het perfusiemodel en minder op de cold storage van nieren.

3. Ischemie/Reperfusie schade: Met het ischemie/reperfusie model hebben onze biotechnici uitgebreide ervaring in samenwerking met het microchirurgisch team van de CDP.

4. Transplantatie: Op het gebied van niertransplantatie werken we samen met het microchirurgisch team van de CDP. Het microchirurgisch team kan ons bijstaan in het uitvoeren van dit model.

Al het benodigde apparaat is aanwezig op al dan niet ons lab of de CDP. Daarnaast hebben we een breed scala aan immunohistochemische en moleculaire technieken tot onze beschikking om complement componenten tot in detail te kunnen onderzoeken.

3.3 Belang

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

Niertransplantatie is de eerste keus behandeling voor patiënten met eindstadium nierfalen. Echter sterven er nog steeds patiënten die op de wachtlijst staan door het tekort aan orgaandonoren. De lange termijn overleving van donornieren is afhankelijk van verschillende factoren zoals:

- 1. De donor: levende versus postmortale donatie
 - 2. Preservatie: cold storage versus perfusie
 - 3. Transplantatie: warme en koude ischemietijden
 - 4. De ontvanger: wel of geen rejectie
- } Kortom: van donor naar ontvanger.

Remming van het complement systeem zal dan ook leiden tot een verbeterde transplantaatfunctie en overleving. Een groot probleem in het interveniëren in het complement systeem door middel van de 'oude' geneesmiddelen ten opzichte van onze huidige ideeën is significante remming van het systemisch circulerende complement. Omdat het complement systeem een onderdeel is van het aangeboren immuunsysteem speelt het complement systeem een belangrijke rol bij het voorkomen van infecties en ontstekingen in het lichaam. Het systemische remmen van het complement systeem, zoals de 'oude' geneesmiddelen doen, heeft dan ook als gevaar het risico op het ontstaan van infecties. Een intact complement systeem is een voorwaarde voor een immuun competente toestand.

Wetenschappelijk belang onderliggend project:

Dit huidige projectvoorstel is belangrijk omdat het ons inzichten gaat geven over het effect van:

1. Welke specifieke complement componenten betrokken zijn bij het ontstaan van nierschade in de verschillende fasen van transplantatie. Tot op heden is niet bekend hoe het complement systeem wordt geactiveerd in deze verschillende fasen en welke specifieke routes van het complement systeem hierbij een rol spelen. Dit is een belangrijk onderdeel van onze huidige project aanvraag.(=mechanistisch niveau)
2. De nieuwe inzichten in de pathofysiologische rol van het complement systeem zullen er toe leiden dat het complement systeem op een specifiekere en selectievere manier kan worden geremd. Er zijn reeds complement remmers op de markt die het complement systeem specifiek en selectief kunnen remmen, echter zijn deze nog niet voor transplantatie doeleinden gebruikt of in een transplantatiemodel getest. Hier ligt dus een 'window op oppurtunity' gezien het specifiekere en selectievere remmen van het complement systeem een paar voordelen met zich mee brengt: (a) het complement systeem behoudt zijn natuurlijke functie waardoor het risico op systemische bijwerkingen zoals infectieziekten kleiner is. (b) Het specifiekere en selectievere remmen zorgt ervoor dat er lagere therapeutische doseringen kunnen worden gebruikt, waardoor minder bijwerkingen zullen optreden.(=functioneel niveau)
3. De meest efficiënte en veilige manier van interventie zal worden verduidelijkt. Zoals in de figuur aangegeven zijn er meerder manieren van interventie om een complement component specifiek en selectief te kunnen remmen. Echter is het niet bekend of dit effectiever en tevens veiliger is met bijvoorbeeld een anti-sense DNA molecuul of door middel van een antilichaam. Ook hier gaat de huidige projectaanvraag op in. Deze vraagstelling gaat daarmee hand in hand met punt 2. (=functioneel niveau)

Echter is er meer onderzoek nodig om deze hypothese verder uit te werken, te valideren en om de data te kunnen extrapoleren naar de humane situatie. Daarnaast bestaat het complement systeem uit meer dan 30 eiwitten en zal onderzoek moeten worden gedaan op welk niveau het beste kan worden geremd, dat kan op het niveau van: de drie activatieroutes, centrale component C3 of in de terminale route. Met behulp van deze project aanvraag zullen we deze vragen kunnen beantwoorden.

Maatschappelijk belang onderliggende project

Het complement onderzoek is van belang omdat niertransplantatie de gouden standaard is voor patiënten met eindstadium nierfalen, maar er nog steeds een tekort is aan donornieren. De oplossingen hiervoor zijn ten eerste het verminderen van de vraag: minder mensen op de wachtlijst. Ten tweede, meer aanbod creëren. Het huidige onderzoek draagt bij aan het mogelijk maken van beide oplossingen. De groep die op een donornier wacht wordt gevormd door twee type patiënten. (a) Patiënten die eind stadium nierfalen hebben en wachten op een donornier en (b) patiënten die disfunctie of afstoting van een donornier hebben en daardoor re-transplantatie moeten ondergaan. Ons onderzoek gaat vooral in op patiënten die voor re-transplantatie gaan. De overleving van het transplantaat wordt namelijk beïnvloed door factoren zoals donortype, type preservatie, ischemie/reperfusie tijden en de kans op disfunctie of zelf afstoting van de nier. Om deze schade te verminderen of zelfs te voorkomen zijn nieuwe therapieën nodig, waardoor de overleving van een donornier wordt verlengd. Daarnaast kan complement therapie de donorpool potentieel vergroten door postmortale donoren of donornieren tijdens preservatie te behandelen. Er vindt dan als het waren resuscitatie en revitalisatie van de donornier plaats, waardoor de donornier potentieel wel zou kunnen voldoen aan de donatiecriteria. Het complement systeem heeft hier de potentie voor. Ten eerste omdat het betrokken is in al deze fasen van niertransplantatie en ten tweede omdat momenteel al complement remmers worden gebruikt in de kliniek. Echter hebben deze andere indicaties dan niertransplantatie, namelijk nierziekten als atypische hemolytisch uremisch syndroom (aHUS). Het gebruik van complement remmers in de kliniek toont echter aan dat specifieke en selectieve remming van het complement systeem in patiënten mogelijk, effectief en veilig is. Om deze therapieën voor niertransplantatie (donoren en/of ontvangers) mogelijk te maken is er echter eerst validatie van de werking van complement systeem en de effectiviteit van therapieën in dieren nodig. Dit onderzoek zal bijdragen aan de kennis van het complement systeem in niertransplantatie en leiden tot een nieuwe complement therapieën die zorgen voor een verbetering van nier functie en overleving na niertransplantatie.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

Het doel van ons onderzoek is tweeledig: (1) het onderzoeken van de pathofysiologische processen die ervoor zorgen dat het complement systeem tijdens al deze fasen van transplantatie wordt geactiveerd (=mechanistisch). (2) Het onderzoeken van verschillende interventiemethoden in het complement systeem om ervoor te zorgen dat nierschade tijdens niertransplantatie verminderd (=functioneel).

Mechanistisch

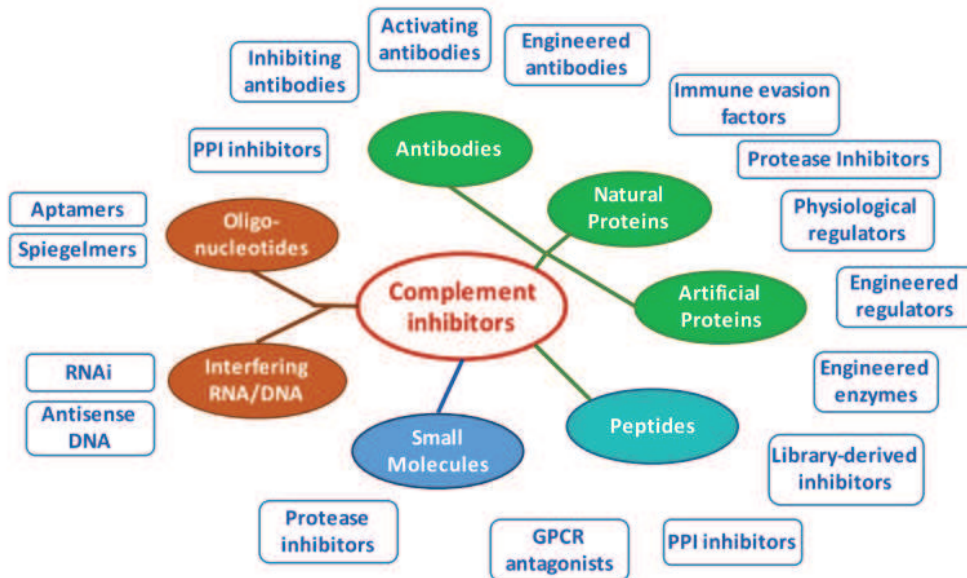
Om deelvraag (1) te kunnen beantwoorden zullen we kijken naar mechanismen van complement activatie. Om de mechanismen van complement activatie te onderzoeken maken we gebruik van KO-lijnen. Deze KO-lijnen worden gebruikt om te onderzoeken of het eiwit dat zij missen een rol speelt bij de activatie van het complement systeem. Secundair hieraan weten we aan de hand van dit onderzoek direct of deze eiwitten wel of niet een potentiële target bij interventie zijn. Momenteel heeft onze onderzoeksgroep 5 KO-lijnen beschikbaar in de CDP. Deze KO-lijnen representeren allen een ander onderdeel van het complement systeem.



Mochten een van de bovenstaande KO-lijnen niet worden gebruikt, dan zullen deze dieren ook niet worden gebruikt. Voor het gebruik van de KO-lijnen moet in vitro /in vivo data beschikbaar zijn over de potentie van deze lijnen.

Functioneel

Om deelvraag (2) te kunnen beantwoorden gaan we functioneel kijken naar de rol van het complement systeem. Hierbij zullen we op verschillende manieren in het complement systeem interveniëren. Onderstaand figuur geeft de mogelijke manieren van interventie in het complement systeem weer.



Figuur: overzicht van alle mogelijke middelen die specifiek in het complement systeem aangrijpen

De middelen die zullen worden gebruikt voor het interveniëren in het complement systeem moeten aan een aantal criteria voldoen:

- a. De middelen moeten specifiek aangrijpen op het complement systeem;
- b. De middelen moeten deels in vitro/in vivo zijn getest. Hieruit moet zijn gebleken dat deze middelen potentie hebben om het complement specifiek en effectief te kunnen remmen.

[Redacted text block]

Bovenstaand zijn de mogelijke interventies, wanneer een van deze interventies niet wordt toegepast, zullen de hiervoor aangevraagde dieren niet worden gebruikt.

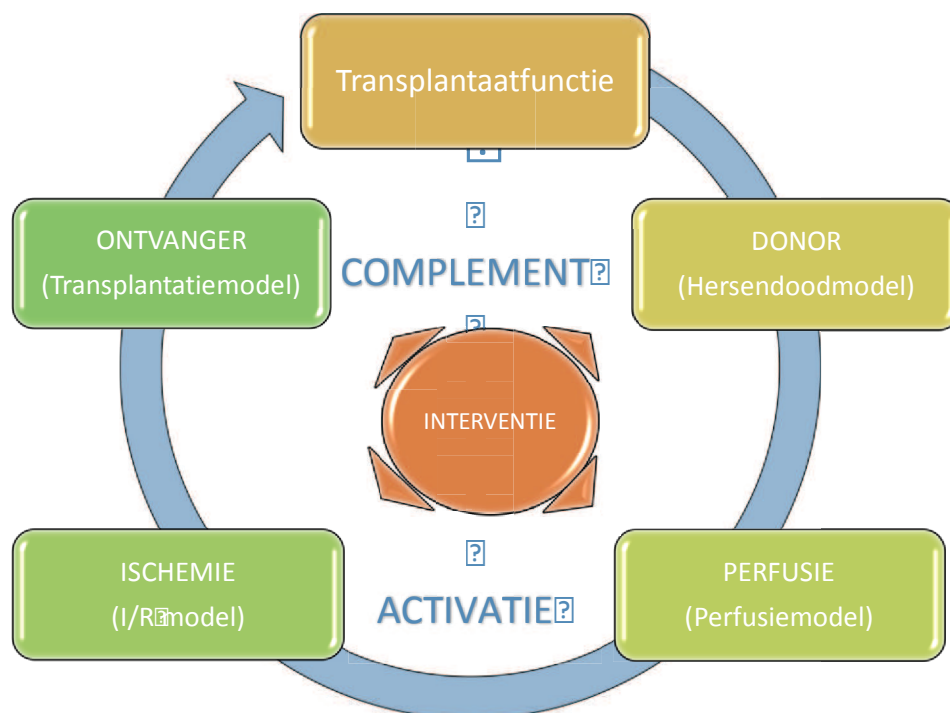
Zowel mechanistisch als functioneel willen we onderzoek doen in verschillende modellen. Elk van deze modellen simuleren een onderdeel van het transplantatieproces waarin het complement systeem wordt geactiveerd.

De modellen waarin mechanistisch en functioneel wordt gekeken zijn:

- Hersendoodinductie model – Bijlage 1
- Perfusiemodel – Bijlage 2
- Ischemie/Reperfusie model – Bijlage 3
- Transplantatiemodel – Bijlage 4

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

De modellen die worden gebruikt in ons project zullen niet altijd in onderstaande volgorde worden uitgevoerd. De reden hiervoor is dat in sommige modellen al een aantal mechanische en functionele onderzoeken zijn gedaan. Zo is er anno 2017 veel meer bekend over de rol van het complement systeem in ischemie/reperfusie dan in bijvoorbeeld hersendood. Met beide argumenten houden we rekening in de uitvoering van onze experimenten. De belangrijkste uitkomstparameter voor alle modellen is nierschade, gemeten aan de hand van inflammatiemarkers en nierfunctie.



Figuur: Van donor naar ontvanger vinden er tijdens transplantatie een aantal processen plaats die ieder op zichzelf staand (maar ook cumulatief) van invloed zijn op de transplantaatfunctie. Onze onderzoeksgroep heeft aangetoond dat het complement systeem tijdens al deze bovengenoemde stappen wordt geactiveerd. Zo zien we in de donor dat een hersendode donor significant meer complement depositie in de nier heeft vergeleken met een levende of hartdode donor. Daarnaast zijn er verschillende perfusiemodellen welke allen in andere mate het complement systeem activeren. Zoals eerder onderzoek heeft laten zien wordt er tijdens ischemie/reperfusie ook complement geactiveerd doordat de epitheelcellen in de nier als gevolg van ischemie/reperfusie meer gevoelig worden voor complement activatie. Daarnaast zorgt complement activatie in de donor na transplantatie voor het aantrekken van afweercellen in de ontvanger. Kortom van donor tot ontvanger, in elke stap wordt het complement systeem geactiveerd met als gevolg een verminderde transplantaatfunctie. Onze diermodellen representeren en modelleren de stappen van donor en ontvanger en zijn daarom geschikte modellen om de mechanistische en functionele rol van het complement systeem te onderzoeken.

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.

Fasering:

❖ **Alle modellen**

Voor nieuwe middelen zal, voor zover noodzakelijk, eerst bekend moeten zijn wat het te verwachten effect is en de daarmee gepaard gaande bijwerkingen. Eventueel zal dit met in vitro werk worden gedaan of worden gebaseerd op eerdere literatuur. In de volgende fase zullen de nieuwe middelen worden toegepast in de eerder genoemde in vivo modellen.

❖ **Transplantatiemodel**

Voor het transplantatie model (bijlage 4) geldt dat het mechanistische/functionele experiment eerst moet zijn uitgevoerd in een ander model (beschreven in bijlage 1, 2 en 3) eventueel op basis van valide literatuurreferenties. Het tweede keuze moment (NO GO) zal zijn dat de methoden niet worden toegepast op het transplantatiemodel als uit een eerder model negatieve resultaten zijn verkregen.

Mijlpalen - Algemene GO/NO GO momenten:

GO/NO GO 1 - werkzaamheid middel: Door middel van pilot experimenten zal zo nodig worden onderzocht wat de juiste dosering van de nieuwe middelen moet zijn en/of de interventie strategie werkzaam is. Dit kan betekenen dat een middel ook eerst getest kan worden zonder de toepassing van een model. Dit om te kijken of het middel in vivo dezelfde uitkomsten geeft dan in vitro. Als zonder het toepasbare model blijkt dat het middel al niet werkzaam is, zal dit middel niet worden gebruikt in een model.

GO/NO GO 2 – ongerief dieren: Daarnaast zal in het pilot experiment worden gekeken hoe het ongerief van de dieren kan worden gereduceerd. Het keuze moment bij elk experiment is de uitkomst van het al dan niet uitgevoerde pilot experiment. Als uit het pilot experiment blijkt dat het ongerief van de dieren proportioneel hoog is of de dosis van de nieuwe middelen onverantwoord zijn, zal dit middel niet worden gebruikt. Dit zelfde geldt voor de KO-lijnen.

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

| Volgnummer | Type dierproef |
|------------|--------------------------|
| 1 | Hersendoodinductiemodel |
| 2 | Preservatietechnieken |
| 3 | Ischemie/Reperfusiemodel |
| 4 | Transplantatiemodel |
| 5 | |
| 6 | |
| 7 | |
| 8 | |
| 9 | |
| 10 | |



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef |
|------------|-------------------------|
| 3.4.4.1. | Hersendoodinductiemodel |

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.

Hoewel het aantal donornieren gedoneerd door levende en harddode donoren toeneemt, wordt echter nog een substantieel deel van de donornieren verkregen via hersendode donoren. Donornieren van hersendode donoren geven inferieure resultaten in vergelijking met donatie bij leven of na hartdood [Terasaki et al. N Engl J Med 1995;10;333(6):333-336]. Een van de factoren die hiervoor predisponeert is de activatie van het complement systeem in hersendood. Geactiveerde complement componenten zorgen voor het ontstaan van een ontstekingsreactie in de nier. Deze hersendood geïnduceerde renale inflammatie zorgt voor schade van het transplantaat, met verslechtering van de nierfunctie als gevolg

Keuze hersendoodinductiemodel:

Het hersendoodinductie model maakt het mogelijk zowel de mechanistische als functionele rol van het complement systeem te bestuderen. Het Ons model simuleert de humane hersendood situatie in die zin dat er een vergelijkbare mate van schade en daarmee inflammatie wordt veroorzaakt na hersendoodinductie als humaan gezien. Dit zorgt ervoor dat ons model een optimale face validity heeft.

Uitkomstparameters:

De uitkomstparameters in het hersendoodinductie model zijn de nierfunctie en mate van nierschade. Wij hebben voor deze uitkomstparameters gekozen omdat deze parameters in de humane situatie ook als maatstaf voor nierfunctie worden gebruikt. Daarnaast is in eerder onderzoek aangetoond dat de interleukine-6 expressie de meest uitgesproken inflammatoire marker in hersendood is, welke 60-100 maal is verhoogd in hersendode diermodellen

De nierfunctie zal worden gemeten aan de hand van de hoeveelheid creatinine en ureum in het plasma. De mate van nierschade wordt bepaald aan de hand van de mate van inflammatie, waarbij interleukine expressies worden bepaald.

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.

Opzet:

Bij adequaat geanestheseerde dieren zal hersendoodinductie plaatsvinden. Hersendood zal worden geïnduceerd door een ballonkatheter in de extradurale ruimte te plaatsen en op te blazen. De manier waarop hersendood wordt geïnduceerd zorgt ervoor dat dezelfde mate van inflammatie wordt bereikt als bij de humane hersendode donoren. Hersendood wordt vastgesteld middels de afwezigheid van een adem prikkel en het verloop van de bloeddruk. Na hersendood zal de anesthesie stoppen en zullen de dieren worden geventileerd. De dieren worden tot maximaal 4 uur na hersendoodinductie gemonitord om vitale functies te meten. Hierna zullen de dieren worden getermineerd. Bloed, urine en organen worden verzameld en opgeslagen.

| Experiment (fases) | Hersendoodinductie | Monitoring | Terminatie + opslag |
|--------------------|--------------------|------------|---------------------|
| Tijdsbeloop (min) | T0-T30 | T30-T270 | T270 |

Niet aangegeven in tabel: Wanneer nieuwe middelen worden getest zal dit zowel voor als na de hersendoodinductie kunnen worden gedaan.

De reden dat nieuwe middelen voor hersendoodinductie worden toegediend is gebaseerd op het principe van 'proof of principle', zodat we er zeker van zijn dat het middel op de juiste plek komt, in de juiste tijdspanne. Dit omdat in de humane situatie de hersendode donor vaak 12-16 uur hersendood is voor donatie. Hierdoor is er genoeg tijd om in deze tijdspanne een medicijn toe te dienen welke op de juiste plaats komt. In ons model werken we echter met modellen waarin maximaal 4 uur hersendood plaatsvindt, waardoor het medicijn wellicht niet genoeg tijd heeft op de juiste plaats in het lichaam te komen. Hierdoor dienen we als 'proof of principle' het medicijn voor hersendood toe, gebaseerd op de halfwaardetijd van het middel. Tijdstip van toediening is daarom afhankelijk van de halfwaardetijd van het medicijn. Toedieningsweg wordt eveneens bepaald door type medicijn. Dit kan oraal, intraveneus, intramusculair, subcutaan of intra peritoneaal zijn.

Hersendood: rat versus muis

De hersendoodinductie in ratten en muizen is overeenkomstig. De manier waarop hersendood wordt geïnduceerd is hetzelfde in beide species. Het enige verschil is dat het hersendoodmodel in de rat 4 uur duurt en in de muis 3 uur. De reden voor dit verschil is dat muizen een sneller metabolisme hebben en het effect van 3 uur hersendood daarmee overeenkomstig is met het 4 uur durende hersendoodmodel in de muis

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

Op basis van eerdere experimenten kunnen we voor de meeste primaire uitkomstmaten een te verwachten effectgrootte voorspellen. Door middel van powercalculaties wordt daarmee het aantal dieren beperkt. Daarnaast zal door middel van standaardisatie de variatie worden beperkt en daarmee het aantal benodigde dieren tot een minimum worden beperkt.

B. De dieren

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

Diersoorten: Muizen en ratten. Zowel wildtypes als genetisch gemodificeerde dieren. Muizen worden gebruikt omdat genetische modificatie veelgebruikt en makkelijker te bewerkstelligen is in muizen, zoals KO modellen. Beide, zowel muizen en ratten, worden gebruikt voor de overige medicatie types beschreven in de bijlage 'Het Projectvoorstel'. Voor de hersendoodinductie experimenten zullen zowel mannelijke als vrouwelijke dieren in gelijke mate worden gebruikt.

Herkomst: Aankoop van commerciële, erkende leveranciers of andere instellingen. Via samenwerkingsverbanden of eigen fok. Momenteel hebben we 5 genetisch gemodificeerde foklijnen in de CDP in Groningen, benoemd in 'Het Projectvoorstel'. De herkomst van de dieren zal afhangen van de onderzoeksvraag.

Levensstadia: Volwassen dieren (ook de grootste humane groep).

Geschatte aantallen: Het hersendoodmodel zal gebruikt worden voor zowel mechanistische als functionele vraagstellingen. Op basis van poweranalyse zullen per groep 10 dieren worden aangevraagd, waarbij er maximaal 4 groepen in een experiment zitten. De inclusie van 8 dieren per groep is met een power van 80%

en een standaarddeviatie van 10% voldoende [Alpha 0.05]. Echter houden wij rekening met een additionele uitval van maximaal 20% per groep, wat neer komt op 2 extra dieren per groep en daarmee dus 10 dieren per groep.

Uitval:

De uitval van maximaal 20% is gebaseerd op onze eerdere ervaringen met het hersendoodinductie model, waarbij uitval werd veroorzaakt door bijvoorbeeld overbelasting van het hart. Overbelasting van het hart wordt veroorzaakt doordat de dieren tijdens de 3-4 uur hersendoodperiode hemodynamisch stabiel worden gehouden met volume expanders in combinatie met vasoconstrictoren. Hierbij zien we soms dat de dieren vroegtijdig overlijden. Onze gegevens laten zien dat dit niet het gevolg is van overvulling of dat er een samenhang is met de hoeveelheid plasma expander die wordt toegediend, dit is dus het gevolg van individuele gevoeligheid voor de verschillende pathofysiologische processen geïnduceerd door hersendood. De procedure kent een maximale hoeveelheid plasma expander en vasoconstrictoren welke mogen worden toegediend.

Daarnaast vragen wij nog pilotdieren aan. Met de pilot kan de toedieningsweg, tijd van toediening en dosering van de medicatie worden getest. Dit al dan niet in combinatie met de hersendoodinductie (afhankelijk van de vraagstelling). Per experimentele groep vragen wij n=4 aan. Wanneer een pilot niet nodig is, zullen de pilotdieren niet worden gebruikt.

Opzet experiment:

| Diersoort | [A] pilotdieren | [B] max aantal groepen per pilot | [C] Aantal dieren per groep + uitval | [D] Max aantal groepen per experiment | [E] Aantal experimenten per jaar | [F] Totaal per jaar = [A]x[B]x[E] + [C]x[D]x[E] | Totaal 5 jaar = [F] x 5 |
|---------------|-----------------|----------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------|---|-------------------------|
| Muizen | 4 | 4 | 10 | 4 | 1 | 56 + | 280 + |
| Ratten | 4 | 4 | 10 | 4 | 2 | 96 + | 480 + |
| Totaal | | | | | | 152 = | 760 = |

Per jaar worden gemiddeld 3 hersendoodexperimenten in ratten en muizen uitgevoerd. Dit brengt het totaal op **152** dieren per jaar. Voor 5 jaar zijn dit **760** dieren.

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.

Vervanging: Tot op heden is er geen goede vervanging van het hersendoodinductiemodel door middel van in vitro experimenten. Hedendaags is er wel een brain slice model, waarbij gekeken kan worden naar het effect op hersencellen zelf. Echter is onze primaire uitkomstmaat nierfunctie en nierschade. Om dit te onderzoeken is het noodzakelijk een proefdiermodel te gebruiken. Door middel van in vitro experimenten wordt voorwerk verricht over de te verwachten effecten van de nieuwe middelen/strategieën.

Vermindering: Wij reduceren het aantal dieren door vooraf uitgevoerde powercalculaties. Meer dieren zullen tijdens het experiment niet worden gebruikt. Daarnaast zullen onze biotechnici de omstandigheden tijdens de proef optimaal houden, waardoor variatie wordt gereduceerd en daarmee het aantal benodigde dieren. Hoewel het effect van complementinterventie na hersendood op nierfunctie onze primaire uitkomstmaat is in dit model, zullen ook andere organen worden uitgenomen. Hierdoor zullen in de toekomst secundaire uitkomstmaten kunnen worden geanalyseerd, zonder dat er nieuwe experimenten moeten worden uitgevoerd.

Verfijning: Tijdens het hersendoodinductiemodel wordt gezorgd voor adequate algehele anesthesie. Tijdens de anesthesie zal door middel van adequate controle en monitoring van de dieren worden getracht het vooraf vastgestelde ongerief niet te overschrijden.

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.

De hersendoodinductie zal plaatsvinden onder adequate algehele anesthesie. Tijdens het boren van een gat in de schedel zal lokaal lidocaïne worden gegeven. Door middel van adequate controle en monitoring van de dieren zal het vooraf vastgestelde ongerief niet worden overschreden.

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.

Het hersendoodinductie model is een specifiek model ontwikkelt en operationeel gemaakt door onze eigen biotechnici. Over de wereld zijn maar een paar onderzoeksgroepen die dit hersendoodinductie model gebruiken. De toepassing van interventies specifiek gericht op het complement systeem op dit hersendoodinductie model is dan ook uniek in de wereld en wordt alleen toegepast door onze eigen onderzoeksgroep.

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 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.

Hersendood wordt onder algehele anesthesie geïnduceerd. Daarnaast zal lokaal lidocaïne worden toegediend ter preventie van pijn tijdens het boren van een opening in de schedel.

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.

Niet van toepassing

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

Niet van toepassing

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.

- Overbelasting van het hart (kan complicatie van hersendood zijn, in dergelijke gevallen wordt de proef gestopt)
- Gewichtsverlies van meer dan 15%
- Inactiviteit van het dier
- Conditie van de vacht
- Ontstekingsverschijnselen
- Bijwerkingen injecties

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

Dit hangt onder andere af van het gebruik van wildtype dieren of genetisch gemodificeerde dieren. Op basis van eerder uitgevoerde experimenten met dit hersendoodinductie model wordt het percentage geschat op 10-20% uitval. De verwachte ongerief op basis van de injecties is 'licht' en kwantitatief zeer laag (<2%). Dit is op basis van onze eerdere ervaringen met het geven van dergelijke injecties voor/na hersendood.

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.

Injecties: Licht

Hersendoodinductie: Terminaal

Totaal: Licht

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.

Uitname van organen is noodzakelijk voor het bereiken van de primaire eindpunten.

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.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef |
|------------|-----------------------|
| 3.4.4.2 | Preservatietechnieken |

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.

De kwaliteit en levensduur van het transplantaat lijken voor een belangrijk deel bepaald te worden door de omstandigheden waarin de organen worden gepreserveerd. Tot voor kort werden donornieren gespoeld met een koude, zuurstofloze vloeistof. Vervolgens werden ze verpakt en op ijs gezet en zo snel mogelijk naar het ziekenhuis van de ontvanger gebracht. De koeling op ijs zorgt ervoor dat het metabolisme van het orgaan bijna volledig stil komt te liggen. Dat beperkt de schade aan het orgaan. Ondanks dat deze methode 30 jaar is gebruikt, is de methode zelf vrij grof. Goede organen die overleven dit proces, die kunnen tegen een stootje. Maar organen die enigszins beschadigd uit de donor komen, kunnen veel minder hebben, wat gevolgen kan hebben voor de transplantaatfunctie. Een nieuwe techniek is de machinale preservatie, ook wel perfusie genoemd. Hierbij worden de organen gespoeld met zuurstofrijke vloeistof en blijven die tijdens de bewaring continu rondpompen. Het orgaan wordt daarbij niet altijd meer gekoeld. Deze methode houdt de kwaliteit van organen als de nier beter in stand. Vandaar dat onderzoek naar het effect van perfusiemethoden en het ontwikkelen van nieuwe perfusiemethoden belangrijk is.

Keuze perfusiemodel:

We hebben gekozen voor het perfusiemodel omdat deze techniek relatief nieuw en veelbelovend is. Op ons lab zijn de perfusiemodellen geoptimaliseerd voor meerdere organen. Het model van deze pompen is gebaseerd op de humane situatie, waardoor de resultaten goed zijn te vergelijken met de humane perfusiemodellen. Momenteel hebben we voor meerdere organen een perfusiemodel: long, lever en nieren.

Primaire uitkomstparameters:

De uitkomstparameters zijn de nierfunctie en mate van nierschade. Wij hebben voor deze

uitkomstparameters gekozen omdat deze parameters in de humane situatie ook als maatstaaf voor nierfunctie worden gebruikt. De nierfunctie zal worden gemeten aan de hand van de hoeveelheid creatinine en ureum in het urine. De mate van nierschade wordt bepaald aan de hand van de mate van inflammatie, waarbij interleukine expressies worden bepaald. Omdat onze primaire uitkomstparameters in urine worden bepaald zal urineproductie ten tijde van machineperfusie noodzakelijk zijn.

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.

Opzet:

Onder algehele anesthesie vindt dubbelzijdige nefrectomie plaats. Hierbij wordt de ureter vrij geprepareerd en gecanuleerd. Vervolgens wordt de aorta caudaal van de arteria renalis vrij geprepareerd en gecanuleerd. De arteria renalis en de vena renalis worden vervolgens eveneens gecanuleerd. Hierna vindt de nefrectomie plaats en wordt het dier getermineerd. Bloed, urine en organen worden verzameld en opgeslagen.

Door middel van de canules wordt de nier aangesloten op de perfusiemachine. Hier wordt afhankelijk van de vraagstelling druk- of volume gereguleerd vloeistof door de nier gepompt. De vloeistofsamenstelling is afhankelijk van de vraagstelling en gestandaardiseerd in een vooraf uitgevoerd pilot experiment. Tijdens het gehele experiment, zowel pilot als interventie, wordt de geproduceerde urine opgevangen.

Afhankelijk van de vraagstelling zal al dan niet een medicijn worden toegevoegd aan de perfusievloeistof. Tijdstmoment is afhankelijk van de vraagstelling. Een pilotexperiment zal vooraf worden uitgevoerd om te bepalen wat de optimale dosering, toedieningstijd en werkzaamheid van het medicament in de perfusievloeistof is. Daarnaast is het wellicht nodig om de condities van de perfusiemachine te bepalen, hierbij moet worden gedacht aan het bepalen van de juist druk waarmee de vloeistof wordt rond gepompt of de hoeveelheid zuurstof in de perfusievloeistof. Dit zal niet voor elk experiment nodig zijn, maar afhankelijk zijn van de vraagstelling. In de pilot zullen dan minimaal 1 parameter en maximaal 3 parameters worden getest (zoals medicatieparameters, druk, zuurstofconcentratie, temperatuur, volume en priming (=additieven) van de vloeistof). In het daadwerkelijke interventie experiment zullen we vervolgens perfusie met interventie en perfusie zonder interventie (en eventueel cold storage) met elkaar vergelijken. Kortom, maximaal 3 preservatie condities.

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

Op basis van eerdere experimenten kunnen we voor de meeste primaire uitkomstmaten een te verwachten effectgrootte voorspellen. Door middel van powercalculaties wordt daarmee het aantal dieren beperkt. Daarnaast zullen interindividuele verschillen tussen de dieren zo klein mogelijk worden gehouden om variatie tussen de dieren te beperken en daarmee het benodigde aantal dieren zo klein mogelijk te houden.

B. De dieren

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

Diersoorten: Ratten. Zowel wildtypes als genetisch gemodificeerde dieren. De perfusiemodellen zijn alleen geoptimaliseerd en ontworpen voor ratten. De reden hiervoor is, is dat de nieren van muizen te klein zijn om te canuleren en aan te sluiten op de perfusiemachines. Voor de experimenten zullen zowel mannelijke als vrouwelijke dieren in gelijke mate worden gebruikt.

Herkomst: Aankoop van commerciële, erkende leveranciers of andere instellingen. Via samenwerkingsverbanden of eigen fok. De herkomst van de dieren zal afhangen van de onderzoeksvraag.

Levensstadia: Volwassen dieren.

Geschatte aantallen: Het preservatiemodel zal worden gebruikt om zowel mechanistische als functionele vraagstellingen te beantwoorden. Op basis van poweranalyse zullen per groep 10 dieren worden aangevraagd. De inclusie van 8 dieren per groep is met een power van 80% en een standaarddeviatie van 10% voldoende [Alpha 0.05]. Echter houden wij rekening met een additionele uitval van maximaal 20% per groep, wat neer komt op 2 extra dieren per groep en daarmee dus 10 dieren per groep. Deze uitval van maximaal 20% is gebaseerd op onze eerdere ervaringen met het perfusie model, waarbij uitval werd veroorzaakt door bijvoorbeeld een afwijkende anatomie of het niet produceren van urine door de nier tijdens perfusie (urine is een belangrijkste uitkomstparameter).

Opzet experiment:

PILOT EXPERIMENT:

Groep 1: Parameter 1 (n=3)

Groep 2: Parameter 2 (n=3)

Groep 3: Parameter 3 (n=3)

Totaal per pilot experiment: **9** dieren.

INTERVENTIE EXPERIMENT

Groep 1: Experimentele groep → Pomp met medicijn (n=10)

Groep 2: Experimentele groep → Pomp zonder medicijn (n=10)

Per experiment gemiddeld **20** dieren gebruikt.

| Diersoort | [A] Dieren per groep in pilot | [B] Groepen in pilot | [C] Aantal dieren per exp groep + uitval | [D] Aantal groepen/ Exp | [E] Aantal Exp per jaar | [F] Totaal per jaar [A]x[B]x[E] + [C]x[D] x[E] | Totaal 5 jaar [F] x 5 |
|---------------|-------------------------------|----------------------|--|-------------------------|-------------------------|--|-----------------------|
| Ratten | 3 | 3 | 10 | 2 | 4 | 116 | 580 |

Per jaar worden gemiddeld 4 preservatie experimenten in ratten uitgevoerd. Dit brengt het totaal op **116** dieren per jaar. Voor 5 jaar zijn dit **580** dieren.

Er zijn minder pilot dieren nodig wanneer de opzet van het experiment, dus de perfusie, niet anders is dan bij een eerder experiment. Hierbij hebben we het over pompinstellingen en controleparameters. Hetzelfde geldt voor de controle groepen van de interventie experimenten.

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.

Vervanging: Momenteel is er geen goede andere mogelijkheid om de mogelijkheden van de perfusiemachines te testen dan door middel van proefdieren. Nieuwe ontwikkelingen laten steeds meer mogelijkheden voor artificiële modellen zien, echter staan deze technieken nog zodanig in de kinderschoenen dat we daarmee niet de totale mogelijkheden van de perfusiemachine mee kunnen testen.

Vermindering: Zo min mogelijk dieren worden gebruikt door middel van powercalculatie en door het meenemen van ervaringen uit eerdere experimenten. Uitval tijdens de nefrectomie is laag, bij afwijkende anatomie van een nier kan waar mogelijk de andere nier worden gebruikt.

Verfijning: Door algehele anesthesie tijdens de dubbelzijdige nefrectomie wordt gestreefd naar optimale pijnbestrijding.

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.

Adequate algehele anesthesie.

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.

Voor zover bekend uit de literatuur wordt dit model nog niet toegepast om te kijken naar de invloed van het complementsysteem op nierfunctie.

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.

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.

n.v.t.

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

n.v.t.

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.

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

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.

Nefrectomie: Terminaal

Totaal: Terminaal

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.

Uitname van organen is noodzakelijk voor het bereiken van de primaire eindpunten.

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.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef |
|------------|---------------------------|
| 3.4.4.3 | Ischemie/Reperfusie model |

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.

Elke niertransplantatie gaat gepaard met ischemie/reperfusie (I/R) schade. Door het toenemende tekort aan donoren worden steeds vaker organen van marginale donoren gebruikt voor transplantatie, waarbij ook sprake is van hogere ischemietijden [Mange et al. N ENgl J Med 2001;344:726-31]. I/R schade kan acute en chronische transplantaatdisfunctie veroorzaken en uiteindelijk leiden tot het falen van het niertransplantaat. Kortom er is een toenemende behoefte aan interventies gericht op het verminderen van I/R schade in de getransplanteerde nier. Een van de belangrijkste mechanismen die ten grondslag ligt aan het ontstaan van I/R schade is lokale inflammatie in het transplantaat. Eerder heeft onze onderzoeksgroep aangetoond dat het complementsysteem betrokken is bij het ontstaan van deze inflammatie [unpublished data].

Keuze ischemie/reperfusie model:

Door middel van het I/R model (eenzijdige reperfusie) zijn wij in staat om nieuwe manieren voor interventie tijdens de ischemie periode te testen. Ons model simuleert de humane I/R schade goed, waardoor er sprake is van een hoge face validity. De reden waarom we voor eenzijdige reperfusie hebben gekozen is omdat er meestal ook maar één transplantaat wordt terug getransplanteerd. Om te bepalen welke ischemietijd optimaal is zullen we vooraf een pilot experiment doen waarbij de beste ischemietijd wordt bepaald. Hierdoor kan met zekerheid worden vastgesteld of er voldoende mate van I/R schade optreedt in ons I/R model in relatie tot onze onderzoeksvraag.

Uitkomstparameters:

De uitkomstparameters in het I/R model zijn de nierfunctie en de mate van nierschade. Wij hebben deze uitkomstparameters gekozen omdat deze parameters in de humane situatie ook als maatstaaf voor nierfunctie worden gebruikt. Daarnaast zijn beide parameters valide te meten in dit I/R model. De nierfunctie zal worden gemeten aan de hand van de hoeveelheid creatinine en ureum in het plasma en

urine. De mate van nierschade wordt bepaald aan de hand van de mate van inflammatie, waarbij interleukine expressies worden bepaald.

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.

Opzet:

Onder algehele anesthesie wordt middels mediane laparotomie het abdomen geopend. Vervolgens wordt renale ischemie geïnduceerd door het afklemmen van de renale arterie met twee klemmen. De duur van de ischemie is afhankelijk van de vraagstelling en kan zorgen voor het induceren van milde/matige/hoge nierschade. Na het verwijderen van de klemmen worden de nieren geïnspecteerd op het herstel van de reperfusie. Vervolgens wordt het abdomen gesloten. De dieren zullen afhankelijk van de vraagstelling 1-28 dagen postoperatief worden getermineerd. Bloed, urine en organen worden verzameld en opgeslagen.

| Experiment* (fases) | Inductie ischemie | Perioden van monitoring | Terminatie + opslag |
|---------------------|-------------------|-------------------------|---------------------|
| Tijdsbeloop (dagen) | T0 | T1-28 | T28 |

Niet aangegeven in tabel:

De duur zal minimaal 30 tot maximaal 45 minuten zijn, afhankelijk van de uitkomsten van onze pilot experimenten. In de pilotexperimenten zal de beste ischemietijd worden bepaald aan de hand van nierfunctie en nierschade, zoals bovengenoemd.

Wanneer nieuwe manieren worden getest zal dit zowel voor als na de operatie kunnen worden gedaan. Tijdstip van toediening is afhankelijk van de halfwaardetijd van het medicijn. Toedieningsweg wordt eveneens bepaald door type medicijn. Dit kan oraal, intraveneus, intramusculair, subcutaan of intra peritoneaal zijn.

*Voor zowel het pilot experiment als daadwerkelijke experiment gebruiken we in principe dezelfde proefopzet.

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

Op basis van eerdere experimenten kunnen we voor de meeste primaire uitkomstmaten een te verwachten effectgrootte voorspellen. Door middel van powercalculaties wordt daarmee het aantal dieren beperkt. Daarnaast zullen interindividuele verschillen tussen de dieren zo klein mogelijk worden gehouden om variatie tussen de dieren te beperken en daarmee het benodigde aantal dieren zo klein mogelijk te houden.

Daarnaast zullen we in het pilot experiment per keer één ischemietijd testen. Hierbij wordt op basis van de literatuur de meest gebruikte ischemietijd eerst getest. Mocht dit voldoende nierschade induceren zullen we de andere ischemietijd niet meer testen in het pilot experiment. Hiermee wordt het aantal dieren nodig voor het pilot experiment geminimaliseerd.

B. De dieren

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

Diersoorten: Muizen en ratten. Zowel wildtypes als genetisch gemodificeerde dieren. Muizen worden gebruikt omdat genetische modificatie veelgebruikt en makkelijker te bewerkstelligen is in muizen, zoals KO modellen. Beide, zowel muizen en ratten, worden gebruikt voor de overige medicatie types beschreven in de bijlage Projectvoorstel. Voor de experimenten zullen zowel mannelijke als vrouwelijke dieren in gelijke mate worden gebruikt.

Herkomst: Aankoop van commerciële, erkende leveranciers of andere instellingen. Via samenwerkingsverbanden of eigen fok. Momenteel hebben we 5 genetisch gemodificeerde foklijnen in de CDP in Groningen. De herkomst van de dieren zal afhangen van de onderzoeksvraag.

Levensstadia: Volwassen dieren.

Geschatte aantallen: In het I/R model zullen zowel mechanistische als functionele vraagstellingen worden

getest. Op basis van poweranalyse zullen per groep 9 dieren worden aangevraagd. De inclusie van 8 dieren per groep is met een power van 80% en een standaarddeviatie van 10% voldoende [Alpha 0.05]. Echter houden wij rekening met een maximale uitval van 10% per groep, wat neer komt op 1 extra dier per groep. Deze uitval van maximaal 10% is gebaseerd op eerdere ervaringen met het I/R model, waarbij uitval werd veroorzaakt door te diepe anesthesie of overschrijding van het ongerief door te slechte nierfuncties. Voorafgaand zal zoals eerder benoemd een pilot experiment worden uitgevoerd, waarbij minimaal 1 ischemietijd en maximaal 3 ischemietijden worden getest. Hierbij hebben we genoeg aan 4 dieren per groep.

Opzet experiment:

PILOT EXPERIMENT:

Groep 1: experimentele groep → ischemietijd A (n=4)

Groep 2: experimentele groep → ischemietijd B (n=4)

Groep 3: experimentele groep → ischemietijd C (n=4)

Groep 4: controle groep → geen ischemie (n=4)

Totaal per pilot experiment: **16** dieren

INTERVENTIE EXPERIMENT:

Groep 1: Ischemietijd X → wel interventie (n=9)

Groep 2: Ischemietijd X → geen interventie (n=9)

Groep 3: Controle groep – geen ischemie → wel interventie (n=9)

Groep 4: Controle groep – geen ischemie → geen interventie (n=9)

Totaal per interventie experiment: **36** dieren

| Diersoort | [A] Dieren per groep in pilot | [B] Groepen in pilot | [C] Aantal dieren per groep +uitval | [D]Aantal groepen/ Exp | [E] Aantal Exp per jaar | [F] Totaal per jaar [A]x[B]x[E]+[C]x[D]x[E] | Totaal 5 jaar [F] x 5 |
|---------------|-------------------------------|----------------------|-------------------------------------|------------------------|-------------------------|---|-----------------------|
| Muizen | 4 | 4 | 9 | 4 | 1 | 52 | 260 |
| Ratten | 4 | 4 | 9 | 4 | 1 | 52 | 260 |
| Totaal | | | | | | 104 | 520 |

Per jaar worden er gemiddeld 2 I/R experimenten in ratten en muizen uitgevoerd. Dit brengt het totaal op **104** dieren per jaar. Voor 5 jaar zijn dit **520** dieren.

Er zijn minder pilot dieren nodig wanneer de opzet van het experiment, dus de ischemietijd, niet anders is dan bij een eerder experiment. Daarbij mag de tijd tussen het uitvoeren van de experimenten niet groter dan 1 jaar zijn in verband met verschillen in muizen/ratten lijnen. Hetzelfde geldt voor de controle groepen van de interventie experimenten.

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.

Vervanging: Momenteel is er nog geen optimaal in vitro model om het in vivo I/R model mee te simuleren. Door middel van in vitro experimenten wordt waar mogelijk voorwerk verricht over de te verwachten effecten van het middel tijdens de dierproef.

Vermindering: Wij reduceren het aantal dieren door vooraf uitgevoerde powercalculaties. Meer dieren zullen tijdens het experiment niet worden gebruikt. Daarnaast zullen onze biotechnici de omstandigheden tijdens de proef optimaal houden, waardoor variatie wordt gereduceerd en daarmee het aantal benodigde dieren. Daarnaast zullen we in het pilot experiment maar een ischemietijd per keer testen, waarbij wordt gestart met de in de literatuur meest optimale ischemietijd.

Verfijning: Door goede algehele anesthesie en pijnstilling perioperatief wordt de pijn geminimaliseerd. Daarnaast zullen de dieren de dagen na I/R goed worden gemonitord om de algehele conditie te beoordelen. Wanneer discomfort wordt overschreden zal het dier worden getermineerd.

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.

Perioperatief zal pijnmedicatie worden toegediend. Door adequate monitoring wordt voorkomen dat het vooraf vastgestelde ongerief niet wordt overschreven. Mocht dit wel het geval zijn zullen gepaste maatregelen worden genomen.

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.

Het I/R model is een bekend model, die in de literatuur meermaals wordt beschreven. Om er zeker van te zijn dat dit model niet eerder in dezelfde toepassing is gebruikt, zal voorafgaand een literatuurstudie worden gedaan en wordt de database van de CDP geraadpleegd. Dit zal vooraf naar de IvD worden gecommuniceerd.

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.

Na I/R worden de dieren individueel gehuisvest in verband met de abdominale wond.

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.

Waar nodig zal in overleg met de welzijnscommissie meer pijnstilling in de vorm van lokale pijnverlichting worden toegepast. Door goede monitoring van de dieren zal worden gemonitord of dit voldoende is of dat er andere gepaste maatregelen moeten worden genomen.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Door wondpijn, het bijkomen uit de narcose en het ontwikkelen van een nierinfarct.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Oorzaken wondpijn: niet goed sluiten van de wond, approximeren van de wond, wondinfectie.

Oorzaken slecht bijkomen van narcose: langdurig onder anesthesie.

Oorzaken ontwikkelen infarct: slechte reperfusie na ischemie.

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

Wondpijn: perioperatieve pijnstilling.

Narcose: goede monitoring na narcose, waar nodig antidotum.

Nierinfarct: symptomen van nierfalen monitoren, waar nodig relaparotomie of andere gepaste maatregelen.

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.

- Nierfalen. Voor het bepalen van de nierfunctie zal creatinine worden gemeten. De creatininelevels zullen worden gebruikt als maat voor de nierfunctie en kunnen daarmee ook als drempelwaarde fungeren voor de ontwikkeling van nierfalen.
- Gewichtsverlies van meer dan 15%
- Inactiviteit van het dier
- Conditie van de vacht
- Ontstekingsverschijnselen

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

Dit hangt af van het gebruik van wildtype dieren of genetische gemodificeerde dieren. Op basis van eerder uitgevoerde experimenten met het I/R model wordt het percentage geschat op maximaal 10%.

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.

Ischemie/reperfusie schade: Matig

Injecties: Licht

Totaal: Matig

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.

Uitname van organen is noodzakelijk voor het bereiken van de primaire eindpunten.

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.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef |
|------------|--------------------------|
| 3.4.4.4. | Niertransplantatie model |

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.

Het grote tekort aan donororganen is onze drijfveer om te onderzoeken hoe efficiënter kan worden omgegaan met de beschikbare donornieren. Het tekort aan donornieren wordt veroorzaakt door de toenemende vraag aan donornieren bij een tekort in aanbod. Momenteel wachten veel mensen op een nier, het terugdringen van deze wachttijden is van belang. Niet alleen voor de ontvanger, maar ook omdat uit onderzoek is aangetoond dat transplantaatfunctie negatief geassocieerd is met de duur van dialyse in de ontvanger. Alhoewel allerlei factoren van invloed zijn op de uitkomst van de transplantatie, is het belangrijk ook kritisch te kijken naar de transplantatie zelf. Want ook tijdens transplantatie zelf wordt schade aan de nier veroorzaakt door ontstekingsprocessen. En ook hier speelt het complement systeem een belangrijke rol in.

Keuze van transplantatiemodel:

Ons transplantatiemodel modelleert de niertransplantatie op dezelfde manier als in de mens. De reden waarom het transplantatiemodel is opgenomen in deze aanvraag is omdat dit model ideaal is om te kijken naar graft survival. Hierdoor kunnen we kijken naar de rol/invloed van het complement systeem op graft survival. Daarnaast kunnen we door middel van interventie kijken of de graft survival verbeterd qua overlevingstijd (=kwalitatief) en qua aantallen (=kwantitatief). Dit is het enige model waarbij we zowel kwantitatief als kwalitatief kunnen kijken naar de invloed van complement interventie. Als aanvulling hierop stelt het transplantatie model ons in staat een follow-up te modelleren. Waarbij we in staat zijn zowel naar de acute als chronische gevolgen van transplantatie te kijken. Momenteel is het transplantatiemodel alleen beschikbaar in ratten, echter vragen wij in deze aanvraag ook muizen aan, omdat wij het model willen opzetten in muizen. Vandaar dat wij dit model voor beide diersoorten aanvragen.

Uitkomstparameters:

De uitkomstparameters zijn de nierfunctie en de mate van nierschade. Wij hebben deze uitkomstparameters gekozen omdat deze parameters in de humane situatie ook als maatstaf voor nierfunctie worden gebruikt. Daarnaast zijn beide parameters valide te meten in dit model. De nierfunctie zal worden gemeten aan de hand van de hoeveelheid creatinine en ureum in het plasma en urine. De mate van nierschade wordt bepaald aan de hand van de mate van inflammatie, waarbij interleukine expressies worden bepaald.

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.

Opzet:

DONOREN

Bij de donoren zal afhankelijk van de vraagstelling al dan niet een eerder genoemd model in bijlagen 1, 2 en 3 worden toegepast. Oftewel een combinatie van dit model met het hersendoodmodel, de preservatietechnieken of het ischemie/reperfusie model is mogelijk. Er vindt dubbelzijdige nefrectomie plaats onder algehele anesthesie. De volgende anatomische structuren worden vrijgeprepareerd: ureters, aorta caudaal van arteria renalis en de niervaten. Allen worden gecanuleerd en geflusht. Na nefrectomie wordt het dier getermineerd. Bloed, urine en organen worden uitgenomen en opgeslagen. Een van beide nieren wordt, afhankelijk van de anatomie gerecentreerd. De andere nier zal na uitname fungeren als controle voor de nierfunctie in de donor.

ONTVANGERS

De dieren die het transplantaat ontvangen zullen onder algehele anesthesie een enkelvoudige nefrectomie van een natieve nier ondergaan. Vervolgens krijgen de dieren een transplantaatnier. Na transplantatie zullen bloed en urine samples worden genomen. Na een bepaalde tijdsduur zullen de dieren worden getermineerd. Bloed, urine en organen worden uitgenomen en opgeslagen.

Afhankelijk van de vraagstelling wordt gebruik gemaakt van wildtype en/of genetisch gemodificeerde dieren. Daarnaast zal afhankelijk van de vraagstelling een middel worden toegediend in de donor en/of ontvanger. Dit kan oraal, intraveneus, intramusculair, subcutaan of intra peritoneaal zijn.

Een pilot experiment zal vooraf worden uitgevoerd om de optimale omstandigheden van transplantatie te bepalen. Hierbij moet worden gedacht aan het optimaliseren van de warme ischemietijden.

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

Op basis van eerdere experimenten kunnen we voor de meeste primaire uitkomstmaten een te verwachten effectgrootte voorspellen. Door middel van powercalculaties wordt daarmee het aantal dieren beperkt. Daarnaast zullen interindividuele verschillen tussen de dieren zo klein mogelijk worden gehouden om variatie tussen de dieren te beperken en daarmee het benodigde aantal dieren zo klein mogelijk te houden.

B. De dieren

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

Diersoorten: Muizen en ratten. Voor de experimenten zullen zowel mannelijke als vrouwelijke dieren in gelijke mate worden gebruikt.

Herkomst: Aankoop van commerciële, erkende leveranciers of andere instellingen. Via samenwerkingsverbanden of eigen fok. Momenteel hebben we 5 genetisch gemodificeerde foklijnen in de CDP. De herkomst van de dieren zal afhangen van de onderzoeksvraag.

Levensstadia: Volwassen dieren.

Geschatte aantallen: Met het transplantatiemodel zullen zowel mechanistische als functionele vraagstellingen worden onderzocht. Op basis van poweranalyse zullen per groep 10 dieren worden aangevraagd. De inclusie van 8 dieren per groep is met een power van 80% en een standaarddeviatie van 10% voldoende [α 0.05].

Uitval:

Echter houden wij rekening met een maximale uitval van 20% per groep, wat neer komt op 2 extra dieren per groep. Deze uitval van maximaal 20% komt door bijvoorbeeld een afwijkende anatomie of technische

complicatie. Voorafgaand zal zoals eerder benoemd een pilot experiment plaatsvinden. Hierbij wordt minimaal 1 conditie getest en maximaal 3. Hierbij moet worden gedacht aan het optimaliseren van warme ischemetijden.

Opzet experiment:

PILOT EXPERIMENT:

Groep 1: Conditie A (n=4 donors, n=4 ontvangers)

Groep 2: Conditie B (n=4 donors, n=4 ontvangers)

Groep 3: Conditie C (n=4 donors, n=4 ontvangers)

Totaal per pilot experiment: **24** dieren

INTERVENTIE EXPERIMENT:

Groep 1: Tx → wel interventie (n=10 donors, n=10 ontvangers)

Groep 2: Tx → geen interventie (n=10 donors, n=10 ontvangers)

Groep 3: Controle groep → wel interventie (n=10 donors, n=10 ontvangers)

Groep 4: Controle groep → geen interventie (n=10 donors, n=10 ontvangers)

Totaal per interventie experiment: **80** dieren

| Dieren | [A]Donors pilot | [B] Ontvangers pilot | [C] Groups pilot | [D] Donors exp | [E] Ontvangers exp | [F] Groups exp | [G]Totaal /jaar [A+BxC]+[D+ExF} | Totaal/ 5 jaar [G]x5 |
|--------|-----------------|----------------------|------------------|----------------|--------------------|----------------|---------------------------------|----------------------|
| Muizen | 4 | 4 | 3 | 10 | 10 | 4 | 104 | 520 |
| Ratten | 4 | 4 | 3 | 10 | 10 | 4 | 104 | 520 |
| Totaal | | | | | | | 208 | 1040 |

Per jaar wordt gemiddeld 1 transplantatie experiment in ratten uitgevoerd. Echter willen we het transplantatiemodel ook lopend maken in muizen. Dus gaan wij uit van 2 transplantatiemodellen per jaar. Dit brengt het totaal op **208** dieren per jaar. Voor 5 jaar zijn dit **1040** dieren. Mocht het niet lukken het transplantatiemodel lopend te maken in muizen, zullen de dieren aangevraagd onder kopje muizen niet worden gebruikt.

Criteria Transplantatiemodel muizen

GO/NO GO 1: Het transplantatiemodel zal alleen worden opgezet in muizen wanneer meerdere onderzoeksvragen worden beantwoord. Kortom we moeten aan de hand van de experimenten iets kunnen zeggen over: graft survival, de rol van het complement systeem op deze graft survival en de daarbij behorende acute/chronische complicaties.

GO/NO GO 2: Het transplantatiemodel zal alleen worden opgezet wanneer er een goede basis is. Dit houdt in dat er genoeg kennis is vergaard met de andere drie beschreven modellen. Kortom: mechanistische en functionele vraagstellingen zullen eerst moeten zijn getest of onderzocht in de andere modellen, voordat ze worden toegepast op het transplantatiemodel. De resultaten in de moeten positief zijn.

GO/NO GO 3: De pilot studie moet goede resultaten laten zien. Dit betekent dat binnen het aantal beschikbare dieren het model geoptimaliseerd moet zijn. Als tijdens deze pilot studie blijkt dat de gestelde doelen met betrekking tot bijvoorbeeld ischemetijd of bijvoorbeeld overlevingsduur na transplantatie niet haalbaar is, zal er niet worden doorgegaan met het valideren van dit model.

GO/NO GO 4: Als tijdens het experiment blijkt dat bepaalde groepen in het transplantatiemodel te kwetsbaar zijn [geen goede resultaten, veel ongerief of zelfs sterfte] zal het experiment worden stopgezet.

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.

Vervanging: Momenteel is er nog geen in vitro model aanwezig waarin ons beschreven project kan worden verricht.

Vermindering: zo min mogelijk dieren worden gebruikt door middel van powercalculatie en het meenemen van ervaringen uit eerdere experimenten. Bij het uitvoeren zullen we tevens gebruik maken van de expertise van het microchirurgisch team van de CDP. Daarnaast zullen we in het pilot experiment maar een conditie per keer testen, waarbij wordt gestart met de in de literatuur meest optimale conditie.

Verfijning: Perioperatief zal pijnstilling worden gegeven. De dagen na de operatie zullen de dieren extra worden gemonitord op ongerief. Er zal gelet worden op discomfort en zo nodig gepaste maatregelen worden genomen.

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.

Perioperatief zal pijnstilling worden gegeven. Daarnaast kunnen creatininelevels in het urine worden bepaald om inzicht te krijgen in de nierfunctie en het risico op het ontwikkelen van nierfalen.

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.

Voor zover bekend uit literatuurstudies is het transplantatiemodel nog niet eerder in deze context toegepast.

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.

Na transplantatie zullen de dieren individueel worden gehuisvest.

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.

Adequate anesthesie en pijnbestrijding perioperatief.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Door wondpijn, het bijkomen uit de narcose en het ontwikkelen van een nierinfarct.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Oorzaken wondpijn: niet goed sluiten van de wond, approximeren van de wond, wondinfectie.

Oorzaken slecht bijkomen van narcose: langdurig onder anesthesie.

Oorzaken ontwikkelen infarct: slechte reperfusie na ischemie.

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

Wondpijn: perioperatieve pijnstilling.

Narcose: goede monitoring na narcose, waar nodig antidotum.

Nierinfarct: symptomen van nierfalen monitoren of andere gepaste maatregelen.

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.

- Nierfalen. Voor het bepalen van de nierfunctie zal creatinine worden gemeten. De creatininelevels zullen worden gebruikt als maat voor de nierfunctie en kunnen daarmee ook als drempelwaarde fungeren voor de ontwikkeling van nierfalen.
- Gewichtsverlies van meer dan 15%
- Inactiviteit van het dier
- Conditie van de vacht
- Ontstekingsverschijnselen

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

Dit hangt af van het gebruik van wildtype dieren of genetische gemodificeerde dieren. Op basis van eerder uitgevoerde experimenten met het transplantatie model wordt het percentage geschat op 20%, zoals aangegeven in B.

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.

Donoren:

Dubbelzijdige nefrectomie en terminatie onder anesthesie [terminaal]

Injecties onder anesthesie

[licht]

Ontvanger:

Niertransplantatie en enkelvoudige nefrectomie [ernstig]

Nefrectomie native nier [ernstig]

Injecties [licht]

Het totale ongerief bij de dieren is voor de donoren geschat op terminaal ongerief. Voor de dieren die het transplantaat ontvangen wordt het totale ongerief op ernstig geschat. Omdat de dieren zowel een dubbelzijdige nefrectomie als een niertransplantatie onder anesthesie zullen ondergaan.

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.

Uitname van organen is noodzakelijk voor het bereiken van de primaire eindpunten.

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

A. Deusinglaan 1

9713 AV GRONINGEN



**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
AVD1050020171245
Bijlagen
1

25 APR 2017

Datum 24 april 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 30 maart 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Het verbeteren van uitkomst na niertransplantatie door gerichte interventie in het complement systeem." met aanvraagnummer AVD1050020171245. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 20 en 24 april 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Dit betrof een nieuwe NTS vanwege terminologie en de weergave van het aantal dieren per diersoort; een nieuw Projectvoorstel waarin het belang van het onderzoek beter wordt weergegeven; het gebruik van één of beide geslachten; het aantal dieren voor de pilotstudie en het cumulatief ongerief voor de donordieren.

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 "Het verbeteren van uitkomst na niertransplantatie door gerichte interventie in het complement systeem." starten. De vergunning wordt afgegeven van 24 april 2017 tot en met 1 april 2022.

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.

Er is sprake van ernstig ongerief.

Datum:

24 april 2017

Aanvraagnummer:

AVD1050020171245

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-RUG gevoegd. Dit advies is opgesteld op 30 maart 2017. 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



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: Rijksuniversiteit Groningen

Adres: A. Deusinglaan 1

Postcode en plaats: 9713 AV GRONINGEN

Deelnemersnummer: 10500

deze projectvergunning voor het tijdvak 24 april 2017 tot en met 1 april 2022, voor het project "Het verbeteren van uitkomst na niertransplantatie door gerichte interventie in het complement systeem." met aanvraagnummer AVD1050020171245, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-RUG. 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 30 maart 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 20 april 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 24 april 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 30 maart 2017, ontvangen op 30 maart 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 20 en 24 april 2017

Aanvraagnummer:
AVD1050020171245

| Naam proef | Diersoort/ Stam | Aantal dieren | Ernst | Opmerkingen |
|--|---------------------------------------|---------------|------------------------------------|-------------|
| 3.4.4.1 Hersendoodinductiemodel | | | | |
| | Muizen (<i>Mus musculus</i>) / | 280 | Licht | |
| | Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) / | 480 | Licht | |
| 3.4.4.2 Preservatietechnieken | | | | |
| | Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) / | 580 | Terminaal | |
| 3.4.4.3 Ischemie/Reperfusie model | | | | |
| | Muizen (<i>Mus musculus</i>) / | 260 | Matig | |
| | Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) / | 260 | Matig | |
| 3.4.4.4 Niertransplantatie model | | | | |
| | Muizen (<i>Mus musculus</i>) / | 520 | 50% Terminaal 50% Ernstig | |
| | Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) / | 520 | 50% Terminaal 50% Ernstig | |

Aanvraagnummer:
AVD1050020171245

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 juli 2022 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:

AVD1050020171245

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 onvereenigbaar 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:
AVD1050020171245

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.

| Inventaris Wob-verzoek W17-09 | | | | | | | | | |
|-------------------------------|--|-----------------|------|--------|-------|-------------------|--------|--------|------|
| | | wordt verstrekt | | | | weigeringsgronden | | | |
| nr. | document | reeds openbaar | niet | geheel | deels | 10.1.c | 10.2.e | 10.2.g | 11.1 |
| | NTS20171264 | | | | | | | | |
| 1 | Aanvraagformulier | | | | x | | x | x | |
| 2 | Projectvoorstel oud | | | | x | | x | x | |
| 3 | Niet-technische samenvatting oud | | | x | | | | | |
| 4 | Bijlage beschrijving dierproeven 1 oud | | | | x | | x | x | |
| 5 | Bijlage beschrijving dierproeven 2 oud | | | | x | | x | x | |
| 6 | Bijlage beschrijving dierproeven 3 oud | | | | x | | x | x | |
| 7 | DEC-advies | | | | x | | | x | |
| 8 | Ontvangstbevestiging | | | | x | | x | x | |
| 9 | Verzoek aanvulling aanvraag | | | | x | | x | x | |
| 10 | Reactie aanvulling aanvraag | | | x | | | | | |
| 11 | Projectvoorstel nieuw | | | | x | | x | x | |
| 12 | Bijlage beschrijving dierproeven 1 nieuw | | | | x | | x | x | |
| 13 | Bijlage beschrijving dierproeven 2 nieuw | | | | x | | x | x | |
| 14 | Bijlage beschrijving dierproeven 3 nieuw | | | | x | | x | x | |
| 15 | Niet-technische samenvatting nieuw | x | | | | | | | |
| 16 | Advies CCD | | x | | | | | | x |
| 17 | Beschikking en vergunning | | | | x | | x | x | |



03 APR 2017

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 24400 <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 | Genmab |
| | | Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde | [Redacted] |
| | | KvK-nummer | 30169902 |
| 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 | Yalelaan 60 |
| | | Postbus | |
| | | Postcode en plaats | 3584 CM Utrecht |
| | | IBAN | [Redacted] |
| | | Tenaamstelling van het rekeningnummer | [Redacted] |
| 1.4 | Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker. | (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. | (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 - 5 - 2017 |
| Einddatum | 1 - 5 - 2022 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Research and Evaluation of therapeutic test antibodies in tumor models in mice and rats
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Onderzoek en Evaluatie van therapeutische test antilichamen in kanker modellen in muizen en ratten
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|--|
| Naam DEC | Utrecht |
| Postadres | Bureau van de DEC Utrecht Huispostnummer [REDACTED] Postbus 85500 3508 GA Utrecht |
| E-mailadres | dec-utrecht@umcutrecht.nl |

4 Betaalgegevens

4.1 Om welk type aanvraag gaat het?

Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1.541,- Lege

Wijziging € Lege

4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.

Via een eenmalige incasso

Na ontvangst van de factuur

Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.

5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

Projectvoorstel

Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen, indien van toepassing

Melding Machtiging

6 Ondertekening

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

Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondergetekende verklaart:

- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
- dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
- dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
- dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
- dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam

[Redacted]

Functie

[Redacted]

Plaats

Utrecht

Datum

30 - 3 - 2017

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.

[At our company we concentrate on the generation of new recombinant antibodies, and new innovative antibody formats for the treatment of cancer. We continuously invent and generate potential new antibodies and test these pre-clinically as well as evaluate those antibodies in clinical studies.](#)

Cancer is one of the leading causes of death in Western countries including the Netherlands. Many therapies are applied to combat this disease, such as radiation therapy, chemotherapy and immunotherapy. However, the complexity and heterogeneity of cancer contribute to the fact that not all patients respond to the therapy, or that the cancer returns after a number of years.

The last decade, immunotherapy is an expanding field in the treatment of cancer patients. It is a type of cancer treatment designed to boost the body's natural defenses to fight the cancer. It uses substances either made by the body or in a laboratory to improve or restore immune system function. For example recombinant antibodies for therapeutical use in patients with cancer and/or chronic inflammatory diseases have been proven to be very successful (Scott AM, Nature reviews, 2012).

Recently, the concept of immunotherapy is even appointed as the breakthrough in the treatment of cancer (E Goldin, Nature medicine 2013; J cousin Frankel, Science 2013), indicating the rapid movement of this field.

However, because of the heterogeneous characteristics of cancer, still a large number of cancer patients have to face the recurrence of cancer and thus improvement is still required. Though, according to the AACR Cancer progress Report 2016, several new medical products for the treatment of cancer have been approved by the FDA in the last years, it is expected that in the United States in 2016 nearly 600.000 patients will die from some form of cancer (Cancer Statistics 2016, Siegel RL et al, Ca Cancer J Clin, 2016). Therefore, development of new and modified improved antibody formats is a continuous urgent need to further enhance the efficacy and/or safety of these antibody drugs in patients.

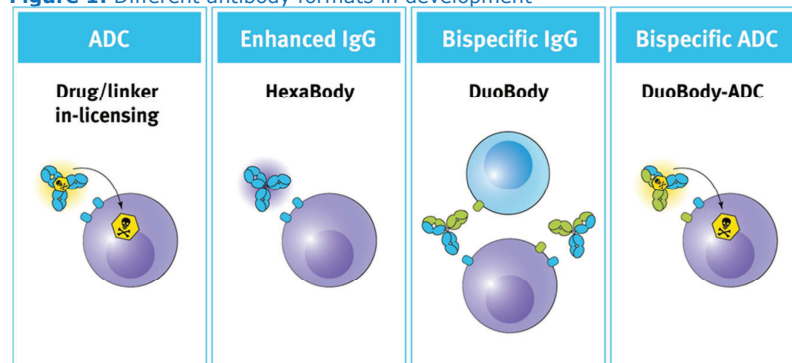
At our company we yearly evaluate, in a multidisciplinary team of scientific experts, a large number of novel potential cancer targets that are of interest for antibody targeting therapy. This is done by means of literature search, competitor landscape analysis, collaborations and in vitro studies. Of these targets only a few targets will be selected to start the generation of antibodies for. We have the objective to go forward with only the most promising cancer targets where we see the potential to create new innovative antibody formats for.

The final goal is to generate differentiated antibody therapeutics that are more potent and/or safer than antibodies/drugs currently in the clinic, and have potential to be best-in-class or first-in-class. These criteria will be taken along during the whole antibody selection procedure.

The number of new antibody targets taken into antibody development will differ per year, but will in general be 10-30 per year. This will be done with or without external collaborations.

The antibody formats to be applied to the cancer targets that are designed thus far, and currently in the development by our company are: 'Antibody Drug Conjugates' (ADCs), where a drug/toxin is coupled with a linker to the antibody; Enhanced IgG formats, where enhanced immune effector functions are established; bispecific IgG antibodies, where a dual targeting can be established; and 'bispecific-ADCs', bispecific antibodies with a drug linker (figure 1).

Figure 1: Different antibody formats in development



The following pre-clinical process includes intensive in vitro testing, such as binding characteristics and functional characteristics of the antibody that leads to the kill of the tumor cells or inhibition of tumor cell growth. Besides these initial in vitro processes needed for the first step of antibody characterization, in

vivo efficacy testing in tumor models and pharmacokinetic analysis in mice and rats are inevitable, since only animal studies reflect the complexity as seen in humans/patients.

Recent studies have revealed that new antibody formats can indeed be more potent for the treatment of some cancers compared to (antibody-) drugs already in the clinic. For example, antibody-drug conjugates (ADC), can be more effective in the inhibition of the tumor growth compared to the non-conjugated antibody, as has been demonstrated with Herceptin-DM1 which has been shown to be very effective in breast cancer patients [REDACTED]. Also our own preclinical findings show complete regression of several implanted human tumors, without significant side effects when using ADCs. [REDACTED]. Furthermore, there are strong indications that the use of other new antibody formats developed at our company, such as bispecific antibodies (DuoBody) or HexaBody, can strengthen the potency and specificity of antibodies for the treatment of cancer ([REDACTED]).

The research described in this project application focusses on the selection, research and evaluation of antibodies in tumor models in mice and rats and will be a direct continuation of our current research program ("Development of antibodies for therapeutic use: Research and evaluation on subcutaneous tumor models, optical imaging and imaging of subcutaneous tumor models in rodents). By performing these in vivo experiments we aim to get insight in

- the antibody drug efficacy in a "full body system"
- the mechanism of action of the antibody drug in vivo
- optimal dosing of the antibody drug
- Timing and location of activity of the antibody drug
- The tumor type/indication most suitable for the application of the antibody drugs

To explore this, we require a diversity of specific in vivo tumor models to allow the analysis and evaluation of the different antibody-drugs. The specific models will be set up and designed, based on the antibody format, the molecule and the cancer type that is targeted by the respective antibodies.

Parallel to the studies described in this project application, we are studying related processes which are part of a successful antibody generation, like immunizations in rodents and pharmacokinetic studies. [These related processes are described in two different parallel project applications: "Investigation of pharmacokinetics of antibody formats in rodents" and "Immunization of rodents \(transgene for human IgG\)".](#)

In short: selection, research and evaluation of the efficacy of new antibodies or antibody formats in a diversity of specific in vivo tumor models is very important for the development of therapeutic antibodies and will give us insight into the mechanisms of actions of these drugs. This will help us to translate and predict the potency of these antibody drugs in cancer patients much better and will help us in the design of clinical trials leading to an improved benefit for cancer patients in the future.

3.2 Purpose

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

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

The main objective of the study described in this application is selection, analysis and evaluation of therapeutic antibodies by evaluating anti-tumor efficacy in a diversity of in vivo tumor models in mice and rats.

The need for such studies is elementary for moving the best antibody candidate forward and bringing a new medicine successfully to the clinic as we have done for several antibodies (such as an anti-CD20 antibody ([Arzerra®](#)), for the treatment of chronic leucocyte leukemia, and for an anti-CD38 ([Darzalex®](#)), for the treatment of multiple myeloma).

3.3 Relevance

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

Evaluation and research of new antibodies drug candidates or new antibody formats in mice or rat tumor models will give insight in the mode of action of the drugs.

Furthermore, by analyzing the different animal tumor models described in this application, we will gain understanding in the use of these different tumor models in antibody therapy and the translatability into cancer patients. Each tumor model type will have its own characteristics, advantages and disadvantages and by studying this (for examples by taking out the tumor and explore the target expression or the immunological cell content) we will gain insight into these models, which will help to refine the design of future tumor models and clinical trials for cancer patients.

Scientific relevant findings will be communicated to collaborators and/or published at specific conferences and/or in scientific magazines.

3.4 Research strategy

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

Before in vivo studies will start, an intensive selection process is performed on a large antibody panel by means of in vitro assays determining the specific target binding and functional activity. Only a small number of the best antibodies will move forward and will be selected for further in vivo research, such as anti-tumor efficacy studies.

[REDACTED]

Depending on the molecule and the cancer type that the antibody targets and the mechanism of action of the antibody format (ADC, DuoBody, HexaBody, or others) a diversity of specific in vivo tumor models will be designed, set up and evaluated as is described in 3.4.2 and in both appendices animal procedures.

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.

All models described in this project application are animal tumor models.

Based on the general outline of the experimental design of each individual animal experiment, the tumor model described in this application is divided in 2 different animal procedures.

The majority of tumor model experiments [REDACTED] will be performed as the animal procedure: "subcutaneous tumor models". The remainders of the experiments that will be performed fall under the second animal procedure: "orthotopic tumor and metastasis models".

A short description of the two animal procedures is described below. A detailed description can be found in the two independent appendices of the animal procedures:

- 1) Animal procedure 1: Subcutaneous tumor models:
Subcutaneous injection of tumor cells/fragments in mice or rats followed by tumor volume measurements by Caliper and optional with imaging techniques*

2) Animal procedure 2: Orthotopic tumor (injection of tumor cells at the organ of the cell's origin) and metastasis models:

Different ways of tumor cell injection will be applied in this procedure:

- a) Orthotopic tumor cell inoculation without surgery:
Injection of tumor cells in easy accessible organs such as in the mammary gland (subcutaneously into the fat pads), or dermis (intradermally)
- b) Orthotopic tumor cell inoculation with surgery:
Direct injection of tumor cells in respective organs after opening of the animal's body, (such as pancreas, ovarium, prostate, etc.), or indirect injection (in some incidences) into organs (such as intra-splenic or portal vein injection (imaging* and/or scoring of tumor loci and/or resection and weighing of tumor in the liver).
- c) Intravenous tumor cell inoculation: Injection of tumor cells into the tail vein. This injection method does not need surgery or anesthesia.
- d) Intracardiac tumor cell inoculation: Injection of tumor cells into the left ventricle of the heart.
- e) Intraperitoneal tumor cell inoculation: Injection of tumor cells into the peritoneal cavity.
In this procedure, tumor development will be mainly followed by imaging* and/or alternatively by caliper measurement and/or scoring of tumor loci and/or resection and weighing of tumor.

*Imaging techniques can include: bioluminescence or fluorescence, radioactivity, CT/PET/SPECT in combination with labeled cells or antibodies or tracers/proteins.

In all these animal procedures three different types of models can be selected based on the antibody target and antibody format:

- Xenograft models: in which mostly human tumor cells/fragments will be implanted in mice or rats.
- Syngeneic models: in which the tumor to be injected as cells or fragments, as well as the host are from the same species/strain (mouse or rat)
- Humanized models: In which the immune system of the mouse or rat is "humanized", such as:
 - Engraftment models with human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)
 - CD34+ Hematopoietic Stem cell (HSC) reconstituted humanized
 - Genetically engineered mouse (and rat) models (GEMMS)

Based on the research strategy, antibody target and antibody format, the most optimal model will be selected.

3) Animal procedure 3: Practicing of techniques for Orthotopic tumor and metastasis models:

In case of new models have to be established for the orthotopic tumor and metastasis models that include surgery or intracardiac injection, we expect the need for practicing to optimize the success rate of the model establishment and antibody efficacy testing in these tumor models.

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.

We make selections of the animal procedures and models described in paragraph 3.4.2 [mainly dependent on the antibody target and on the cancer type where the tumor antigen is expressed \(see in figure 2\)](#).

Fig 2a:



Fig 2b:





The outcome of the animal tumor model studies will give us insight and knowledge on the activity and mechanism of action of the drug and will be an important step in the decision making process. Based on this, decisions will be made to either progress the antibody drug candidates forward in the development process, or to be put on hold.

Furthermore, these animal tumor model experiments are very important in the clinical trial design with respect to indication/cancer type selection, dosing and the possibility of biomarkers analysis.

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 | Subcutaneous tumor models |
| 2 | Orthotopic tumor and metastasis models |
| 3 | Practising of techniques for orthotopic tumor and metastasis models |
| 4 | |
| 5 | |
| 6 | |
| 7 | |
| 8 | |
| 9 | |
| 10 | |



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.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

| | |
|------------------------------|--|
| 1.1 Titel van het project | Onderzoek en Evaluatie van therapeutische test antilichamen in kanker modellen in muizen en ratten |
| 1.2 Looptijd van het project | 5 jaar |
| 1.3 Trefwoorden (maximaal 5) | Antilichamen, kanker, tumor modellen |

2 Categorie van het project

| | |
|--|---|
| 2.1 In welke categorie valt het project. | <input type="checkbox"/> Fundamenteel onderzoek |
| | <input checked="" type="checkbox"/> Translationeel of toegepast onderzoek |
| | <input type="checkbox"/> Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie |
| <i>U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.</i> | <input type="checkbox"/> Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid |
| | <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 Projectbeschrijving

| | |
|---|---|
| 3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang) | <p>Kanker is een van de belangrijkste doodsoorzaken in westerse landen waaronder ook in Nederland. Vele therapieën worden toegepast om deze ziekte te behandelen. Echter, de complexiteit en de heterogeniteit van kanker dragen er toe bij dat niet alle patiënten reageren op de huidige therapie, of dat de kanker na een aantal jaren weer terugkeert.</p> <p>Recombinante antilichamen die gebruikt worden als therapie bij patiënten met kanker (en/of chronische ontstekingsziekten) hebben de laatste jaren bewezen zeer succesvol te zijn. De ontwikkeling van nieuwe en geoptimaliseerde antilichamen blijft echter nodig om de werkzaamheid te verbeteren en veiligheid van deze medicijnen bij patiënten te verhogen.</p> |
|---|---|

| | |
|-----|--|
| | <p>Dit project betreft de ontwikkeling van nieuwe verbeterde antilichamen voor gebruik in de behandeling van kanker. In een uitgebreid preklinisch proces worden de beste antilichamen geselecteerd alvorens deze in diermodellen worden getoetst. Het antilichaam met uiteindelijk de beste karakteristieken zal in patiënten getest gaan worden.</p> <p>Het specifieke doel van de experimenten beschreven in dit project is de selectie, analyse en evaluatie van nieuwe verbeterde antilichamen in proefdier modellen voor kanker. Hiertoe worden muizen of ratten ingespoten met kankercellen of kleine stukjes kanker weefsel, waarna groei van deze kankercellen in de muizen of ratten kan plaatsvinden. Door middel van behandeling van de muizen en ratten met de nieuwe verbeterde antilichamen zal geanalyseerd worden of de tumor geheel geëlimineerd kan worden, de tumorgroei geremd kan worden en hoe dit proces bewerkstelligd wordt.</p> |
| 3.2 | <p>Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?</p> <p>Kennis over het werkingsmechanisme van de therapeutische effectiviteit van de nieuwe verbeterde antilichamen is belangrijk voor de voorspelbaarheid van de effectiviteit van deze antilichamen in kanker patiënten. Eveneens zal dit onderzoek inzicht geven in de complexiteit en de heterogeniteit van kanker. Wetenschappelijk interessante bevindingen zullen dan ook in publicaties vastgelegd worden</p> |
| 3.3 | <p>Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?</p> <p>In totaal verwachten we dat er 20525 dieren gebruikt gaan worden. Daarvan zijn er 18050 muizen en 2475 ratten.</p> |
| 3.4 | <p>Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?</p> <p>Omdat er tumor cellen of fragmenten van tumoren bij de muizen en ratten worden ingebracht, kan er ten gevolge van de hieraan gerelateerde tumorgroei, ongerief plaatsvinden. Daarnaast kan er in proeven waar menselijke immuun cellen aan de muizen worden toegediend ongerief plaatsvinden doordat deze menselijke immuun cellen een reactie kunnen aangaan met de muizen cellen. Dit zal alleen in een klein deel van de dieren kunnen plaatsvinden.</p> |
| 3.5 | <p>Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?</p> <p>De procedures hebben over het algemeen een matig ongerief. In gevallen waarbij er geen tumor ontwikkeling plaatsvindt, verwachten we licht ongerief en in sommige gevallen, waar de muizen of ratten het humane eindpunt bereiken, is het ongerief hoger. We verwachten dat in het grootste deel van de experimenten, in 22% van de dieren licht ongerief zal plaatsvinden, in 75% van de dieren matig ongerief en in 3% van de dieren een ernstig ongerief. In de modellen waar herhaaldelijke imaging onder anesthesie of een operatie plaats vindt is het verwachte ongerief: 10% licht, 87 % matig en 3% ernstig. Een zeer klein deel van de dieren specifiek gebruikt worden voor het oefenen van nieuwe technieken hierbij verwachten we een ongerief van 10% licht, 84 matig en 6% ernstig.</p> |
| 3.6 | <p>Wat is de bestemming van de dieren na afloop?</p> <p>De dieren worden geëuthanaseerd ter beëindiging van de proef. Een klein deel van de muizen of ratten kan in leven gehouden worden voor het oefenen van technieken. Na het oefenen worden deze dieren eveneens geëuthanaseerd.</p> |

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.

Voor de aanvang van de dierproeven worden per project uitgebreide studies gedaan om de bindings-eigenschappen en werkingsmechanismen van de nieuwe verbeterde antilichamen tegen kanker te analyseren. Met laboratorium technieken kan dit goed onderzocht worden en dat maakt een eerste selectie uit een groot antilichaam panel mogelijk. Echter bevindingen met laboratorium technieken alleen, zullen niet een exclusief en volledig inzicht geven in de anti-kanker werkzaamheid van het antilichaam. Daarom zal een klein deel van de geselecteerde antilichamen in dierproeven getest gaan worden.

Tumor modellen in dieren reflecteren een complex systeem dat meer vergelijkbaar is met de kanker van de patiënt, met invloeden van factoren zoals bloedtoevoer, het immuunsysteem en de tumor micro-omgeving. Deze afzonderlijke factoren kunnen met behulp van laboratorium technieken onderzocht worden, echter het is tot op heden niet mogelijk om de combinatie van deze factoren te bestuderen. Het testen van de werkzaamheid van antilichamen in een muis of rat tumor model resulteert dan ook in een breder en vollediger overzicht van de werkzaamheid van de geneesmiddelen en draagt bij aan een betere vertaling naar het gebruik van nieuwe en verbeterde antilichamen bij kankerpatiënten.

4.2 **Vermindering**

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

Alle individuele tumor modellen worden zorgvuldig ontworpen, waarbij rekening gehouden wordt met de wetenschappelijke vraagstelling van de dierproef, de voorspelde werkzaamheid van het antilichaam en de variatie van de tumorgroei; homogeen (weinig variatie in tumorgroei) of heterogeen (veel variatie in tumorgroei). Gebaseerd hierop is een berekening uitgevoerd en een richtlijn gemaakt om de meest optimale groepsgrootte te bepalen voor homogene modellen en/of heterogene tumor modellen.

Daarnaast is de verblijftijd van het nieuwe verbeterde antilichaam in de bloedcirculatie van belang voor de daadwerkelijke werkzaamheid van het antilichaam ter plaatse van de tumor. Dit wordt in een parallelle projectaanvraag bestudeerd en gebruikt veel minder muizen dan de tumor model experimenten. Met deze gegevens kunnen we goed de verblijftijd van het antilichaam in bloeds- omloop bepalen. Gezamenlijk met gegevens verkregen uit laboratorium onderzoek kunnen wij beter de effectieve dosis in de tumor modellen voorspellen. Dat leidt uiteindelijk tot een gebruik van minder muizen.

4.3 **Verfijning**

Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diermodel(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.

Er is veel ervaring met verschillende soorten tumor modellen in muizen en ratten en er is al veel gepubliceerd welke specifieke muis of rat stammen hierbij gebruikt kunnen of moeten worden. Door deze informatie te gebruiken kunnen we de tumor model experimenten zo optimaal mogelijk inrichten.

In een groot deel van de proeven zal gekozen worden voor muisstammen die geen intact immuunsysteem hebben, waardoor een directe afstoting van de ingebrachte menselijke tumor cellen voorkomen wordt. Muizen met een intact immuun systeem worden gebruikt als de bijdrage van het immuun systeem van belang is voor de effectiviteit van het nieuwe verbeterde antilichaam.

Het gebruik van ratten zal voornamelijk toegepast worden indien er herhaalde bloedafname zal plaatsvinden. Dit kan bijvoorbeeld nodig zijn bij het volgen van stoffen in het bloed die gerelateerd zijn aan de tumor ontwikkeling of de effectiviteit van het antilichaam. De betreffende stoffen zullen door middel van laboratorium technieken geanalyseerd worden.

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

Om de tumorgroei gerelateerde gevolgen zo klein mogelijk te houden vindt er gedurende de hele proef intensieve observatie plaats, die op momenten van verwacht of verhoogt ongerief geïntensiveerd zullen worden.

Het tumorvolume wordt minimaal 2 maal per week gemeten. De dieren worden gedood zodra een tumor het maximum toegestane tumorvolume dreigt te bereiken. Zo verminderen we het ongerief van de dieren door een groot tumorvolume. Voor het detecteren van uitzaaiingen of de aanwezigheid van tumoren in inwendige organen gebruiken we beeldvormende technieken. Hierdoor kunnen we ook in deze experimenten anticiperen op het ontstane ongerief door middel van tumorgroei.

Met betrekking tot het ontstaan van open wonden op de plaats van de tumoren hebben wij een instructiehandleiding gemaakt hoe te handelen wanneer een open wond wordt waargenomen. Dit helpt bij het schatten van het ongerief, waarbij er beter en sneller beslissingen genomen kunnen worden zodat het ongerief zo kort mogelijk, en de wetenschappelijke waarde van de proef zo hoog mogelijk gehouden kan worden.

Tot slot zorgen we ervoor dat het betrokken personeel bekwaam blijft door middel van het volgen van trainingen, door deel te nemen aan cursussen of door het leren van nieuwe technieken.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen



Appendix Description animal procedures

1. This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
2. A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
3. For more information, see our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
4. 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'. 24400
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. [REDACTED]
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|------------------------------|
| 1 | 1. Subcutaneous tumor models |

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 here described animal procedure includes the **subcutaneous implantation** of human or murine tumor cells mainly, or in some cases patient derived tumor material from approved sources (like CRO's) in:

1. Xenograft models (human tumor cells/fragments in mice or rats),
2. Syngeneic models (murine tumor cells/fragments in mice or rats), or
3. Humanized models (human tumor cells/fragments in mice or rats), mice harboring part of the human immune system (HIS). Examples of HIS mouse are:
 - Subcutaneous co-engraftment with human immune cells (f.e. human PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells))
 - intraperitoneal or intravenous engraftment with human immune cells (f.e. PBMCs)
 - CD34⁺ Hematopoietic stem cell (HSC) reconstitution in young immunocompromised mice. Mice will then be purchased as fully humanized animals.
 - Human Transgenic models (mice will be purchased from appropriate sources)

[REDACTED]

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

To get an indication for the proper group sizes per study a power/sample size analysis has been done based on the tumor volumes, since the research described in this application indicates "tumor volume" as the primary parameter for tumor burden, a continuous variable readout, calculated on the basis of measurements with (digital) calipers in two dimensions.

Power and groups size analysis:

[Redacted text block]

[Redacted text block]

Group size selection:

Based on the power analysis described above we want to select the following group sizes:

- 1) [Redacted list item]

[REDACTED]

In the group size selection, the scientific outcome and the total number of animal is always taken into consideration.

In all models where antibody treatment is applied and tumor volume will be the primary readout, the relative T/C (tumor volumes of treated animals over control animals values) and "tumor growth inhibition" (TGI) values will be calculated.

Statistical analysis

In general and if possible, a standard statistical analysis will be as much as possible applied as follows:

[REDACTED]

This analysis can be adapted in the future when new insights appear.

In case of only establishing a new subcutaneous tumor model statistical analysis is not applied, since treatment is absent in these studies.

B. The animals

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

We expect to have an average [REDACTED] antibody projects active per year, for which we perform in total an

average [redacted] experiments per year. This includes establishment and efficacy testing studies in both animals procedures described in animal procedure I: subcutaneous tumor models as well as the animals experiments described in animal procedure II: orthotopic tumor and metastasis models. (see also [Addenda overview table 1 animals](#))

Within this animal procedure I (s.c.tumor models) we expect to perform [redacted] experiments per year [redacted] models for efficacy testing [redacted] new models to be established).

In average we expect to [redacted] animals per efficacy testing experiments for the s.c. tumor models, and [redacted] animals per new model to be established [redacted] animals per year. Establishment of new subcutaneous tumor models in general requires less animal per experiment (~ [redacted]/experiment) we expect the development of [redacted] models per year. Which is [redacted] animals per year.

This will lead to the final use within this animal procedure I to a total of [redacted] [redacted] Of this it is anticipated to need [redacted] in the coming 5 years.

There is extensive experience in tumor models in mice and rats which allows translation of the potency of a novel drug to human patients.

For the animal studies described in this application we intend to use different mouse or rat strains

In most of our studies we aim to test antibodies specifically targeting (human) tumor antigens, where human tumor cell lines (or fragments) need to be used for implantation. In order to prevent rejection of the tumor cells, it is necessary to use immune deficient mice and rats. We most frequently use CB17 SCID or nude mice. Both, nude and CB17 SCID mice, lack the T-cells subset allowing a better tumor outgrowth. CB17 SCID mice, in addition, have no B-cells meaning they also have no mouse IgG. For the rats we mostly use athymic nude rats.

Immune competent mice (mostly BALB/c or C57bl/6) will be used for syngeneic tumor models, where it is important to study the tumor microenvironment. At this moment it is well known that the tumor microenvironment is important for the development of the tumor, and by targeting this environment (for example with a specific antibody) it can lead to tumor growth inhibition. In these cases it is important that the antibody used also recognizes the murine targets. Depending on the origin of the murine tumor cell line the right strain for the respective model needs to be chosen.

NOD SCID mice lack T-cells in addition to B-cells, and also functional macrophages, complement components, as well as functional Natural Killer cells. Therefore, these mice are often used to study bispecific antibodies in which one part is directed against the human target on the tumor cell and the other part is focused on the human immune cell. In these mice, human immune cells will be co-transplanted subcutaneously together with human tumor cells. That allows the efficacy testing of a bispecific antibody targeting the human immune cells and the human tumor cells in an in vivo setting as described in (Labrijn et al, PNAS, 2013). For these studies even mice with additional immune deficiencies such as NSG/NOG or BRGS mice can be used as well.

The use of NSG or NOG (NOD-SCID IL-2Rg^{-/-}), but also BRGS mice and NOD SCID mice are described for experiments in which human blood cells are intraperitoneally or intravenously implanted. All these mice are immune deficient, lack B-, T- and NK-cells, and have defects in macrophages. When PBMCs are inoculated in these mice, the human T-cells are the most expanding human cell population and can be used for T-cell targeting drugs, which is nicely shown by Bacac M *et.al.* (Clin Can Res, 2016) The NSG (and the BRGS mice) or derivatives hereof are used for the already mentioned CD34+cell HSC-His model allowing the expansion of a diversity of human immune cells in these mice (Legrand, PNAS, 2011). These Human Immune System (HIS)-mice will be used in experiments where the tumor microenvironment needs to be studied or when a mechanism of action of the drug includes activation or inhibition of the human immune cells or the tumor microenvironment (Morton et al, Cancer Res 2016).

Rat xenograft models using athymic nude rats are mostly used for experiments (e.g. in biomarker

studies) when repetitive blood samples are required in amounts impossible to get from single mice. Athymic nude rats do not have T cells and allows the outgrowth of implanted human tumor cells, although in many cases a pre-treatment with cyclophosphamide or irradiation might be needed for a proper tumor outgrowth with an acceptable variation. In addition, for the evaluation of novel antibody formats rat models might be of interest because the complement system in rats allows a better ex vivo analysis since the complement components seem much more stable.

We have a strong preference for the use of female mice, because it has been shown that male mice have a different activity in the innate complement system than female mice (Beurskens F et al, Clin Exp Biol, 1999) and this may influence the effectiveness of the antibodies. To minimize the variation within a single test and between different tests (intra- and inter-variation) we prefer to be limited to one gender. This allows a more accurate statistical analysis and can lead to the use of fewer mice per group. In addition, we prefer females because these are easier to accommodate (less mutual aggression) than males and are easier to regroup. We want to avoid to house animals alone in one cage because of aggressiveness, which is often the case with males.

However, we do include in some experiments a mixture of males and females, for example the HIS mice are both male and female since these animals are seen as individuals and will be analyzed on a more individual basis. Furthermore, sometimes we have experiments with males only, for example when we want to study the efficacy of our antibodies in prostate cancer.

In general we use mice at an age between 5 and 14 weeks old. Young mice normally have a much better tumor take rate. Per experiment we try to keep the mice in an age difference of maximal 2 weeks, since a higher difference might lead to difference in tumor outgrowth. However, sometimes we are restricted to a certain age of the mice because of technical feasibilities. For example humanized NSG or BRGS mice are somewhat older before tumor cell injection, since first the human immune system has to be established, which can take up to 12-14 weeks.

For each animal experiment it will be carefully considered which background, strain, gender and age is required for having an optimal or most translatable readout for the research question to be addressed in that particular experiment and the efficacy of an antibody drug.

In the future other or new mice and rat strains might be developed that allow better engraftment of tumor cells and/or humane immune cells, and might be used in the animal studies as well.

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.

In general the mice/rats will not be re-used. However in some experiments we may consider using animals for training purposes, such as for practicing new techniques, for re-challenge experiments, or for resistance studies in which a second round of tumor cell injection and/or treatment will be performed. We want to restrict the re-use only to mice/ rats in which the discomfort in the previous study was mild or moderate and when the animal's general state of health and well-being has been fully restored after the previous study.

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,

In vitro studies to analyze the binding properties of the antibodies to the tumor target and to test their functional anti-tumor activity will always be performed before the start of any in vivo experiment. This allows a first scaling down step of the antibody panel. However in vitro data only will not give an exclusive and complete insight into the anti-tumor efficacy of the antibody of interest. Testing the efficacy of antibodies in in vivo tumor models represents a more complex system which is more comparable to the tumor of the patient and allows the influence of additional factors, such as blood supply, the tumor microenvironment and the contribution of the immune system to the efficacy of the antibody drug. This results in a better and more complete overview on the efficacy of the drugs and allows a better translation to the use in cancer patients.

Reduction,

All the individual tumor models are carefully designed. The variation of the tumor growth (homogeneous or heterogeneous), the predicted efficacy of the drug, and the research question is always taken into account. At each experiment a well thought experimental design is made in which a good scientific outcome is balanced to the total number of mice used in the experiment. This is supported by a power analysis and suggested group sizes described in 2A.

Furthermore bio-distribution of the antibody of interest to the site of the tumor is also very important for the final efficacy of the drug and can only be determined in in vivo settings. To support this feature the pharmacokinetics of the antibody drugs is studied using a parallel project application which in general uses less mice than a tumor model experiment. Using these data we can detect very well the half-life of the specific antibody in circulation. And together with in vitro data we can better predict the effective dose in the tumor models described in this application. Overall following this strategy, this will lead to the use of fewer mice.

Furthermore, we are intensively involved in setting up alternative model systems such as [REDACTED]. In the coming years new techniques will be developed and evaluated if these techniques can successfully replace, refine or reduce the use of animal experiments. However, to explore this, in the first coming years we expect the need of several animal tumor models to evaluate the applicability of the alternative model systems

Refinement

We put a lot of effort in the refinement of the animal tumor models. By having dedicated people we observe, learn and adjust in consecutive studies, so that we know what to expect and in cases of (unexpected) discomfort we can determine how to act to prevent the animals from reaching the "Human End Point" (HEP).

For the maximal tumor size in mice the code of practise "animal experiments in cancer research" (Inspectie W&V, Zutphen/The Hague 1999) describes a tumor volume of 2000 mm³. In our studies we intend to euthanize the mice when a tumor volume above 1500 mm³ is reached. In this way we reduce the discomfort of the mice due to a large tumor size. Also in case of tumor growth in rats, we will euthanize as much as possible the rats before the suggested HEP of 40 cm³ or a diameter of 4.2 cm in the code of practise.

With respect to the appearance of ulcerations at the site of the tumors our team has made an instruction guide how to act and how to handle in case an open wound is observed. This has been discussed extensively within our Animal Welfare Body and is communicated and instructed to the responsible animal caretakers as well. See Addendum III " tumorgroei gerelateerde verschijnselen")

Finally, we make sure that our dedicated personnel remains skilled and will, therefore, be trained regularly, by participating in courses or to learn new techniques in house. Most handlings described in the project applications are standard techniques, and in cases when new techniques need to be learned we prefer to first practise on dead or terminal animals under anaesthesia.

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

The following measures will be taken to minimize the tumor model related discomfort

- 1) Intensive observation for clinical signs (like abnormal behaviour, posture and appearance) will be done 1-2 times a week, and increased to 3 times a week in periods were we can expect discomfort.
- 2) 1 to 3 times a week tumor volumes will be measured and when tumors are above 1500 mm³ the mice will be euthanized, to prevent as much as possible that animals reach the human endpoint of 2000 mm³.
- 3) In case of models that show a wound at the location of the tumor, observation is intensified or preliminary stopped before severe ulcerations appear.
- 4) Body weight measurements are included in all experiments were discomfort is expected or when it is unknown.

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 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.

The pain and discomfort induced by the anaesthesia is of higher discomfort then the tumor cell and antibody injection.

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken

to ensure that optimal procedures are used.

- In cases where imaging or a terminal heart puncture is applied, the animals will first receive anaesthesia.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

In some humanized mice models which are adjusted with humane immune cells, we can expect "Graft versus Host Disease"

Explain why these effects may emerge.

- In these models human PBMCs are injected i.p. or i.v., the human T-cells are the most expanding human cell population. The cytotoxic T-cells then recognize the mouse as non-self and can react with the murine body cells. This graft versus host reaction can be observed by clinical signs such as abnormal behaviour, posture and appearance and can be expected 4-6 week after i.p. or i.v. injection of human PBMCs.
- When the PBMCs are subcutaneous co-injected with the tumor cells, only in a few cases these clinical signs are observed. And a graft versus host reaction can be recognized occasionally in these incidences as well.
- When CD34⁺ hematopoietic stem cells are implanted in young mice (of 1 -3 weeks old), the human immune cells will be trained in the thymus to recognize the mouse cells as "selves" and, therefore, no graft versus host reaction (or only at a very minimal level) will appear in these mice

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

In the period of expected graft versus host reaction, observation will be increased and if possible mice will be preventively euthanized before reaching this point.

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.

Since tumor cells/fragments are implanted in the mice/rats, we can expect tumor growth-related adverse effects, which can lead to tumor related humane endpoints. We use the following humane endpoints as guidance:

1. A large tumor volume is a specific humane endpoint in these studies and will be monitored by caliper measurements throughout the whole study: According to Code of practice animal experiment in cancer research) HEP tumor volume = 2000 mm³ for mice, and 40 cm³ or a max diameter of 4.2 cm in rats. However in most cases we stop the mice when tumor volumes of > 1500 mm³ are reached
2. Ulcerations at the site of the tumor, are a specific HEP in these studies.
3. Body weight loss (> 20%)
4. Clinical signs such as abnormal behaviour, dyspnea (difficulties with breathing), salivation, no response on incentives, apathy, involuntary shaking of the body or limbs (tremor), convulsion (where the body muscles contract and relax rapidly and repeatedly), self-mutilation, piloerection, abnormal non-physiological posture, paralysis, severe Diarrhea. The level of severeness of these clinical signs can be used to determine if the humane HEP is reached.
5. Graft versus Host Disease (see I)

When a HEP is reached animals will be taken out of the study and will be prematurely euthanized in most of the cases. In some cases where we observe in an early time-point of the study an (unexpected) adverse event close to HEP we might consider to leave the animals in the study for a very short time (1-3 days) because a repetition of the entire study would consume again several mice. In this case we will increase the observation rate, put them eventually in a separate warmed cage, and/or, when observing weight loss, give a subcutaneous PBS injection to recover body fluid. If after 3 days the animal still is not recovered, the rat/mice will be euthanized

Indicate the likely incidence.

Since we follow the tumor volume frequently, we can anticipate when the HEP with respect to tumor size will be reached. Therefore, only a minimal number of animals will reach the maximal tumor volume as humane endpoint.

In models in which we have intensive experience we do not expect that any of the animals will reach the humane endpoint. However, in models that have heterogeneous tumor growth and/or where we have less experience we can expect more mice to reach the humane endpoint.

Appearance of ulceration at the site of the subcutaneous located tumor is dependent on the tumor cell type, e.g. some tumor have more mucus production, appear therefore more tumid, and can cause irritation of the skin at the site of the tumor more severely than others. For most tumor models we know in advance that ulceration might occur, and we, therefore, can anticipate on the appearance of ulceration. In addition, at the moment when a wound is observed, the monitoring of the whole experiment will be intensified or when it has no impact on the scientific outcome, animals will be euthanized before a severe ulceration appears.

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 procedures have in general a moderate level of discomfort. In some cases where no tumor development takes place we can expect only mild discomfort and in some cases when animals reach unexpectedly the HEP the discomfort is higher. In a typical experiment we expect:

In 22% a mild discomfort

In 75% a moderate discomfort

In 3% a severe discomfort

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 are specifically bred for this procedure and they cannot be used for another type of experiment
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

1. This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
2. A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
3. For more information, see our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
4. 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'. | 24400 | | | | |
|--|--|---------------|--------------------------|---|---|
| 1.2 Provide the name of the licenced establishment. | ██████████ | | | | |
| 1.3 List the serial number and type of animal procedure. | <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left;">Serial number</th> <th style="text-align: left;">Type of animal procedure</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">2</td> <td>1. Orthotopic tumor and Metastasis models</td> </tr> </tbody> </table> | Serial number | Type of animal procedure | 2 | 1. Orthotopic tumor and Metastasis models |
| Serial number | Type of animal procedure | | | | |
| 2 | 1. Orthotopic tumor and Metastasis models | | | | |

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 here described animal procedure includes tumor models with orthotopic implantation and other metastasis models of human or murine tumor cells mainly, or in some cases patient derived tumor material from approved sources (like CROs) in:

1. Xenograft models (human tumor cells/fragments in mice or rats),
2. Syngeneic models (murine tumor cells/fragments in mice or rats), or
3. Humanized models (human tumor cells/fragments in mice or rats), mice harboring part of the human immune system (HIS). Examples of HIS mouse are:
 - Subcutaneous co-engraftment with human immune cells (f.e. human PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells))
 - intraperitoneal or intravenous engraftment with human immune cells (f.ePBMCs)
 - CD34⁺ Hematopoietic stem cell (HSC) reconstitution in young immunocompromised mice. Mice will then be purchased as fully humanized animals.
 - Human Transgenic models (mice will be purchased from appropriate sources)

Within this animal procedure different methods for tumor cell inoculation can be used to allow orthotopic tumor growth or metastasis formation as indicated below from a) to e):

a) Orthotopic tumor cell inoculation without surgery:

Breast cancer cell lines can be implanted subcutaneously into the "fat pads" of mice which represent the mammary glands of mice or rats. For melanoma models the tumor cells can be implanted directly intradermally. This organ specific injection route can in some cases lead to metastasis in other organs. These implantation methods do not need a surgery involving anesthesia.

b) Orthotopic tumor cell inoculation with surgery:
Cancer models, like those derived from pancreas, prostate, kidney, ovary, colon, or other solid cancer forms, need a surgery to get access to the organ of interest in order to establish successfully an orthotopic tumor model in mice or rats. This organ specific injection route can in some cases lead to metastasis in other distant organs. These implantation methods do need anesthesia and in most cases pain relieving methods as well.

c) Intravenous tumor cell inoculation:
Injection of tumor cells in the bloodstream can lead to metastasis formation in different organs. For leukemic cells this often leads to homing and metastasis in different organs and is also known as "a disseminated tumor model". When intravenous injection in the tail vein is applied for other, mainly "bigger" solid cancer cell, the tumor cells home into the lungs and can be used as a lung metastasis model. This injection method does not need surgery or anesthesia.

d) Intra-cardiac tumor cell inoculation:
Injection of tumor cells into the left heart ventricle can be applied when metastasis to different organs is of interest and when metastasis mainly into the lungs needs to be avoided. This method does not include surgery, but intra-cardiac injection needs the use of anesthesia.

e) Intraperitoneal tumor cell inoculation:
This method can be selected when the influence of the peritoneal microenvironment needs to be studied. In that case for example gastric cancer cells or alternative cell will be implanted intraperitoneally. This injection method does not need surgery or anesthesia.

In general, after tumor cell inoculation, the antibodies of interest (antibody variants, - formats, Antibody Drug Conjugates (ADCs), etc. or combinations hereof) will be administered with or without a combination of cytostatics or other anti-cancer agents in these models. Tumor growth (in mm³) will be followed in time by imaging (bioluminescence/fluorescence) or alternatively by Caliper measurements, or a combination hereof. "Tumor volume" measured by imaging or by caliper will be the primary readout parameter. Differences in tumor volume, growth rate, tumor growth inhibition or tumor regression induced by the antibody variants compared to the control group and to each other will be addressed in these studies. The outcome will be supported by statistical analysis, where possible, as indicated below.

Secondary parameters may include blood, tissue or tumor analysis. In some models these secondary parameters can be regarded as primary readout parameters. For example in vivo tumor models where circulating blood biomarker analysis is important in relation to the antibody drug. Or in tumor models, where the effect of the antibody on the tumor microenvironment is an important mechanism of action. In these experiments tumor tissue collection and analysis will be used as primary readout parameter. But in all studies tumor volumes will be measured.

In case new orthotopic or metastasis tumor models have to be set up, only the tumor development is addressed with respect to tumor take, growth rate and variation. The purpose of these establishment studies is the determination of the tumor cell inoculation conditions.

Procedure will be the same as describe below, except for the antibody treatment.

When more complex orthotopic or metastasis models have to be established, such as tumor cell inoculation procedures with surgery or by intracardiac inoculation, we expect the need for practicing upfront establishment of the specific tumor model. This is described in appendix 3.

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

For each animal experiment described in this animal procedure: "orthotopic tumor and metastasis models", the following steps will be taken:

[REDACTED]

- [REDACTED]
- [REDACTED]

[REDACTED]

- [REDACTED]

[REDACTED]

- [REDACTED]
- [REDACTED]

[REDACTED]

- [REDACTED]

[REDACTED]

- [REDACTED]

[REDACTED]

- [REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[Redacted text block]

* total blood sampling will not exceed the maximal limit. Methods for blood sampling include; submandibular vein puncture, vena sephena puncture, tail vein puncture or alternative approved/advised methods

A general experiment will take normally up to 16 weeks. However, depending on the efficacy of the drug, some animals can be studied for long term resistance, development of immune memory. These studies can take maximally up to 52 weeks.

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

To get an indication for the proper group sizes per study a power/sample size analysis has been done based on the tumor volumes, since the research described in this application indicates "tumor volume" as the primary parameter for tumor burden, a continuous variable readout, calculated on the basis of measurements with (digital) calipers in two dimensions.

Power and groups size analysis:

[Redacted text block]

[Redacted text block]

Group size selection:

Based on the power analysis described above we want to select the following group sizes:

- [Redacted list item 1]
- [Redacted list item 2]
- [Redacted list item 3]
- [Redacted list item 4]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

Statistical analysis

[REDACTED]

This analysis can be adapted in the future when new insights appear.

In case of only establishing a new orthotopic or metastasis tumor model statistical analysis is not applied, since treatment is absent in these studies

B. The animals

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

We expect to have an average of [REDACTED] antibody projects active per year, for which we perform in total an average of [REDACTED] experiments per year. This includes both animals procedures described in animal procedure I: subcutaneous tumor models as well as the animals experiments described in animal procedure II: orthotopic tumor and metastasis models. (see also Addenda Table 1: number of animals)

Within this animal procedure II (orthotopic tumor and metastasis models) we expect to perform [REDACTED] experiments per year. [REDACTED] models for efficacy testing and [REDACTED] models to be established).

In average we expect to use [REDACTED] animals per experiments for the orthotopic tumor and metastasis models, which will be [REDACTED] animals per year.

For the establishment of new orthotopic or metastasis tumor models we expect the use of [REDACTED] animal per experiment. We expect the development of [REDACTED] models per year. Which is [REDACTED] animals per year.

This will lead to the final use within this animal procedure to a total of [REDACTED] animals in 5 years. Of this it is anticipated to need [REDACTED] the coming 5 years.

In addition we expect to need of 25 newly ordered animals per year for practising of the different techniques described in this project application, which will be [REDACTED] animals for practicing purposes only for the coming 5 years. We expect the need of [REDACTED] in total for practicing purposes. This is described in appendix 3: practicing of techniques for orthotopic and metastasis models.

There is extensive experience in tumor models in mice and rats which allows translation of the potency of a novel drug to human patients.

For the animal studies described in this application we intend to use different mouse or rat strains

Especially for orthotopic and metastasis models and/or where imaging is applied we will use mouse and rat strains recommended in the literature for a particular orthotopic/metastasis model, or will use animal strains we have experience with (see below). For syngeneic models we have to use the strains where the cells originated from.

In most of our studies we aim to test antibodies specifically targeting (human) tumor antigens, where human tumor cell lines (or fragments) need to be used for implantation. In order to prevent rejection of the tumor cells, it is necessary to use immune deficient mice and rats. We most frequently use CB17 SCID or nude mice. Both, nude and CB17 SCID mice, lack the T-cells subset allowing a better tumor outgrowth. CB17 SCID mice, in addition, have no B-cells meaning they also have no mouse IgG. For the rats we mostly use A-thymic nude rats.

Immune competent mice (mostly BALB/c or C57bl/6) will be used for syngeneic tumor models, where it is important to study the tumor microenvironment. At this moment it is well known that the tumor microenvironment is important for the development of the tumor, and by targeting this environment (for example with a specific antibody) it can lead to tumor growth inhibition. In these cases it is important that the antibody used also recognizes the murine targets. Depending on the origin of the murine tumor cell line the right strain for the respective model needs to be chosen.

NOD SCID mice lack T-cells in addition to B-cells, and also functional macrophages, complement components, as well as functional Natural Killer cells. Therefore, these mice are often used to study bispecific antibodies in which one part is directed against the human target on the tumor cell and the other part is focused on the human immune cell. In these mice, human immune cells will be co-transplanted together with human tumor cells. That allows the efficacy testing of a bispecific antibody targeting the human immune cells and the human tumor cells in an in vivo setting as described in (Labrijn et al, PNAS, 2013). For these studies even mice with additional immune deficiencies such as NSG/NOG or BRGS mice can be used as well.

The use of NSG or NOG (NOD-SCID IL-2Rg^{-/-}), but also BRGS mice and NOD SCID mice are described for experiments in which human blood cells are intraperitoneally or intravenously implanted. All these mice are immune deficient, lack B-, T- and NK-cells, and have defects in macrophages. When PBMCs are inoculated in these mice, the human T-cells are the most expanding human cell population and can be used for T-cell targeting drugs, which is nicely shown by Bacac M *et al.* (Clin Can Res, 2016)

The NSG (and the BRGS mice) or derivatives hereof are used for the already mentioned CD34+cell HSC-His model allowing the expansion of a diversity of human immune cells in these mice [Legrand, PNAS, 2011]. These human immune system (HIS)-mice will be used in experiments where the tumor microenvironment needs to be studied or when a mechanism of action of the drug includes activation or inhibition of the human immune cells or the tumor microenvironment (Morton et al, Cancer Res 2016).

Rat xenograft models using athymic nude rats are mostly used for experiments (e.g. in biomarker studies) when repetitive blood samples are required in amounts impossible to get from single mice. Athymic nude rats do not have T cells and allows the outgrowth of implanted human tumor cells, although in many cases a pre-treatment with cyclophosphamide or irradiation might be needed for a proper tumor outgrowth with an acceptable variation. In addition, for the evaluation of novel antibody formats rat models might be of interest because the complement system in rats allows a better ex vivo analysis since the complement components seem much more stable.

We have a strong preference for the use of female mice, because it has been shown that male mice have a different activity in the innate complement system than female mice (Beurskens F et al, Clin Exp Biol, 1999) and this may influence the effectiveness of the antibodies. To minimize the variation within a single test and between different tests (intra- and inter-variation) we prefer to be limited to one gender. This allows a more accurate statistical analysis and can lead to the use of fewer mice per group. In

addition, we prefer females because these are easier to accommodate (less mutual aggression) than males and are easier to regroup. We want to avoid to house animals alone in one cage because of aggressiveness, which is often the case with males.

However, we do include in some experiments a mixture of males and females, for example the HIS mice are both male and female since these animals are seen as individuals and will be analyzed on a more individual basis. Furthermore, sometimes we have experiments with males only, for example when we want to study the efficacy of our antibodies in prostate cancer.

In general we use mice at an age between 5 and 14 weeks old. Young mice normally have a much better tumor take rate. Per experiment we try to keep the mice in an age difference of maximal 2 weeks, since a higher difference might lead to difference in tumor outgrowth. However, sometimes we are restricted to a certain age of the mice because of technical feasibilities. For example humanized NSG or BRGS mice are somewhat older before tumor cell injection, since first the human immune system has to be established, which can take up to 12-14 weeks.

For each animal experiment it will be carefully considered which background, strain, gender and age is required for having an optimal or most translatable readout for the research question to be addressed in that particular experiment and the efficacy of an antibody drug.

In the future other or new mice and rat strains might be developed that allow better engraftment of tumor cells and/or humane immune cells, and might be used in the animal studies as well.

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.

In general the mice/rats will not be re-used.

However in some experiments we may consider using animals for training purposes, such as for practicing new techniques, for re-challenge experiments, or for resistance studies in which a second round of tumor cell injection and/or treatment will be performed. We want to restrict the re-use only to mice/ rats in which the discomfort in the previous study was mild or moderate and when the animal's general state of health and well-being has been fully restored after the previous study.

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,

In vitro studies to analyze the binding properties of the antibodies to the tumor target and to test their functional anti-tumor activity will always be performed before the start of any in vivo experiment. This allows a first scaling down step of the antibody panel. However in vitro data only will not give an exclusive and complete insight into the anti-tumor efficacy of the antibody of interest. Testing the efficacy of antibodies in in vivo tumor models represents a more complex system which is more comparable to the tumor of the patient and allows the influence of additional factors, such as blood supply, the tumor microenvironment and the contribution of the immune system to the efficacy of the antibody drug. This results in a better and more complete overview on the efficacy of the drugs and allows a better translation to the use in cancer patients.

Reduction,

All the individual tumor models are carefully designed. The variation of the tumor growth (homogeneous

or heterogeneous), the predicted efficacy of the drug, and the research question is always taken into account. At each experiment a well thought experimental design is made in which a good scientific outcome is balanced to the total number of mice used in the experiment. This is supported by a power analysis and suggested group sizes described in 2A.

Furthermore bio-distribution of the antibody of interest to the site of the tumor is also very important for the final efficacy of the drug and can only be determined in in vivo settings. To support this feature the pharmacokinetics of the antibody drugs is studied using a parallel project application which in general uses less mice than a tumor model experiment. Using these data we can detect very well the half-life of the specific antibody in circulation. And together with in vitro data we can better predict the effective dose in the tumor models described in this application. Overall following this strategy, this will lead to the use of fewer mice.

Furthermore, we are intensively involved in setting up alternative model systems such as [REDACTED]. In the coming years new techniques will be developed and evaluated if these techniques can successfully replace, refine or reduce the use of animal experiments. However to explore this, in the first coming years we expect the need of several animal tumor models tumor to evaluate the applicability of the alternative model systems

Refinement

We put a lot of effort in the refinement of the animal tumor models. By having dedicated people we observe, learn and adjust in consecutive studies, so that we know what to expect and in cases of (unexpected) discomfort we can determine how to act to prevent the animals from reaching the "Human End Point" (HEP).

For the maximal tumor size in mice the code of practise "animal experiments in cancer research" (Inspectie W&V, Zutphen/The Hague 1999) describes a tumor volume of 2000 mm³. In our studies we intend to euthanize the mice when a tumor volume above 1500 mm³ is reached. In this way we reduce the discomfort of the mice due to a large tumor size. Also in case of tumor growth in rats, we will euthanize as much as possible the rats before the suggested HEP of 40 cm³ or a diameter of 4.2 cm in the code of practise.

In case of orthotopic tumors or metastasis, we will follow in most cases the tumor development by imaging, and can anticipate on the appearance of HEP related with tumor growth and act accordingly to avoid the HEP as much as possible. When performing consecutive studies with orthotopic models we get a feeling on the time lines and the in vivo luciferase activity. We are then even more cautious when animals reach human endpoints.

With respect to the appearance of ulcerations at the site of the tumors our team has made an instruction guide how to act and how to handle in case an open wound is observed. This has been discussed extensively within our Animal Welfare Body and is communicated and instructed to the responsible animal caretakers as well. See Addendum III " tumorgroei gerelateerde verschijnselen"

Finally, we make sure that our dedicated personnel remains skilled and will, therefore, be trained regularly, by participating in courses or to learn new techniques in house. Most handlings described in the project applications are standard techniques, and in cases when new techniques need to be learned we prefer to first practise on dead or terminal animals under anaesthesia. In some cases as additional mice/or rats will be ordered for the use of practising only ([as described in Appendix 3](#)).

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

The following measures will be taken to minimize the tumor model related discomfort:

- 1) Intensive observation for clinical signs (like abnormal behaviour, posture and appearance) will be done 1-2 times a week, and increased to 3 times a week in periods were we can expect discomfort.
- 2) 1 to 3 times a week tumor volumes will be measured and when tumors are above 1500 mm³ tumors will be stopped, so that only a minimal number of mice reach the human endpoint of

2000 mm³. When imaging is applied to follow tumor growth we can (based on imaging values, time point in the study and tumor type) anticipate when HEP can be reached. We will act accordingly to minimize the discomfort of the mice and rats as much as possible, with keeping the scientific value as high as possible.

- 3) In case of models that show a wound at the location of the tumor, observation is intensified or preliminary stopped before severe ulcerations appear
- 4) Body weight measurements are included in all experiments where discomfort is expected or when it is unknown.

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 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.

For all treatments with antibodies or other test compounds as well as for the implantation into the mammary fat pads (breast cancer models) or intradermally (melanoma models) or intravenously (leukemic and other metastasis models) no anesthesia or analgesia is required because the distress for the animals is very low.

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

- For all surgeries as well as intracardiac tumor cell injections the animals will receive anesthesia

- To prevent pain, an analgesic is applied 30 minutes-1 hour before the surgery and can be repeated 24

hours after the implantation.
- The painkillers needed for more severe pain, will only be applied after consultation of the veterinarian

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

In some humanized mice models which are adjusted with humane immune cells, we can expect "Graft versus Host Disease"

Explain why these effects may emerge.

- In these models human PBMCs are injected i.p. or i.v., the human T-cells are the most expanding human cell population. The cytotoxic T-cells then recognize the mouse as non-self and can react with the murine body cells. This graft versus host reaction can be observed by clinical signs such as abnormal behaviour, posture and appearance and can be expected 4-6 week after i.p. or i.v. injection of human PBMCs.
- When the PBMCs are subcutaneous co-injected with the tumor cells, only in a few cases these clinical signs are observed. And a graft versus host reaction can be recognized occasionally in these incidences as well.
- When CD34⁺ hematopoietic stem cells are implanted in **in young mice (of 1 -3 weeks old)**, the human immune cells will be trained in the thymus to recognize the mouse cells as "selves" and, therefore, no graft versus host reaction (or only at a very minimal level) will appear in these mice

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

In the period of expected graft versus host reaction, observation will be increased and if possible mice will be preventively euthanized before reaching this point.

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.

Since tumor cells/fragments are implanted in the mice/rats, we can expect tumor growth related adverse effects, which can lead to tumor related human endpoints. We use the following human endpoints as guidance:

1. A large (visible) tumor volume is a specific human endpoint in these studies and will be monitored by caliper measurements for the breast cancer and melanoma models throughout the whole study: According to Code of practise animal experiment in cancer research) HEP tumor volume = 2000 mm³ for mice and 40 cm³ or a max diameter of 4.2 cm in rats. **However in most cases we stop the mice when tumorvolumes of > 1500 mm³ are reached**
2. When tumors are not visible, imaging is applied in most studies to follow tumor growth. Based on imaging values, time point in the study and tumor type, we anticipate when the HEP can be reached. Human endpoint is for these non-visible tumors mostly observed by the clinical signs and body weight loss.
3. Ulcerations at the site of the tumor in breast cancer and melanoma orthotopic models have to be considered as a specific HEP in these studies.
4. Body weight loss (> 20%)
5. Clinical signs, most important for orthotopical models since mostly no primary tumor is visible, are: abnormal behaviour, dyspnea (difficulties with breathing), salivation, no response on incentives, apathy, involuntary shaking of the body or limbs (tremor), convulsion (where the body muscles contract and relax rapidly and repeatedly), self-mutilation, piloerection, abnormal non-physiological posture, paralysis, severe Diarrhea. The level of severeness of these clinical signs can be used to determine if human HEP is reached.
6. For some specific leukemic/metastasis models hind leg paralysis is described as a clinical observation. The tumor cells home to different organs/tissues. The paralysis of the hind legs just prior to death is associated with the presence of neoplastic nodules within the spinal canal. (Jin-Song Yan, et al, Chin J of Cancer 2009) and will be considered as a HEP in these studies.
7. Graft versus Host disease. (this will be only expected in humanized mice, as described in I)

When a HEP is reached animals will be taken out of the study and prematurely euthanized in most of the cases. In some cases where we observe in an early time-point of the study an (unexpected) adverse event close to HEP we might consider to leave the animals in the study for a very short time (1-3 days) because a repetition of the entire study would consume again several mice. In this case we will increase the observation rate, put them eventually in a separate warmed cage, and/or, when observing weight loss, give a subcutaneous PBS injection to recover body fluid. If after 3 days the animals still is not recovered, the rat/mice has to be euthanized.

Indicate the likely incidence.

Especially for the orthotopic models where we can apply caliper measurements (breast cancer and melanoma models), we can anticipate when the HEP with respect to tumor size will be reached. Therefore, only a minimal of animals will reach the max tumor volume as human endpoint. For orthotopic and metastasis models, where no primary tumor is easily visible, we visualize primary tumors as well as metastases by applying imaging techniques. In that respect we get a quantitative readout for the tumor and metastasis burden. This, but also the timing in the model and the appearance of clinical signs have to be taken into account to address animal's discomfort and HEP. In models in which we have intensive experience we do not expect that any of the animals will reach the human endpoint. However, in models that have heterogeneous tumor growth and/or where we have less experience we can expect more mice to reach the human endpoint.

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 procedures have in general a moderate level of discomfort. In some cases where no tumor development takes place we can expect only mild discomfort and in some cases when animals reach unexpectedly the HEP the discomfort is higher. In a typical experiment we expect:

In 10% a mild discomfort

In 87% a moderate discomfort

In 3% a severe discomfort

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 are specifically bred for this procedure and they cannot be used for another type of experiment
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

1. This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
2. A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
3. For more information, see our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
4. 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'. | 24400 | |
| 1.2 Provide the name of the licenced establishment. | [REDACTED] | |
| 1.3 List the serial number and type of animal procedure. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i> | Serial number 3 | Type of animal procedure 1. Practicing of several techniques for orthotopic tumor and metastasis tumor models |

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 here described animal procedures include only the practicing of different techniques needed to establish orthotopic and/or metastasis models.

We expect the need of additional mice and/or rats for practicing of two procedures described in appendix 2 (orthotopic/metastasis models). These methods include method b) orthotopic tumor cell inoculation with surgery and method d) intracardiac inoculation of tumor cells. Since we have limited experience with both these techniques, it is important to validate the correct way of tumor cell injection and surgery before establishment and performing antibody efficacy studies. To practice these procedures we will apply standardized techniques that are described in literature or we will be trained by people having experience in the establishment of these models.

Additional animals for practicing are not needed for the following methods: a) orthotopic implantation without surgery, c) intravenous inoculation and e) intraperitoneal inoculation (described in Appendix 2). These techniques are already established and intensively applied in the efficacy testing of the antibodies in development, so no additional practicing is needed. Also for the methods described in appendix 1 (subcutaneous implantation of tumor cells) additional mice /or rats for practicing are not required since this technique is applied in most of our experiments and personnel is already trained and skilled in these techniques.

A general practicing procedure will take up to 1 week. However, in case of successful recovery of the animal after surgery it can be considered to include the steps as described above to monitor the tumor outgrowth. This will allow us to check the specific sites/organs of tumor outgrowth and allow us to validate if the implantation techniques were properly performed. Depending on the tumor growth these can take up to a maximum of 16 weeks.

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

The animals used in this appendix are only used for practicing purposes, and no statistical analysis will be needed to support the primary endpoints of these practicing studies.)

B. The animals

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

The number of animals needed in these practising procedures will be limited to the number of personnel to be trained. Basic trainings steps (such as localization of the specific organs, orientation and route of injection will be first trained (if possible) on animals euthanized in parallel studies.

For the practising procedures described in this appendix we expect the need of 1 session per year. We foresee the need for practicing these skills for technicians, So we expect the need of newly ordered animals per year, which will be animals for practicing purposes only for the coming 5 years. We expect the need of mice and rats in total. (See also addendum Table 1)

There is extensive experience in tumor models in mice and rats which allows the most optimal tumor growth and translation of the potency of a novel drug to human patients. The mice or rat strain used for these training purposes will be based on the animal strain needed for the particular tumor model to be established.

Details for rational of choice of different rat or mice strains are described in Appendix 2.B.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

The animal studies described in this appendix are used to optimize and refine the animal experiments described in appendix II (orthotopic tumor and metastasis models). By applying these practising procedures before the real establishment of the tumor model, we will enhance the success rate of the new orthotopic tumor and metastasis models.

By performing these practising studies we make sure that our dedicated personnel remains skilled. Therefore, training on a regular basis, either by participating in courses or by learning new techniques in house is essential. Also for these new techniques, specific training or dedicated external courses will increase the skills on these techniques

Furthermore the 3R's described in appendix I and II also apply for these practising studies.

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

The following measures will be taken to minimize the tumor model related discomfort:

- 1) The training techniques will be performed under anaesthesia, and if needed painkillers will be applied.
- 2) Intensive observation for clinical signs (like abnormal behaviour, posture and appearance) will be done the first days after surgery/tumor cell inoculation.
- 3) Only when recovery of the mice/rat is successful by means of visual clinical signs (like normal behaviour, motility, absence of piloerection), follow up monitoring can be initiated.
- 4) If recovery of the mice/rat is successful body weight measurements are included.
- 5) Tumor volumes will be monitored up to max 1 time a week by imaging when luciferase or fluorescent tumor cells are used. At the moment that tumors can be visualized by imaging, it can be validated if the tumor growth occurs in the expected organ(s). When this is confirmed, the animal will be euthanized.

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 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.

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

- For all surgeries as well as intracardiac tumor cell injections the animals will receive anesthesia
- To prevent pain, an analgesic is applied 30 minutes-1 hour before the surgery and can be repeated 24 hours after the implantation.
- The painkillers needed for more severe pain, will only be applied after consultation of the veterinarian

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

NA

Explain why these effects may emerge.

-

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

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

Since this appendix includes only practising of new techniques, it might be that mice or rats encounter discomfort/stress/complications after surgery due to the moderate skills on these certain techniques by the technician(s). However, before starting practising on the animals in this protocol, ex vivo training will be performed first by means of theoretical training and training on sacrificed animals in parallel projects.

Since tumor cells/fragments are implanted in the mice/rats, tumor growth related adverse effects can occur. However, we intend to stop the animals as soon as we see the tumors appearance and therefore it is not likely that the animals will reach the humane endpoint related to tumorgrowth. But since in practising these new models we cannot fully predict the timing of tumor take appearance and since small tumors might also cause adverse effects we use the following humane endpoints as guidance:

1. Since the tumors will not be visible, imaging can be applied, in which case bioluminescent or fluorescent tumor cells are used. Based on the imaging values, we can observe the locations/organs of tumor growth and validate the expected metastasis sites of the tumor model. In additional we learn how to anticipate on the HEP in these models. HEP in these models will mostly be defined by body weight loss and clinical signs as described in point 2 and 3.
2. Body weight loss (> 20%)
3. Clinical signs, most important for orthotopical models since mostly no primary tumor is visible, are: abnormal behaviour, dyspnea (diffculties with breathing), salivation, no response on incentives, apathy, involuntary shaking of the body or limbs (tremor), convulsion (where the body muscles contract and relax rapidly and repeatedly), self-mutilation, piloerection, abnormal non-physiological posture, paralysis, severe Diarrhea. The level of severeness of these clinical signs can be used to determine if humane HEP is reached.

When a HEP is reached animals will be directly euthanized.

Indicate the likely incidence.

Since the animal experiments in this appendix describe the practising of techniques, it might be that in several cases the animals will not recover properly from the surgery. Incidence of reaching the HEP in relation of tumor growth can occur in some animals. However we expect

that in most cases large tumor volumes can be avoided, since the location of growth is more important in the validation of the practising then the tumor volume. Therefore we intend to stop the mice/rat before the HEP is reach caused by large tumor growth. However in some cases small tumor growth can also cause discomfort and by following the visual clinical signs we try to anticipate on and minimize the discomfort as much as possible.

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 procedures in general cause a moderate level of discomfort. In some cases where we euthanize the animals under anaesthesia we expect only mild discomfort. However in most cases we will monitor the recovery of the animals from anaesthesia and follow the mice/rats to check the tumor formation after 1 to 3 weeks. In some cases where the animals do not successfully recover from surgery severe discomfort can be encountered. Therefore in general we expect in the practising procedures:

In 10% mild discomfort

In 84% moderate discomfort

In 6% severe discomfort

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 are specifically bred for this procedure and they cannot be used for another type of experiment

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

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer : 2017.II.400.006
2. Titel van het project : Research and Evaluation of therapeutic test antibodies in tumor models in mice and rats
3. Titel van de NTS : Onderzoek en Evaluatie van therapeutische test antilichamen in kanker modellen in muizen en ratten

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: 03-02-2017
 aanvraag compleet:
 in vergadering besproken: 15-02-2017 en 15-03-2017
 anderszins behandeld:
 termijnonderbreking(en) van / tot : 22-02-2017/02-03-2015 en 20-03-2017/21-03-2017
 besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
 aanpassing aanvraag:
 advies aan CCD: 29-03-2017

7. De aanvraag is afgestemd met de IvD en deze is hiermee akkoord.

8. Eventueel horen van aanvrager

- Datum: 15-03-2017
- Plaats: Utrecht
- Aantal aanwezige DEC-leden: 7
- Aanwezige (namens) aanvrager: verantwoordelijk onderzoeker
- Gestelde vragen en verstrekte antwoorden:
Met de onderzoeker is gesproken over de selectie criteria van de targets en het doen van een terugrapportage, zie A9.

9. Correspondentie met de aanvrager

- Datum vragen: 22-02-2017
- Datum antwoord: 02-03-2017

- Gestelde vragen en antwoorden:

Projectvoorstel

- Algemeen: Tumormodellen staan ter discussie omdat men zegt dat de transleerbaarheid laag is. Kunt u aangeven wat u daarover denkt (of weet) en waarom, zodat de DEC zich een oordeel kan geven over de transleerbaarheid.

The translatability of tumor models to cancer patients is indeed always a debate. The challenges and limitations of tumor models are often discussed at tumor model conferences and workshops and is nicely summarized by Denayer T et al., New Horizons in Translational Medicine, 2014

However it can be mentioned that the tumor model field (including our work) is working hard on the improvements. For example Patient Derived Xenograft (PDX) models, where parts of human tumor tissues are transplanted and passaged subcutaneously in the mice result in growth of the patient derived tumor material in mice. This allows a direct analysis of the potency of anti-tumor drugs on the tumors of these patients. After several passages the structural architecture and genetics of these tumors are still very comparable to the tumor of the patients, and screening of these PDX xenograft models can be used to predict the drug response in clinical trials as is nicely described by Goa et al., Nature Medicine, 2015.

Furthermore an enhanced translatability of tumor models can be established creating a tumor microenvironment which is more closely to the cancer patient. For example by introducing the human immune system (by means of injection of peripheral Blood Mononuclear cells) or the use of humanized mice (mice that are at a young age injected with CD34+ hematopoietic stem cells which allows differentiation of a diversity of human immune cells in these mice). Another alternative is the injection of the tumor cells in the organ of origin (orthotopic implantation). For example injection of the pancreas tumor cell line into the pancreas. This creates a "natural environment" that will be more comparable to the cancer of the patient. In addition the translational value of tumor models can be further enhanced when combined with other translational tools such as pharmacokinetic studies and biomarker studies, which is currently applied more often than in the past.

All these improved translatable tumor models are included in our antibody development process and in this project application. But it has to be realized that the animal models will always have their limitations and cannot cover all responses of all the individual cancer patients in the clinic. Therefore, in the late phase of the development process, a strong data package (both in vitro and in vivo) is needed to convince clinicians (and patients) of the efficacy of the new anti-tumor drug, and that they are interested to enroll into the clinical trial studies. Since each tumor models differently reflects the complexity of the cancer patient, mostly more different tumor models have to be included in these data packages. In the early phase of the antibody drug development process, the tumor models are rather used as a bridge between the in vitro findings and the cancer of the patients, since animal tumor models better reflect the complexity of the human cancer compared to in vitro studies only. For this purpose, the tumor models described in this application are often used

in the selection process of moving the best antibody drug candidate forward (or stop the development process). We know that these tumor models have their limitations but these models are in general much more suitable for screening and selection than other models, since for some models we see less variation in tumor growth.

Overall it is important to understand the possibilities and limitations of the tumor models, and each animal tumor model that has to be performed has to be carefully selected, designed and conducted. Only then the tumor models can be used properly for the antibody drug selection process and will have translational value for clinical studies with cancer patients.

- 3.1 Achtergrond/3.4 Onderzoeksstrategie: De DEC adviseert u het projectvoorstel zo te schrijven dat alle keuzes die gemaakt worden navolgbaar zijn. De onderbouwing van hoe u komt tot de keuze voor een bepaald type tumor, of daarbij het orthotoop of subcutane model wordt gebruikt en welk type muizen daarvoor wordt ingezet mist. Hierdoor is niet te beoordelen wat de succeskans is dat voor een antibodytherapie een goed experiment is uitgevoerd. U zou bijvoorbeeld kunnen zeggen dat, waar mogelijk, voor een orthotoop model gekozen wordt om zoveel mogelijk na te bootsen wat in vivo gebeurt en als dat niet mogelijk blijkt het subcutane model wordt gebruikt. Het opnemen van een beslisboom en/of tabel waarin duidelijk staat aangegeven welk type tumor u bestudeert, welke behandeling is toegepast, welk immunologisch model u verwacht en welke muizen gebruikt worden zou de aanvraag beter navolgbaar maken en kan de kans op slagen duidelijk maken. In dit kader vraagt de DEC af of niet al lang bekend is bij welk type kanker welk model met welk type dieren geschikt is.

As requested we added a scheme in paragraph 3.4.3, which depicts the strategy for model choice depending on the stage of the antibody development process (fig 2a). As indicated, in the early phase of the drug development process the

[redacted]

In all models selected a further deviation will be made depending on the influence/need of the (human) immune system as indicated in fig 2b.

- 3.1 Achtergrond: Het toevoegen van een afbeelding waaruit blijkt wat de antibody formats zo specifiek/bijzonder maakt zou eveneens verhelderend werken. *A figure explaining the different antibody formats is added in 3.1, including some additional text (indicated in bleu).*
- 3.1 Achtergrond: U geeft aan in principe al het onderzoek in de muis uit te voeren, behalve als er veel bloed nodig is, dan wordt de rat gebruikt. Kunnen de resultaten van de muis/rat 1-op-1 worden vertaald? Hoe gaat u daarmee om? Is het geen optie om meer muizen te gebruiken wanneer meer bloed nodig is? Graag verhelderen. *The use of more mice is indeed an option, and this will also sometimes be the case. However for biomarker research it is an advantage to have everything from one animal, to study the cause-effect relation of the tumor growth, treatment, pharmacokinetics and biomarker research. Furthermore, by the use of more animals instead of one, more variation*

is introduced which is often not preferred. In addition, the use of rats for this type of research will lead finally in to a reduction of total animal numbers.

However, the DEC is correct that it has to be considered if the mouse results can be 1:1 translated to the rat models. Therefore, by the establishments of the rat tumor models we will include one (or more) positive control antibodies, of which we know how they perform in mouse tumor models, and if this matches with the rat model. On the other hand the biomarker research will mainly be done to support the clinical trial design in patients. So, the results found in the animal study will preferable be compared to (ex vivo) research on patient materials.

- 3.1 Achtergrond: In de zin: *"Parallel to the studies described in this project application, we are studying related processes which are part of a successful antibody generation, like immunizations in rodents and pharmacokinetic studies"* graag duidelijker aangeven dat de immunisatie procedure (= de productie van antistoffen) en het onderzoek van de farmacokinetiek onderdeel zijn/worden van aparte aanvragen/projectenbeschikkingen. *To make this clearer I added in 3.1 the sentence: These related processes are described in two different parallel project applications: "Investigation of pharmacokinetics of antibody formats in rodents" and "Immunization of rodents (transgene for human IgG)".*

- 3.1 Achtergrond: De DEC raadt u aan in de aanvraag duidelijk aan te geven dat de targets nog niet allemaal in beeld zijn.

In 3.1 we added the text:

"Yearly we evaluate a large number of novel potential cancer targets....."

- 3.3 Belang: De zin: *"Evaluation and research of new antibodies drug candidates or new antibody formats in mice or rat tumor models will give insight in the mode of action of the drugs and the understanding of these models in cancer"*. Dit roept vragen op. Wat bedoelt u met 'model' en 'understanding of these models'? Is dat het immunologisch model of het kankermodel?

With 'understanding of these models', we meant the understanding of the applicability of all the different models for antibody efficacy studies described in this application. This indeed includes the recently developed humanized mice models, but also the orthotopic, metastasis, syngeneic, xenograft and rat models. Each model type will have its own characteristics and by studying this (for examples by taking out the tumor and explore the target expression or the immunological cell content) we will gain insight into these models and it will help to refine the future tumor models design. We adjusted the text in 3.3 slightly to make it more clear: "Furthermore, by analyzing the different animal tumor models described in this application, we will gain understanding in the use....."

Bijlage 1

- Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters/bijlage I: De DEC is heeft moeite met het begrijpen van de powerberekening in addendum I: Power analyses. In de figuur worden groeicurves getoond met een [REDACTED]. In de [REDACTED].

tabel staan de gemiddelde volumina van dezelfde tumoren, maar nu met de een standaard deviatie. Voor de powerberekening gaat u uit van het eindvolume op de laatste dag dat die groep een intacte tumor heeft. Daarbij gaat u voorbij aan het feit dat dat eind volume op verschillende dagen valt. Zou u kunnen toelichten waarom u de

[REDACTED]

Graag uw toelichting/visie.

In the graphs of addendum I, we display the curves of only the control group from 5 different independent experiments which all were performed using the subcutaneous inoculation of A431 in immune deficient (SCID) mice or B16F10 tumor cells in immune competent C57/bl6 mice. [REDACTED]

[REDACTED]

By

performing both these statistical analysis we believe we support the observed tumor growth data in the most representative way in most studies to be performed within this project application.

The methods the DEC raises (linear regression on logarithmic scale and the area under the curve (AUC)) are indeed alternative methods which are more and more discussed. [REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

We do, however, keep exploring the most optimal analysis methods including the 'area under the curve' (AUC) and the linear regression. But at this moment these analysis are still exploratory in the field, and it cannot be stated (yet) that another method is better than the ones that we are currently using.

- Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: De DEC geeft u de suggestie om het opzetten van mogelijk nieuwe tumormodellen te beschrijven in een nieuwe bijlage. *We considered the splitting of the "to be established tumor models" in a separate appendix, However, since it concerns both the establishment of new models in the appendix 1 (s.c. tumor models) and in Appendix 2 (orthotopic and metastasis modes), we were not convinced that a new appendix would provide more clarity in the application. Furthermore, the handlings described in the two appendices both also are incorporated in the establishment of the new models, the only thing which is different in the establishment, is the lack of antibody treatment.*

To give more insight in the "models to be established", we have chosen to adjust both applications 1 and 2 by adding a more detailed description of new models to be established. See changes in green throughout appendix 1 and 2). Furthermore to provide more insight in the expected numbers of these experiments we will add Table 1 with the expected number of animals. This gives an overview of the total number we expect to use for the different appendixes including the efficacy models and establishment models. These numbers are also included in 2B. We think this gives a better insight in the expected establishment of new tumor models.

- Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: U geeft aan dat het af en toe nodig is een medewerker te trainen in de modellen. De DEC adviseert u ook hiervoor een aparte bijlage schrijven omdat dat meer transparantie geeft. *As requested we made a separate appendix for this and is now described in a new appendix 3 "Practicing of several techniques for orthotopic tumor and metastasis tumor models"*
- B. De dieren: Het is niet helder waar het aantal geschatte experimenten en het aantal van [REDACTED] dieren per experiment op gebaseerd is. De aantallen die nodig zijn voor het opzetten

van nieuwe modellen en voor training is ook niet terug te vinden, maar dit wordt ondervangen door de extra bijlage voor deze nieuwe modellen.

The number of animals needed is for training is also included in Table 1 as well as the rationale for the number of animals needed per experiments, needed for in the s.c. tumor models and the orthotopic and metastasis models. Including the animals expected for the establishment of new tumor models.

- J. Humane eindpunten: De DEC verzoekt u hier nog toe te voegen dat u in de meeste gevallen 1500 mm³ hanteert en niet de 2000 mm³ uit de Code of Practice. Dit geldt ook voor bijlage 2.

We do want to stress that we do not consider a tumor volume of 1500 mm³ as a human endpoint. We do indeed have our internal policy in stopping the mice when a tumor volume equal or higher than 1500mm³ is detected. This we apply because the animals in our studies are euthanized always at the end of the study, and since in most of our studies no additional scientific values will be obtained at tumor sizes above 1500mm³. Therefore, we intend to stop the mice BEFORE the human endpoint of 2000 mm³ is reached, and use > 1500mm³ as an internal guideline. Subcutaneous tumors are inoculated at the flank of the mice and mostly do not seem to have severe discomfort of a tumor size up to 2000 mm³. In our 15 years' experience we observed that the animals are viable and have no additional clinical signs and are still very mobile and active even if a tumor size of 2000mm³ is reached. We therefore follow the 'Code of Practice' guidelines and use the 2000 mm³ for the mice as a human endpoint and not the 1500mm³. We apply a scoring of discomfort of the mice at a tumor size up to 1000 mm³ as mild, a tumor size between 1000-2000mm³ as moderate and above 2000mm³ as severe discomfort. We did add the text, that we in most cases stop the mice when a tumor volume of higher than 1500 mm³ is detected.

Bijlage 2

- K. Classificatie van ongerief: Hier worden exact dezelfde percentages ongerief aangegeven als in bijlage 1. De DEC vraagt zich af of dit klopt. Graag verhelderen.
We did indeed use the same number since it is an estimation of what we expect. But the DEC is correct that we might have to adjust this a bit. The animal models described in appendix I are the most experiments to be performed in the coming years, where we have the most experience with and which we can rate the best. So, there we expect a discomfort of 22, 75 and 3%. The handlings in the orthotopic and metastasis models are more complex than the subcutaneous tumor models and need in most cases repeated imaging and in some cases surgery. These handlings are all done under anesthesia, which will reduce the discomfort of the mice/rats but we re-discussed and came to the conclusion that repeated anesthesia and recovery of surgery would also give moderate discomfort. So we expect more moderate discomfort in this appendix and adjusted this to 10, 87 and 3 %. In the appendix describing the practicing of new techniques we expect indeed some more severe discomfort because of learning the technical skills of these techniques. Although we perform these

studies also under anesthesia, use painkillers where needed, and stop the animal at an earlier stage of the study, we have adjusted the expected level to 10, 84 and 6%.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

- Datum vragen: 20-03-2017
- Datum antwoord: 21-03-2017
- Gestelde vragen en antwoorden:
 - De DEC raadt u aan een omschrijving van de selectiecriteria van de targets op te nemen in het projectvoorstel en te noemen dat u desgewenst bereid bent een jaarlijkse terugrapportage te verstrekken.
- In the previous version we did already mention more about the target selection process. But since this is again specifically mentioned by the DEC, we elaborate more on this in section 3.1 of the study proposal. Furthermore as discussed, we will indicate to the CCD that if desired, we are open for reporting back the progress of the application.*
- 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.

Een vrij recente en succesvolle therapievorm voor patiënten met kanker is de toepassing van therapeutische antilichamen. Om deze therapievorm te optimaliseren en breder toepasbaar te maken worden nieuwe en gemodificeerde therapeutische antilichamen ontwikkeld. De aanvrager wil met behulp van de voorliggende projectaanvraag het werkingsmechanisme en de effectiviteit van nieuwe en gemodificeerde therapeutische antilichamen in muizen en ratten in kaart brengen, zodat met behulp van de verkregen resultaten de meest veelbelovende antilichamen geselecteerd kunnen worden voor verder (pre)klinisch onderzoek. Het belang van deze doelstelling is in de ogen van de DEC substantieel.

De relatie tussen het hoofddoel en de subdoelen komt – voor wat betreft de bijlagen 1 en 2 – overeen met voorbeeld 4B uit de ‘Handreiking Invulling Definitie Project’. Bijlage 3 is een essentieel onderdeel van de projectaanvraag, dat nodig is om de experimenten van bijlage 2 te kunnen doen slagen.

2. Voor zover de DEC bekend, is er geen mogelijk tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de dierexperimenten in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie sluit aan bij de hoofddoelstellingen.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is de selectie, analyse en evaluatie van nieuwe therapeutische antilichamen met behulp van *in vivo* tumormodellen in muizen en ratten. Het uiteindelijke doel van het project is de ontwikkeling van nieuwe therapeutische antilichamen voor de behandeling van kankerpatiënten. Voordat de veiligheid en effectiviteit van dergelijke antilichamen in klinische trials in mensen onderzocht kunnen worden is het van belang dat allerlei belangrijke aspecten (zoals het werkingsmechanisme en de effectiviteit) nauwkeurig in kaart gebracht worden met behulp van *in vitro* en dierexperimenten. De DEC is daarom van mening dat er in voldoende mate een relatie is tussen het directe doel en het uiteindelijke doel.
5. De belangrijkste belanghebbenden in dit onderzoeksproject zijn de proefdieren, de doelgroep (kankerpatiënten), het onderzoeksveld en de vergunninghouder. De morele waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: welzijn (gezondheid en stress) en rechtvaardigheid (intrinsieke waarde en integriteit). De morele waarden die voor de doelgroep worden bevorderd zijn: welzijn (kwaliteit van leven) en rechtvaardigheid (beschikbaarheid van een doeltreffende therapeutische behandeling). De morele waarden die voor het onderzoeksveld en de vergunninghouder worden bevorderd zijn: welzijn (wetenschappelijke en commerciële ontwikkelingen).
6. De aanvrager geeft niet aan nadelige effecten op het milieu te verwachten. De DEC ziet geen aanleiding om aan te nemen dat zich toch nadelige effecten zullen voordoen.

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. De onderzoeksgroep heeft veel ervaring met de ontwikkeling van therapeutische antilichamen en de uitvoering van het dierexperimenteel onderzoek dat daar een belangrijk onderdeel van is. De onderzoeksgroep heeft in het verleden laten zien dat preklinische studies, zoals beschreven in de voorliggende projectaanvraag, eraan bijdragen dat nieuwe therapeutische antilichamen succesvol naar de

kliniek gebracht kunnen worden. 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.

8. Het project is goed opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten logisch en helder aan bij de aangegeven doelstellingen en de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. In dit project wordt de effectiviteit van verschillende therapeutische antilichamen onderzocht in muizen en ratten (bijlage 1 en 2), waarbij de opzet van de experimenten kan variëren en is afgestemd op het werkingsmechanisme van het betreffende antilichaam, de target het type en de lokalisatie van de tumor waartegen het antilichaam wordt ingezet) en de bijbehorende onderzoeksvragen. Er wordt gebruik gemaakt van subcutane tumormodellen (bijlage 1) en orthotope en metastatische tumormodellen (bijlage 2). Met de meeste tumormodellen heeft de onderzoeksgroep reeds ruimschoots ervaring, maar het is ook mogelijk dat voor een bepaald antilichaam en bijbehorende target een nieuw tumormodel opgezet moet worden. Om de bekwaamheid van alle betrokkenen te waarborgen worden medewerkers getraind in het uitvoeren van twee experimentele handelingen, die essentieel zijn voor het slagen van de experimenten met de orthotope en metastatische tumormodellen in muizen en ratten (bijlage 3). De keuze voor de te testen antilichamen is gebaseerd op resultaten van *in vitro* assays waarin de specifieke bindings- en functionele activiteit van de antilichamen onderzocht is. De wijze waarop de keuze voor een bepaald tumormodel tot stand komt is met behulp van figuur 2 in de projectbeschrijving helder weergegeven.

Welzijn dieren

9. Er is 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 EU richtlijn)
- Zwerfdieren (10h)
- Hergebruik (1e lid 2)
- Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
- Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
- Dodingsmethode niet volgens bijlage IV EU richtlijn (13c lid 3)

De keuze hiervoor is voldoende wetenschappelijk onderbouwd en de aanvrager voldoet aan de in de Wet op de dierproeven, voor de desbetreffende categorie, genoemde beperkende voorwaarden. Muizen en ratten kunnen hergebruikt worden voor trainingsdoeleinden (bijlage 3) of voor de zogenaamde *re-challenge* en *resistance* studies (bijlagen 1 en 2).

10. De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de EU richtlijn.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Voor bijlage 1 schat men in dat 22% van dieren licht ongerief ervaart, 75% matig ongerief en 3% ernstig ongerief. Dit ongerief is het gevolg van verschillende experimentele handelingen en de bijverschijnselen van de geïnduceerde tumorgroei. Wanneer geen tumorgroei plaatsvindt blijft het ongerief beperkt tot licht ongerief. Voor bijlage 2 schat men in dat 10% van de dieren licht ongerief ervaart, 87% matig ongerief en 3% ernstig ongerief. In vergelijking met bijlage 1 zullen meer dieren matig ongerief ervaren, omdat de aard van de modellen (orthotope en metastasemodellen) meer/complexere experimentele handelingen vereisen. Voorbeelden van dergelijke handelingen zijn chirurgische benadering van organen ten behoeve van tumorinductie en herhaaldelijke anesthesie ten behoeve van beeldvorming. Voor bijlage 3 schat men in dat 10% van dieren licht ongerief ervaart, 84% matig ongerief en 6% ernstig. Laatstgenoemde categorie ongerief is hoger dan in de andere bijlagen, omdat experimentele handeling door minder ervaren medewerkers worden uitgevoerd in het kader van training. Alle inschattingen zijn gebaseerd op jarenlange ervaring met vergelijkbare experimenten.
12. De integriteit van de dieren wordt fysiek en mentaal aangetast. Fysieke aantasting is het gevolg van geïnduceerde tumorgroei en verschillende experimentele handelingen, zoals chirurgie en bloedafnamen. Mentale aantasting is het gevolg van (herhaaldelijke) anesthesie die vereist is voor een aantal experimentele handelingen, zoals chirurgie en beeldvorming.
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. De aanvrager heeft, zowel schriftelijk als mondeling, duidelijk toegelicht wat in de experimenten met muizen het verschil is tussen het experimenteel eindpunt (een tumorvolume van 1500 mm³) en het humaan eindpunt (een tumorvolume van 2000 mm³). Wanneer een tumor een volume van 1500 mm³ heeft bereikt, dan wordt het betreffende dier geëuthanaseerd, omdat het geen aanvullende wetenschappelijk relevante informatie zou opleveren wanneer men het dier in leven zou laten (experimenteel eindpunt). Men ziet erop toe dat het tumorvolume de grens van 2000 mm³, die conform de 'Code of Practice' als humaan eindpunt gehanteerd wordt, niet overschrijdt, zodat het ongerief ten gevolge van de geïnduceerde tumoren beperkt blijft tot matig ongerief. Voor ratten hanteert men conform de 'Code of Practice' een tumorvolume van 40cm³ en een diameter van 4,2 cm als humaan eindpunt. Naast de afmetingen van de tumoren worden ook een groot aantal andere verschijnselen als humaan eindpunt gehanteerd. Daarbij gaat het om een breed scala aan verschijnselen, zoals gewichtsverlies, ulceratie of paralyse, die het gevolg kunnen zijn van tumorgroei. Men houdt er rekening mee dat in de bijlage 1, 2 en 3 respectievelijk 3%, 3% en 6% van de dieren het humaan eindpunt bereikt. Dit komt overeen met de percentages dieren die naar verwachting ernstig ongerief zullen ervaren (zie C11).

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. De effectiviteit van therapeutische antilichamen is in grote mate afhankelijk van – deels nog onbekende – complexe interacties tussen verschillende organen, weefsels en cellen. Daarbij gaat het bijvoorbeeld om het zogenaamde *microenvironment* van de tumor en de activiteit van het immuunsysteem. Dergelijke factoren kunnen niet in hun volledigheid *in vitro* of *in silico* nagebootst worden. *In vitro* experimenten en *in silico* simulaties worden wel gebruikt om een voorselectie te maken van veelbelovende therapeutische antilichamen, en om verkregen resultaten te vergelijken/valideren met eerder uitgevoerde experimenten en gegevens uit de literatuur.
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. De aanvrager heeft – in de bijlagen beschrijving dierproeven en met behulp van meerdere addenda – zeer uitvoerig uiteengezet op welke wijze de juiste groepsgroottes voor de verschillende experimenten en experimentele groepen worden bepaald. De groepsgrootte zal onder andere afhangen van het type experiment (exploratief vs. kwantitatief), het type tumor en tumorgroei (homogeen vs. heterogeen) en de uitleesparameters.
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 en metingen, en kan de snelheid en aard van de tumorgroei en de te verwachten bijverschijnselen in de verschillende modellen goed inschatten (uiteraard met uitzondering van eventueel nieuw op te zetten modellen). De dieren worden nauwlettend geobserveerd, zodat tijdig geconstateerd wordt wanneer een dier het humaan eindpunt bereikt, en het optreden van ernstig ongerief tot een minimum beperkt kan worden.
17. Er is geen sprake van wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Dieren van beide geslachten zullen niet in gelijke mate worden ingezet. Voor de bijlagen 1 en 2 zullen met name vrouwelijke dieren ingezet worden, omdat de activiteit van het complementsysteem in mannelijke dieren anders is dan in vrouwelijke dieren. Daardoor kan de effectiviteit van de antilichamen tussen de beide geslachten verschillen. Door dieren van één geslacht in te zetten kan men de variatie binnen en tussen experimenten – en daarmee het aantal dieren per experimentele groep – minimaliseren. De keuze voor vrouwelijk dieren heeft als bijkomende voordeel dat de dieren makkelijker in groepen gehuisvest kunnen worden. Daar waar de aard van een experiment het toelaat (doordat metingen gericht zijn op het individuele dier), zullen wél zowel mannelijke als vrouwelijke dieren ingezet worden. Er worden ook

experimenten uitgevoerd waarbij de locatie van de tumor vraagt om inzet van enkel mannelijke dieren (experimenten met tumoren in de prostaat). In bijlage 3 zullen beide geslachten ingezet worden voor de trainingsdoeleinden. De DEC is ervan overtuigd dat de aanvrager in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd dat het, om de doelstelling te bereiken, in een groot deel van de experimenten noodzakelijk is om de proeven met of alleen mannelijke of alleen vrouwelijke dieren uit te voeren.

19. De dieren worden in het kader van het project gedood, omdat de doelstelling van het project alleen behaald kan worden wanneer tumoren en anderen weefsels post mortem geanalyseerd worden. Bovendien zou het niet toelaatbaar zijn om dieren met geïnduceerde tumorgroei na afloop van het experiment in leven te laten. De dieren worden volgens een passende – en in bijlage IV van de EU richtlijn genoemde – methode gedood.
20. Omdat in het projectvoorstel muizen en ratten 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 morele vraag die de DEC dient te beantwoorden is: rechtvaardigt het belang van het voorliggende project, dat bijdraagt aan de ontwikkeling van nieuwe therapeutische antilichamen voor de behandeling van kankerpatiënten, de onvermijdelijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de gebruikte proefdieren?
2. Er vindt een aanzienlijke aantasting van welzijn en integriteit van de proefdieren plaats, welke gepaard gaat met licht tot ernstig ongerief. Indien de hierboven genoemde doelstellingen behaald worden, dan zal dit project eraan bijdragen dat nieuwe en effectievere therapeutische antilichamen beschikbaar komen voor kankerpatiënten. Patiënten zouden daar zeer bij gebaat zijn, omdat de huidige therapieën vaak onvoldoende effectief zijn en gepaard gaan met vervelende bijverschijnselen. Het is aannemelijk dat de translationele doelstelling behaald zal worden. Daarvoor is de inzet van proefdieren noodzakelijk, maar de onderzoekers doen al het mogelijke om het ongerief voor de dieren en het aantal dieren tot een minimum te beperken.
3. Op grond van het bovenstaande is de DEC van oordeel dat de selectie, analyse en evaluatie van nieuwe therapeutische antilichamen met behulp van *in vivo* tumormodellen in muizen en ratten een substantieel belang vertegenwoordigt en dat dit substantiële belang opweegt tegen de aanzienlijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de proefdieren. Het gebruik van de proefdieren zoals beschreven in de aanvraag is daarmee gerechtvaardigd.

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

Genmab B.V.

Yalelaan 60

3508 AD 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
AVD2440020171264

Bijlagen

2

Datum 3 april 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte mevrouw

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 31 maart 2017. Het gaat om uw project "Research and Evaluation of therapeutic test antibodies in tumor models in mice and rats". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD2440020171264. 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:

3 april 2017

Aanvraagnummer:

AVD2440020171264

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
3 april 2017
Aanvraagnummer:
AVD2440020171264

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 24400
Naam instelling of organisatie: Genmab B.V.
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: ██████████
KvK-nummer: 30169902
Straat en huisnummer: Yalelaan 60
Postcode en plaats: 3584 CM UTRECHT
IBAN: ████████████████████
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: ██████████

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: ████████████████████
Functie: ████████████████
Telefoonnummer: ████████████████
E-mailadres: ████████████████████

Datum:
3 april 2017
Aanvraagnummer:
AVD2440020171264

Gegevens gemachtigde

KvK-nummer: 30169902
Naam: XXXXXXXXXX
Adres: Yalelaan 60
Postcode en plaats: 3508 AD UTRECHT
Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Ja

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

Over uw aanvraag

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

Over uw project

Geplande startdatum: 1 mei 2017
Geplande einddatum: 1 mei 2022
Titel project: Research and Evaluation of therapeutic test antibodies in tumor models in mice and rats
Titel niet-technische samenvatting: Onderzoek en Evaluatie van therapeutische test antilichamen in kanker modellen in muizen en ratten
Naam DEC: Utrecht
Postadres DEC: Bureau van de DEC Utrecht , Huispostnummer D01.343, Postbus 85500, 3508 GA Utrecht
E-mailadres DEC: dec-utrecht@umcutrecht.nl

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1.541,-
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:



Functie:



Plaats:

Utrecht

Datum:

30 maart 2017

Datum:

3 april 2017

Aanvraagnummer:

AVD2440020171264



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Genmab B.V.

Yalelaan 60

3508 AD 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
AVD2440020171264

Bijlagen

2

Datum 3 april 2017

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 3 april 2017

Vervaldatum: 3 mei 2017

Factuurnummer: 171264

| Omschrijving | Bedrag |
|---|------------|
| Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD2440020171264 | € 1.541,00 |

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

Genmab B.V.

Yalelaan 60

3508 AD 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
AVD2440020171264

Datum 14 april 2017

Betreft Aanvulling aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte mevrouw [REDACTED],

Op 31 maart 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Research and Evaluation of therapeutic test antibodies in tumor models in mice and rats" met aanvraagnummer AVD2440020171264. 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

De NTS bevat enkele voor het brede publiek moeilijk te begrijpen termen, zoals recombinante antilichamen en imaging. Graag hier in de NTS andere termen voor gebruiken of de termen (kort) uitleggen.

Daarnaast is in 3.5 niet helder hoeveel dieren licht, matig dan wel ernstig ongerief zullen krijgen. Graag dit verhelderen.

Onduidelijkheden

- 1) U heeft als doelcategorie translationeel of toegepast onderzoek aangekruist. Naar ons idee beschrijft u in uw aanvraag ook fundamenteel onderzoek (MoA studies bijvoorbeeld) maar ook onderwijs/opleiding (bijlage 3.4.4.3). Graag deze doelcategorieën toevoegen aan projectvoorstel en NTS of onderbouwen waarom u niet voor deze categorieën gekozen heeft.
- 2) In bijlagen 3.4.4.1 en 3.4.4.2 beschrijft u hergebruik van dieren voor meerdere doeleinden. Er is sprake van hergebruik van een dier wanneer voor een vervolgproef in plaats van het betreffende dier evengoed een ander dier

gebruikt kan worden. De voorbeelden die u noemt (re-challenge experimenten en resistance studies) vallen hier niet onder omdat hier niet een willekeurig ander dier voor gebruikt zou kunnen worden. Graag dit aanpassen.

3) In de verschillende bijlagen beschrijft u een acclimatisatieperiode van tenminste 3 dagen. Algemeen geaccepteerd wordt een acclimatisatieperiode van tenminste 1 week. Graag dit aanpassen.

4) In de bijlagen 3.4.4.1 en 3.4.4.2 beschrijft u een aantal handelingen die mogelijk bij de dieren zouden kunnen worden toegepast. Het is niet helder in welke combinaties deze handelingen zouden kunnen voorkomen en hoeveel handelingen maximaal bij elk dier zouden kunnen voorkomen. Graag dit verhelderen, eventueel in tabelvorm.

5) Onder vraag L van de bijlagen beschrijft u dat de dieren gedood worden omdat "Animals are specifically bred for this procedure and they cannot be used for another type of experiment". Het is niet duidelijk wat hiermee bedoeld wordt aangezien de muizenstammen die u gebruikt in onze visie wel voor andere typen onderzoek gebruikt zouden kunnen worden. Graag dit verhelderen.

6) In bijlagen 3.4.4.1 en 3.4.4.2 beschrijft u een voorkeur te hebben voor vrouwelijke dieren. Aangezien uw belangrijkste doelcategorie van het project translationeel onderzoek is, en kanker bij de mens in beide geslachten voorkomt, lijkt het gebruik van beide geslachten wenselijk (m.u.v. de geslachtsspecifieke tumoren uiteraard). Indien onvoldoende helder is waarom geen gebruik gemaakt wordt van beide geslachten, kan de CCD hier een voorwaarde over opnemen die gebruik van beide geslachten voorschrijft. Kunt u helderder aangeven waarom u toch voor vrouwelijke dieren kiest en hoeveel extra dieren het gebruik van beide geslachten zou kosten als gevolg van de grotere spreiding?

7) Bijlage 3.4.4.3 beschrijft oefenen van technieken en in bijlagen 3.4.4.1 en 3.4.4.2 wordt beschreven dat er jaarlijks nieuwe modellen worden ontwikkeld. Het onderscheid in modelontwikkeling en oefenen van technieken lijkt in de beschrijving een beetje door elkaar te lopen. Als bijlage 3.4.4.3 alleen om training van de technieken gaat, is het niet helder waarom in bijlage 3.4.4.3 gekozen kan worden voor het in leven laten van de dieren tot 16 weken, met potentieel ernstig ongerief. Wanneer het enkel gaat om oefenen van technieken zouden de dieren ook eerder kunnen worden gedood. Zoals het nu beschreven staat lijkt dit dus ook op modelontwikkeling. Om een en ander te verhelderen zou u, indien nodig, ervoor kunnen kiezen om alle modelontwikkeling en training in bijlage 3.4.4.3 te beschrijven.

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.

Datum:

14 april 2017

Aanvraagnummer:

AVD2440020171264

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:

14 april 2017

Aanvraagnummer:

AVD2440020171264

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.

Bijlagen:

- Melding bijlagen
- Niet technische samenvatting

Date: 20 april 2017
Letter and reply project application AVD2440020171264

Dear CCD,

Thank you for your review and your remarks on the application. Below you can find your questions in black and the answers in blue. The adaptations in official application forms we made **in red** (except for the NTS), to provide good insight into the changes in response to your remarks and questions. Since we have in the Animal Welfare Body of Genmab English speaking people, we answered your questions in English, because of our internal reviewing process.

Hopefully this provides you a good insight and helps you further in your reviewing process.

Best regards,
AWB Genmab.

Questions and Answers:

Niet technische samenvatting

De NTS bevat enkele voor het brede publiek moeilijk te begrijpen termen, zoals recombinante antilichamen en imaging. Graag hier in de NTS andere termen voor gebruiken of de termen (kort) uitleggen. Daarnaast is in 3.5 niet helder hoeveel dieren licht, matig dan wel ernstig ongerief zullen krijgen. Graag dit verhelderen.

The NTS is adapted,

We adjusted the term "recombinant antilichamen" to: *"antilichamen, die in het laboratorium specifiek gemaakt zijn om de kankercel te herkennen"*

We adjusted section 3.5, changed the term imaging to *"tumor volume metingen onder anesthesie"*, and made the description of the discomfort of the total animals more clear as follow:

"Dieren die sterk geremde of geen tumor ontwikkeling laten zien zullen een licht ongerief ondervinden. Dit wordt verwacht in 20% van het totaal aantal dieren.

Het grootste deel van de dieren (77%) zal matig ongerief ondervinden door tumorgroei gerelateerde ontwikkelingen, door herhaaldelijke tumorvolume metingen onder anesthesie, of bij herstel uit een operatie onder anesthesie.

In sommige gevallen, bijvoorbeeld bij een snel groeiende tumor, of bij het oefenen van nieuwe technieken kan het ongerief op ernstig uit komen. We schatten in dat dit ongeveer bij 3 % van de dieren kan voor komen"

Onduidelijkheden

1) U heeft als doelcategorie translationeel of toegepast onderzoek aangekruist. Naar ons idee beschrijft u in uw aanvraag ook fundamenteel onderzoek (MoA studies bijvoorbeeld) maar ook onderwijs/opleiding (bijlage 3.4.4.3). Graag deze doelcategorieën toevoegen aan projectvoorstel en NTS of onderbouwen waarom u niet voor deze categorieën gekozen heeft.

We indicated "translational research" since this is the general goal of the whole project application. But the CCD is correct that we also perform animal studies to analyse mechanism of action of the antibodies. Also, we do use animals specifically for training purposes as indeed is described in 3.4.4.3. Therefore, we follow the advice of the CCD and mark the category "Basic research and Higher education" as well as "Translational or applied research". We have adjusted this in the project proposal and in the NTS.

2) In bijlagen 3.4.4.1 en 3.4.4.2 beschrijft u hergebruik van dieren voor meerdere doeleinden. Er is sprake van hergebruik van een dier wanneer voor een vervolgprouf in plaats van het betreffende dier evengoed een ander dier gebruikt kan worden. De voorbeelden die u noemt (re-challenge experimenten en resistance studies) vallen hier niet onder omdat hier niet een willekeurig ander dier voor gebruikt zou kunnen worden. Graag dit aanpassen.

Thanks for this advice, we did not realize this.

In both 3.4.4.1 and 3.4.4.2 we adjusted in 'C' the sentence into the following: *'Most mice/rats will not be re-used.'*

However, in some experiments we may consider to use some animals for training purposes (injections mainly) before the animals will be euthanized.

3) In de verschillende bijlagen beschrijft u een acclimatisatieperiode van tenminste 3 dagen. Algemeen geaccepteerd wordt een acclimatisatieperiode van tenminste 1 week. Graag dit aanpassen.

We have adjusted this in all three appendixes to 1 week.

4) In de bijlagen 3.4.4.1 en 3.4.4.2 beschrijft u een aantal handelingen die mogelijk bij de dieren zouden kunnen worden toegepast. Het is niet helder in welke combinaties deze handelingen zouden kunnen voorkomen en hoeveel handelingen maximaal bij elk dier zouden kunnen voorkomen. Graag dit verhelderen, eventueel in tabelvorm.

To make this more clear, we created a table in which we indicated the different handling steps needed in the most typical tumor models/procedures we are intending to perform within the different animal procedures.

Please see Addenda: 5e 2017.II.400.006 Table 2 overview handling different model types

5) Onder vraag L van de bijlagen beschrijft u dat de dieren gedood worden omdat "Animals are specifically bred for this procedure and they cannot be used for another type of experiment". Het is niet duidelijk wat hiermee bedoeld wordt aangezien de muizenstammen die u gebruikt in onze visie wel voor andere typen onderzoek gebruikt zouden kunnen worden. Graag dit verhelderen.

We meant that these animals are only used for this experiment and not for other experiments. This is because almost all mice or rats receive tumor cells in our experiments, and it is not justified to use the animals for follow-up experiments. All those animals are killed at the end of the experiment.

In all animal procedures we have changed the sentence in 'L' now to: "*Animals are specifically ordered for this procedure and they cannot be used for another type of experiment since they have been injected with tumor cells*"

6) In bijlagen 3.4.4.1 en 3.4.4.2 beschrijft u een voorkeur te hebben voor vrouwelijke dieren. Aangezien uw belangrijkste doelcategorie van het project translationeel onderzoek is, en kanker bij de mens in beide geslachten voorkomt, lijkt het gebruik van beide geslachten wenselijk (m.u.v. de geslachtsspecifieke tumoren uiteraard). Indien onvoldoende helder is waarom geen gebruik gemaakt wordt van beide geslachten, kan de CCD hier een voorwaarde over opnemen die gebruik van beide geslachten voorschrijft. Kunt u helderder aangeven waarom u toch voor vrouwelijke dieren kiest en hoeveel extra dieren het gebruik van beide geslachten zou kosten als gevolg van de grotere spreiding?

We understand the remark from the CCD to use both male and female animals, since our focus of the experiments is "translational research". It is indeed the case that there are differences in both genders of the mice, as is described in several publications. However, it is under debate that the sex difference in mice is directly translatable to human diseases or results into a better translation into clinical studies.

A very interesting article on this topic "How Much Do Sex Differences Matter in Mouse Studies?" has been published very recently by Joshua A. Krisch in The Scientist (24 Feb 2017) (<http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/48616/title/How-Much-Do-Sex-Differences-Matter-in-Mouse-Studies-/>). This article exactly describes the issues we are struggling with to use both genders in our studies. To perform analysis on both sexes, you need double amount of animals and, thereby, this doubles your effort, doubles your time and doubles the costs. And, this investment does not automatically provide us with good arguments that this strategy leads to a better translation into human studies. Besides this (and already discussed in the application), females are much easier to handle and are less aggressive, whereby separate housing can be avoided, which is often the case by male animals and leads to real stress for the animals. In addition, we have a rather long experience of tumor models using only female mice. By restricting to one gender and thereby avoiding additional variation in our study set up, allows us to better design the group size in our tumor models by taking all the 3R's into account.

However, as suggested by you (the CCD) it can be argued to do the experiments in both sexes, since also cancer appears in both males and females. By just doing this in several tumor models, we can learn from this and try to get more insight if there is a difference between the genders with respect to translation to human studies, as is discussed in the article mentioned before as well.

Considering all this, we want to follow the CCD's suggestions and intend to establish in the coming 5 years several tumor models (3-5) in male mouse strains, some of which are in our laboratory already well characterized in female mice. Once established, we aim to compare the efficacy of several therapeutic antibodies in both sexes to learn about the possible (or lack of) differences with respect to antibody efficacy

We would like to incorporate these additional studies in to the procedures that we applied for. The design is comparable, only male mice are added as a variation. We do not want to mix the genders in one experiment, because we do not want to introduce additional variations within a single study since this can affect the scientific design and outcome of the studies significantly. Furthermore, both sexes in one study have influence on housing and randomization of the experiment and will complicate the design in an unnecessary way. To study the difference in sexes we should run same studies in parallel, one with male and one with female mice.

So, if the CCD wants us to perform a "duplicate" experiment we are open to setup at least 2 or 3 tumor models in male and female mice and explore potential differences in the results in these tumor models.

In animal procedures 3.4.4.1 and 3.4.4.2 we added the following sentence in B :

If the CCD approves, we are open to setup some tumor models in male mice as well and compare the sex difference with respect to antibody efficacy.

7) Bijlage 3 4.4.3 beschrijft oefenen van technieken en in bijlagen 3.4.4.1 en 3.4.4.2 wordt beschreven dat er jaarlijks nieuwe modellen worden ontwikkeld.

Het onderscheid in modelontwikkeling en oefenen van technieken lijkt in de beschrijving een beetje door elkaar te lopen.

Als bijlage 3.4.4.3 alleen om training van de technieken gaat, is het niet helder waarom in bijlage 3.4.4.3 gekozen kan worden voor het in leven laten van de dieren tot 16 weken, met potentieel ernstig ongerief. Wanneer het enkel gaat om oefenen van technieken zouden de dieren ook eerder kunnen worden gedood. Zoals het nu beschreven staat lijkt dit dus ook op modelontwikkeling. Om een en ander te verhelderen zou u, indien nodig, ervoor kunnen kiezen om alle modelontwikkeling en training in bijlage 3.4.4.3 te beschrijven.

We prefer to keep the 'practicing of animal procedures' separately described in 3.4.4.3, since the purpose is most different compared to the other appendices and it also includes only 3-5 animal per technician, which makes the scientific design of a practicing procedure very different.

With respect to the establishment of tumor models, this procedure is very comparable to the procedures described in 3.4.4.1 and 3.4.4.2. The only difference is the antibody treatment and the statistical analysis, which is not included in the establishment of the tumor models, for the rest it is the same. Therefore, we like to keep the description of 'tumor model establishments' in 3.4.4.1 and 3.4.4.2. We also indicated the handlings of the establishments of the tumor model in Table 2. Hopefully, this provides more insight in the handlings and leads to better understanding that it fits best in appendix 1 and 2.

The longer time period indicated in the practicing procedures of 3.4.4.3, had the purpose to check if the outgrowth of the tumor occurs in the right organ/location. When validating this we know that not only the handlings went well, but also the way of tumor cell injection in the correct organ.

We do, however, agree with the CCD that practicing of the handlings technique is the main purpose of this appendix and that observation up to 16 weeks is not necessary. In general, we will observe a tumor development within 1 month, Therefore, observation up to maximal 1 month, should be feasible to check the location of the tumor growth.

Therefore, we adjusted in 3.4.4.3 the '16 week period' to 1 month,

Since we will observe a shorter time period, it is not likely that the animals will reach the humane endpoint related to tumor growth and, therefore, mainly clinical signs will be in focus to check if abortion criteria are reached. Therefore, we adjusted part of the text in "J":

"We intend to stop most animals in this procedure directly after recovery of surgery. However, in some cases, if recovery is successful, animals will be euthanized as soon as we detect tumor appearance. If we observe tumor development, the location of the tumor will be checked and the animals will be euthanized. The maximum observation time is 1 month, if no tumor development is observed, the animals will be euthanized earlier.

Because of this rather short tumor procedure it is not likely that the animals will reach the humane endpoint related to tumor growth.

Humane endpoints in this procedure will therefore mostly be defined by clinical signs and body weight loss as described in point 1 and 2. However we cannot fully predict the timing of tumor take appearance, and since small tumors can also cause adverse effects we might encounter tumor growth related discomfort as well."

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.

We have checked the status of payment at our financial department and they indicated that the payment was performed on 12 April 2017. So, if correct, you should have it now available on your bank account. If you still have not received the payment, please, inform us, so we can check if something went wrong.



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.

[At our company we concentrate on the generation of new recombinant antibodies, and new innovative antibody formats for the treatment of cancer. We continuously invent and generate potential new antibodies and test these pre-clinically as well as evaluate those antibodies in clinical studies.](#)

Cancer is one of the leading causes of death in Western countries including the Netherlands. Many therapies are applied to combat this disease, such as radiation therapy, chemotherapy and immunotherapy. However, the complexity and heterogeneity of cancer contribute to the fact that not all patients respond to the therapy, or that the cancer returns after a number of years.

The last decade, immunotherapy is an expanding field in the treatment of cancer patients. It is a type of cancer treatment designed to boost the body's natural defenses to fight the cancer. It uses substances either made by the body or in a laboratory to improve or restore immune system function. For example recombinant antibodies for therapeutical use in patients with cancer and/or chronic inflammatory diseases have been proven to be very successful (Scott AM, Nature reviews, 2012).

Recently, the concept of immunotherapy is even appointed as the breakthrough in the treatment of cancer (E Goldin, Nature medicine 2013; J cousin Frankel, Science 2013), indicating the rapid movement of this field.

However, because of the heterogeneous characteristics of cancer, still a large number of cancer patients have to face the recurrence of cancer and thus improvement is still required. Though, according to the AACR Cancer progress Report 2016, several new medical products for the treatment of cancer have been approved by the FDA in the last years, it is expected that in the United States in 2016 nearly 600.000 patients will die from some form of cancer (Cancer Statistics 2016, Siegel RL et al, Ca Cancer J Clin, 2016). Therefore, development of new and modified improved antibody formats is a continuous urgent need to further enhance the efficacy and/or safety of these antibody drugs in patients.

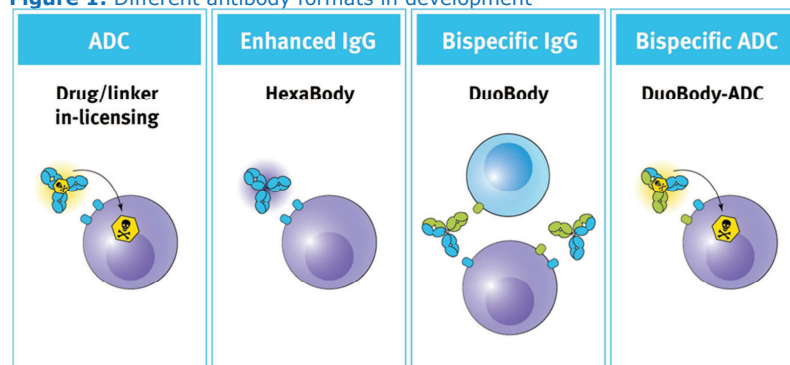
At our company we yearly evaluate, in a multidisciplinary team of scientific experts, a large number of novel potential cancer targets that are of interest for antibody targeting therapy. This is done by means of literature search, competitor landscape analysis, collaborations and in vitro studies. Of these targets only a few targets will be selected to start the generation of antibodies for. We have the objective to go forward with only the most promising cancer targets where we see the potential to create new innovative antibody formats for.

The final goal is to generate differentiated antibody therapeutics that are more potent and/or safer than antibodies/drugs currently in the clinic, and have potential to be best-in-class or first-in-class. These criteria will be taken along during the whole antibody selection procedure.

The number of new antibody targets taken into antibody development will differ per year, but will in general be 10-30 per year. This will be done with or without external collaborations.

The antibody formats to be applied to the cancer targets that are designed thus far, and currently in the development by our company are: 'Antibody Drug Conjugates' (ADCs), where a drug/toxin is coupled with a linker to the antibody; Enhanced IgG formats, where enhanced immune effector functions are established; bispecific IgG antibodies, where a dual targeting can be established; and 'bispecific-ADCs', bispecific antibodies with a drug linker (figure 1).

Figure 1: Different antibody formats in development



The following pre-clinical process includes intensive in vitro testing, such as binding characteristics and functional characteristics of the antibody that leads to the kill of the tumor cells or inhibition of tumor cell growth. Besides these initial in vitro processes needed for the first step of antibody characterization, in

vivo efficacy testing in tumor models and pharmacokinetic analysis in mice and rats are inevitable, since only animal studies reflect the complexity as seen in humans/patients.

Recent studies have revealed that new antibody formats can indeed be more potent for the treatment of some cancers compared to (antibody-) drugs already in the clinic. For example, antibody-drug conjugates (ADC), can be more effective in the inhibition of the tumor growth compared to the non-conjugated antibody, as has been demonstrated with Herceptin-DM1 which has been shown to be very effective in breast cancer patients [REDACTED]. Also our own preclinical findings show complete regression of several implanted human tumors, without significant side effects when using ADCs. [REDACTED]. Furthermore, there are strong indications that the use of other new antibody formats developed at our company, such as bispecific antibodies (DuoBody) or HexaBody, can strengthen the potency and specificity of antibodies for the treatment of cancer [REDACTED].

The research described in this project application focusses on the selection, research and evaluation of antibodies in tumor models in mice and rats and will be a direct continuation of our current research program ("Development of antibodies for therapeutic use: Research and evaluation on subcutaneous tumor models, optical imaging and imaging of subcutaneous tumor models in rodents). By performing these in vivo experiments we aim to get insight in

- the antibody drug efficacy in a "full body system"
- the mechanism of action of the antibody drug in vivo
- optimal dosing of the antibody drug
- Timing and location of activity of the antibody drug
- The tumor type/indication most suitable for the application of the antibody drugs

To explore this, we require a diversity of specific in vivo tumor models to allow the analysis and evaluation of the different antibody-drugs. The specific models will be set up and designed, based on the antibody format, the molecule and the cancer type that is targeted by the respective antibodies.

Parallel to the studies described in this project application, we are studying related processes which are part of a successful antibody generation, like immunizations in rodents and pharmacokinetic studies. [These related processes are described in two different parallel project applications: "Investigation of pharmacokinetics of antibody formats in rodents" and "Immunization of rodents \(transgene for human IgG\)".](#)

In short: selection, research and evaluation of the efficacy of new antibodies or antibody formats in a diversity of specific in vivo tumor models is very important for the development of therapeutic antibodies and will give us insight into the mechanisms of actions of these drugs. This will help us to translate and predict the potency of these antibody drugs in cancer patients much better and will help us in the design of clinical trials leading to an improved benefit for cancer patients in the future.

3.2 Purpose

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

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

The main objective of the study described in this application is selection, analysis and evaluation of therapeutic antibodies by evaluating anti-tumor efficacy in a diversity of in vivo tumor models in mice and rats.

The need for such studies is elementary for moving the best antibody candidate forward and bringing a new medicine successfully to the clinic as we have done for several antibodies (such as an anti-CD20 antibody ([Arzerra®](#)), for the treatment of chronic leucocyte leukemia, and for an anti-CD38 ([Darzalex®](#)), for the treatment of multiple myeloma).

3.3 Relevance

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

Evaluation and research of new antibodies drug candidates or new antibody formats in mice or rat tumor models will give insight in the mode of action of the drugs.

Furthermore, by analyzing the different animal tumor models described in this application, we will gain understanding in the use of these different tumor models in antibody therapy and the translatability into cancer patients. Each tumor model type will have its own characteristics, advantages and disadvantages and by studying this (for examples by taking out the tumor and explore the target expression or the immunological cell content) we will gain insight into these models, which will help to refine the design of future tumor models and clinical trials for cancer patients.

Scientific relevant findings will be communicated to collaborators and/or published at specific conferences and/or in scientific magazines.

3.4 Research strategy

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

Before in vivo studies will start, an intensive selection process is performed on a large antibody panel by means of in vitro assays determining the specific target binding and functional activity. Only a small number of the best antibodies will move forward and will be selected for further in vivo research, such as anti-tumor efficacy studies.

Several in vivo animal tumor model studies are needed in different stages of the development process of therapeutic antibodies to address different research questions:

[REDACTED]

Depending on the molecule and the cancer type that the antibody targets and the mechanism of action of the antibody format (ADC, DuoBody, HexaBody, or others) a diversity of specific in vivo tumor models will be designed, set up and evaluated as is described in 3.4.2 and in both appendices animal procedures.

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.

All models described in this project application are animal tumor models.

Based on the general outline of the experimental design of each individual animal experiment, the tumor model described in this application is divided in 2 different animal procedures.

The majority of tumor model experiments [REDACTED] will be performed as the animal procedure: "subcutaneous tumor models". The remainders of the experiments that will be performed fall under the second animal procedure: "orthotopic tumor and metastasis models".

A short description of the two animal procedures is described below. A detailed description can be found in the two independent appendices of the animal procedures:

- 1) Animal procedure 1: Subcutaneous tumor models:
Subcutaneous injection of tumor cells/fragments in mice or rats followed by tumor volume measurements by Caliper and optional with imaging techniques*

2) Animal procedure 2: Orthotopic tumor (injection of tumor cells at the organ of the cell's origin) and metastasis models:

Different ways of tumor cell injection will be applied in this procedure:

- a) Orthotopic tumor cell inoculation without surgery:
Injection of tumor cells in easy accessible organs such as in the mammary gland (subcutaneously into the fat pads), or dermis (intradermally)
- b) Orthotopic tumor cell inoculation with surgery:
Direct injection of tumor cells in respective organs after opening of the animal's body, (such as pancreas, ovarium, prostate, etc.), or indirect injection (in some incidences) into organs (such as intra-splenic or portal vein injection (imaging* and/or scoring of tumor loci and/or resection and weighing of tumor in the liver).
- c) Intravenous tumor cell inoculation: Injection of tumor cells into the tail vein. This injection method does not need surgery or anesthesia.
- d) Intracardiac tumor cell inoculation: Injection of tumor cells into the left ventricle of the heart.
- e) Intraperitoneal tumor cell inoculation: Injection of tumor cells into the peritoneal cavity.
In this procedure, tumor development will be mainly followed by imaging* and/or alternatively by caliper measurement and/or scoring of tumor loci and/or resection and weighing of tumor.

*Imaging techniques can include: bioluminescence or fluorescence, radioactivity, CT/PET/SPECT in combination with labeled cells or antibodies or tracers/proteins.

In all these animal procedures three different types of models can be selected based on the antibody target and antibody format:

- Xenograft models: in which mostly human tumor cells/fragments will be implanted in mice or rats.
- Syngeneic models: in which the tumor to be injected as cells or fragments, as well as the host are from the same species/strain (mouse or rat)
- Humanized models: In which the immune system of the mouse or rat is "humanized", such as:
 - Engraftment models with human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)
 - CD34+ Hematopoietic Stem cell (HSC) reconstituted humanized
 - Genetically engineered mouse (and rat) models (GEMMS)

Based on the research strategy, antibody target and antibody format, the most optimal model will be selected.

3) Animal procedure 3: Practicing of techniques for Orthotopic tumor and metastasis models:

In case of new models have to be established for the orthotopic tumor and metastasis models that include surgery or intracardiac injection, we expect the need for practicing to optimize the success rate of the model establishment and antibody efficacy testing in these tumor models.

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.

We make selections of the animal procedures and models described in paragraph 3.4.2 [mainly dependent on the antibody target and on the cancer type where the tumor antigen is expressed \(see in figure 2\)](#).

Fig 2a: 

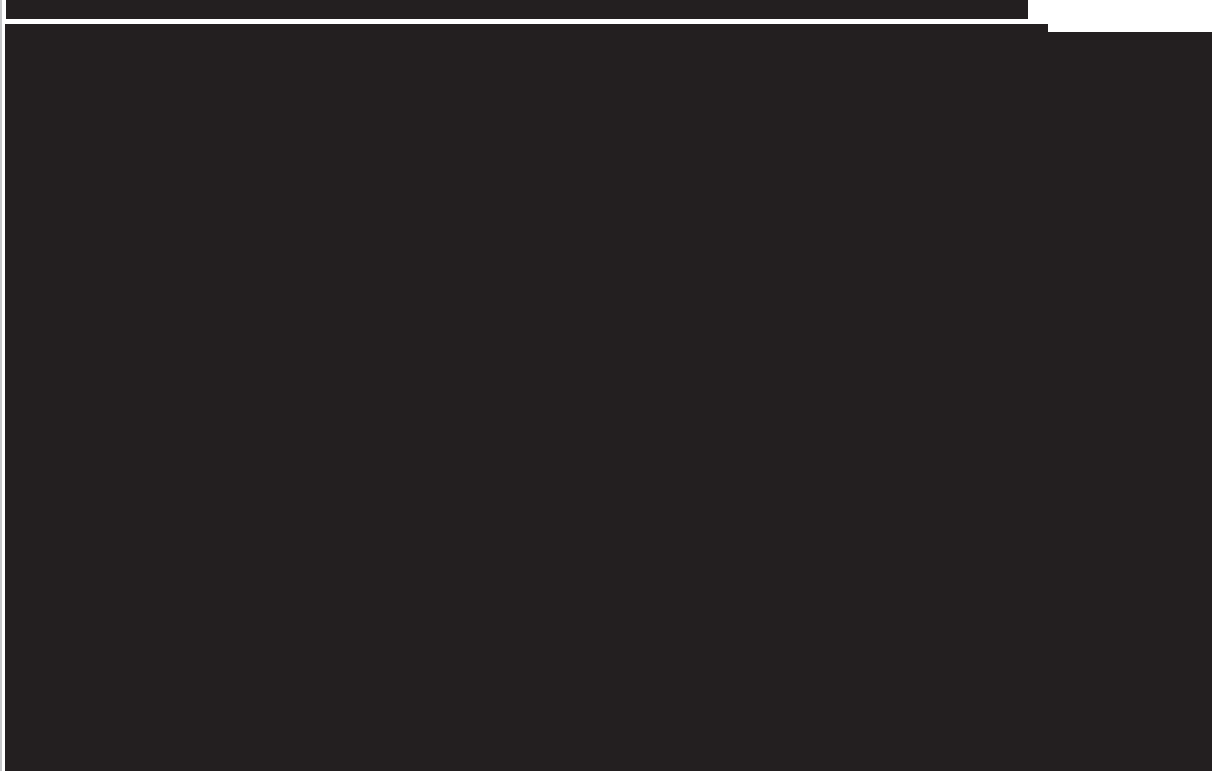


Fig 2b: 



The outcome of the animal tumor model studies will give us insight and knowledge on the activity and mechanism of action of the drug and will be an important step in the decision making process. Based on this, decisions will be made to either progress the antibody drug candidates forward in the development process, or to be put on hold.

Furthermore, these animal tumor model experiments are very important in the clinical trial design with respect to indication/cancer type selection, dosing and the possibility of biomarkers analysis.

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 | Subcutaneous tumor models |
| 2 | Orthotopic tumor and metastasis models |
| 3 | Practising of techniques for orthotopic tumor and metastasis models |
| 4 | |
| 5 | |
| 6 | |
| 7 | |
| 8 | |
| 9 | |
| 10 | |

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

To get an indication for the proper group sizes per study a power/sample size analysis has been done based on the tumor volumes, since the research described in this application indicates "tumor volume" as the primary parameter for tumor burden, a continuous variable readout, calculated on the basis of measurements with (digital) calipers in two dimensions.

Power and groups size analysis:

[Redacted text]

[Redacted text]

Group size selection:

Based on the power analysis described above we want to select the following group sizes:

- [Redacted list item]

[REDACTED]

In the group size selection, the scientific outcome and the total number of animal is always taken into consideration.

In all models where antibody treatment is applied and tumor volume will be the primary readout, the relative T/C (tumor volumes of treated animals over control animals values) and "tumor growth inhibition" (TGI) values will be calculated.

Statistical analysis

In general and if possible, a standard statistical analysis will be as much as possible applied as follows:

[REDACTED]

This analysis can be adapted in the future when new insights appear.

In case of only establishing a new subcutaneous tumor model statistical analysis is not applied, since treatment is absent in these studies.

B. The animals

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

We expect to have an average of [REDACTED] antibody projects active per year, for which we perform in total an

average [REDACTED] experiments per year. This includes establishment and efficacy testing studies in both animals procedures described in animal procedure I: subcutaneous tumor models as well as the animals experiments described in animal procedure II: orthotopic tumor and metastasis models. (see also [Addenda overview table 1 animals](#))

Within this animal procedure I (s.c.tumor models) we expect to perform [REDACTED] experiments per year [REDACTED] models for efficacy testing [REDACTED] models to be established).

In average we expect to use [REDACTED] animals per efficacy testing experiments for the s.c. tumor models, and [REDACTED] animals per new model to be established [REDACTED] animals per year. Establishment of new subcutaneous tumor models in general requires less animal per experiment [REDACTED] experiment) we expect the development [REDACTED] models per year. Which is [REDACTED] animals per year.

This will lead to the final use within this animal procedure I to a total of [REDACTED] [REDACTED] Of this it is anticipated to need [REDACTED] in the coming 5 years.

There is extensive experience in tumor models in mice and rats which allows translation of the potency of a novel drug to human patients.

For the animal studies described in this application we intend to use different mouse or rat strains

In most of our studies we aim to test antibodies specifically targeting (human) tumor antigens, where human tumor cell lines (or fragments) need to be used for implantation. In order to prevent rejection of the tumor cells, it is necessary to use immune deficient mice and rats. We most frequently use CB17 SCID or nude mice. Both, nude and CB17 SCID mice, lack the T-cells subset allowing a better tumor outgrowth. CB17 SCID mice, in addition, have no B-cells meaning they also have no mouse IgG. For the rats we mostly use athymic nude rats.

Immune competent mice (mostly BALB/c or C57bl/6) will be used for syngeneic tumor models, where it is important to study the tumor microenvironment. At this moment it is well known that the tumor microenvironment is important for the development of the tumor, and by targeting this environment (for example with a specific antibody) it can lead to tumor growth inhibition. In these cases it is important that the antibody used also recognizes the murine targets. Depending on the origin of the murine tumor cell line the right strain for the respective model needs to be chosen.

NOD SCID mice lack T-cells in addition to B-cells, and also functional macrophages, complement components, as well as functional Natural Killer cells. Therefore, these mice are often used to study bispecific antibodies in which one part is directed against the human target on the tumor cell and the other part is focused on the human immune cell. In these mice, human immune cells will be co-transplanted subcutaneously together with human tumor cells. That allows the efficacy testing of a bispecific antibody targeting the human immune cells and the human tumor cells in an in vivo setting as described in (Labrijn et al, PNAS, 2013). For these studies even mice with additional immune deficiencies such as NSG/NOG or BRGS mice can be used as well.

The use of NSG or NOG (NOD-SCID IL-2Rg^{-/-}), but also BRGS mice and NOD SCID mice are described for experiments in which human blood cells are intraperitoneally or intravenously implanted. All these mice are immune deficient, lack B-, T- and NK-cells, and have defects in macrophages. When PBMCs are inoculated in these mice, the human T-cells are the most expanding human cell population and can be used for T-cell targeting drugs, which is nicely shown by Bacac M *et.al.* (Clin Can Res, 2016) The NSG (and the BRGS mice) or derivatives hereof are used for the already mentioned CD34+cell HSC-His model allowing the expansion of a diversity of human immune cells in these mice (Legrand, PNAS, 2011). These Human Immune System (HIS)-mice will be used in experiments where the tumor microenvironment needs to be studied or when a mechanism of action of the drug includes activation or inhibition of the human immune cells or the tumor microenvironment (Morton et al, Cancer Res 2016).

Rat xenograft models using athymic nude rats are mostly used for experiments (e.g. in biomarker

studies) when repetitive blood samples are required in amounts impossible to get from single mice. Athymic nude rats do not have T cells and allows the outgrowth of implanted human tumor cells, although in many cases a pre-treatment with cyclophosphamide or irradiation might be needed for a proper tumor outgrowth with an acceptable variation. In addition, for the evaluation of novel antibody formats rat models might be of interest because the complement system in rats allows a better ex vivo analysis since the complement components seem much more stable.

We have a strong preference for the use of female mice, because it has been shown that male mice have a different activity in the innate complement system than female mice (Beurskens F et al, Clin Exp Biol, 1999) and this may influence the effectiveness of the antibodies. To minimize the variation within a single test and between different tests (intra- and inter-variation) we prefer to be limited to one gender. This allows a more accurate statistical analysis and can lead to the use of fewer mice per group. In addition, we prefer females because these are easier to accommodate (less mutual aggression) than males and are easier to regroup. We want to avoid to house animals alone in one cage because of aggressiveness, which is often the case with males.

However, we do include in some experiments a mixture of males and females, for example the HIS mice are both male and female since these animals are seen as individuals and will be analyzed on a more individual basis. Furthermore, sometimes we have experiments with males only, for example when we want to study the efficacy of our antibodies in prostate cancer.

If the CCD approves, we are open to setup some tumor models in male mice as well and compare the sex difference with respect to antibody efficacy

In general we use mice at an age between 5 and 14 weeks old. Young mice normally have a much better tumor take rate. Per experiment we try to keep the mice in an age difference of maximal 2 weeks, since a higher difference might lead to difference in tumor outgrowth. However, sometimes we are restricted to a certain age of the mice because of technical feasibilities. For example humanized NSG or BRGS mice are somewhat older before tumor cell injection, since first the human immune system has to be established, which can take up to 12-14 weeks.

For each animal experiment it will be carefully considered which background, strain, gender and age is required for having an optimal or most translatable readout for the research question to be addressed in that particular experiment and the efficacy of an antibody drug.

In the future other or new mice and rat strains might be developed that allow better engraftment of tumor cells and/or humane immune cells, and might be used in the animal studies as well.

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.

Most mice/rats will not be re-used.

However in some experiments we may consider to use animals for training purposes or follow up experiments, before the animals will be euthanized

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,

In vitro studies to analyze the binding properties of the antibodies to the tumor target and to test their

functional anti-tumor activity will always be performed before the start of any in vivo experiment. This allows a first scaling down step of the antibody panel. However in vitro data only will not give an exclusive and complete insight into the anti-tumor efficacy of the antibody of interest. Testing the efficacy of antibodies in in vivo tumor models represents a more complex system which is more comparable to the tumor of the patient and allows the influence of additional factors, such as blood supply, the tumor microenvironment and the contribution of the immune system to the efficacy of the antibody drug. This results in a better and more complete overview on the efficacy of the drugs and allows a better translation to the use in cancer patients.

Reduction,

All the individual tumor models are carefully designed. The variation of the tumor growth (homogeneous or heterogeneous), the predicted efficacy of the drug, and the research question is always taken into account. At each experiment a well thought experimental design is made in which a good scientific outcome is balanced to the total number of mice used in the experiment. This is supported by a power analysis and suggested group sizes described in 2A.

Furthermore bio-distribution of the antibody of interest to the site of the tumor is also very important for the final efficacy of the drug and can only be determined in in vivo settings. To support this feature the pharmacokinetics of the antibody drugs is studied using a parallel project application which in general uses less mice than a tumor model experiment. Using these data we can detect very well the half-life of the specific antibody in circulation. And together with in vitro data we can better predict the effective dose in the tumor models described in this application. Overall following this strategy, this will lead to the use of fewer mice.

Furthermore, we are intensively involved in setting up alternative model systems such as [REDACTED]. In the coming years new techniques will be developed and evaluated if these techniques can successfully replace, refine or reduce the use of animal experiments. However, to explore this, in the first coming years we expect the need of several animal tumor models to evaluate the applicability of the alternative model systems

Refinement

We put a lot of effort in the refinement of the animal tumor models. By having dedicated people we observe, learn and adjust in consecutive studies, so that we know what to expect and in cases of (unexpected) discomfort we can determine how to act to prevent the animals from reaching the "Human End Point" (HEP).

For the maximal tumor size in mice the code of practise "animal experiments in cancer research" (Inspectie W&V, Zutphen/The Hague 1999) describes a tumor volume of 2000 mm³. In our studies we intend to euthanize the mice when a tumor volume above 1500 mm³ is reached. In this way we reduce the discomfort of the mice due to a large tumor size. Also in case of tumor growth in rats, we will euthanize as much as possible the rats before the suggested HEP of 40 cm³ or a diameter of 4.2 cm in the code of practise.

With respect to the appearance of ulcerations at the site of the tumors our team has made an instruction guide how to act and how to handle in case an open wound is observed. This has been discussed extensively within our Animal Welfare Body and is communicated and instructed to the responsible animal caretakers as well. See Addendum III "tumorgroei gerelateerde verschijnselen")

Finally, we make sure that our dedicated personnel remains skilled and will, therefore, be trained regularly, by participating in courses or to learn new techniques in house. Most handlings described in the project applications are standard techniques, and in cases when new techniques need to be learned we prefer to first practise on dead or terminal animals under anaesthesia.

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

The following measures will be taken to minimize the tumor model related discomfort

- 1) Intensive observation for clinical signs (like abnormal behaviour, posture and appearance) will be done 1-2 times a week, and increased to 3 times a week in periods were we can expect discomfort.
- 2) 1 to 3 times a week tumor volumes will be measured and when tumors are above 1500 mm³ the mice will be euthanized, to prevent as much as possible that animals reach the human endpoint of 2000 mm³.
- 3) In case of models that show a wound at the location of the tumor, observation is intensified or preliminary stopped before severe ulcerations appear.
- 4) Body weight measurements are included in all experiments were discomfort is expected or when it is unknown.

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 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.

The pain and discomfort induced by the anaesthesia is of higher discomfort then the tumor cell and antibody injection.

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

- In cases were imaging or a terminal hart puncture is applied, the animals will first receive anaesthesia.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

In some humanized mice models which are adjusted with humane immune cells, we can expect "Graft versus Host Disease"

Explain why these effects may emerge.

- In these models human PBMCs are injected i.p. or i.v., the human T-cells are the most expanding human cell population. The cytotoxic T-cells then recognize the mouse as non-self and can react with the murine body cells. This graft versus host reaction can be observed by clinical signs such as abnormal behaviour, posture and appearance and can be expected 4-6 week after i.p. or i.v. injection of human PBMCs.
- When the PBMCs are subcutaneous co-injected with the tumor cells, only in a few cases these clinical signs are observed. And a graft versus host reaction can be recognized occasionally in these incidences as well.
- When CD34⁺ hematopoietic stem cells are implanted in young mice (of 1 -3 weeks old), the human immune cells will be trained in the thymus to recognize the mouse cells as "selves" and, therefore, no graft versus host reaction (or only at a very minimal level) will appear in these mice

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

In the period of expected graft versus host reaction, observation will be increased and if possible mice will be preventively euthanized before reaching this point.

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.

Since tumor cells/fragments are implanted in the mice/rats, we can expect tumor growth-related adverse effects, which can lead to tumor related humane endpoints. We use the following humane endpoints as guidance:

1. A large tumor volume is a specific humane endpoint in these studies and will be monitored by caliper measurements throughout the whole study: According to Code of practice animal experiment in cancer research) HEP tumor volume = 2000 mm³ for mice, and 40 cm³ or a max diameter of 4.2 cm in rats. However in most cases we stop the mice when tumor volumes of > 1500 mm³ are reached
2. Ulcerations at the site of the tumor, are a specific HEP in these studies.
3. Body weight loss (> 20%)
4. Clinical signs such as abnormal behaviour, dyspnea (difficulties with breathing), salivation, no response on incentives, apathy, involuntary shaking of the body or limbs (tremor), convulsion (where the body muscles contract and relax rapidly and repeatedly), self-mutilation, piloerection, abnormal non-physiological posture, paralysis, severe Diarrhea. The level of severeness of these clinical signs can be used to determine if the humane HEP is reached.
5. Graft versus Host Disease (see I)

When a HEP is reached animals will be taken out of the study and will be prematurely euthanized in most of the cases. In some cases where we observe in an early time-point of the study an (unexpected) adverse event close to HEP we might consider to leave the animals in the study for a very short time (1-3 days) because a repetition of the entire study would consume again several mice. In this case we will increase the observation rate, put them eventually in a separate warmed cage, and/or, when observing weight loss, give a subcutaneous PBS injection to recover body fluid. If after 3 days the animal still is not recovered, the rat/mice will be euthanized

Indicate the likely incidence.

Since we follow the tumor volume frequently, we can anticipate when the HEP with respect to tumor size will be reached. Therefore, only a minimal number of animals will reach the maximal tumor volume as humane endpoint.

In models in which we have intensive experience we do not expect that any of the animals will reach the humane endpoint. However, in models that have heterogeneous tumor growth and/or where we have less experience we can expect more mice to reach the humane endpoint.

Appearance of ulceration at the site of the subcutaneous located tumor is dependent on the tumor cell type, e.g. some tumor have more mucus production, appear therefore more tumid, and can cause irritation of the skin at the site of the tumor more severely than others. For most tumor models we know in advance that ulceration might occur, and we, therefore, can anticipate on the appearance of ulceration. In addition, at the moment when a wound is observed, the monitoring of the whole experiment will be intensified or when it has no impact on the scientific outcome, animals will be euthanized before a severe ulceration appears.

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 procedures have in general a moderate level of discomfort. In some cases where no tumor development takes place we can expect only mild discomfort and in some cases when animals reach unexpectedly the HEP the discomfort is higher. In a typical experiment we expect:

In 22% a mild discomfort

In 75% a moderate discomfort

In 3% a severe discomfort

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 are specifically ordered for this procedure and they cannot be used for another type of experiment since they have been injected with tumor cells

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

1. This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
2. A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
3. For more information, see our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
4. 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'. | 24400 | |
| 1.2 Provide the name of the licenced establishment. | [REDACTED] | |
| 1.3 List the serial number and type of animal procedure. | Serial number | Type of animal procedure |
| | 2 | 1. Orthotopic tumor and Metastasis models |

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 here described animal procedure includes tumor models with orthotopic implantation and other metastasis models of human or murine tumor cells mainly, or in some cases patient derived tumor material from approved sources (like CROs) in:

1. Xenograft models (human tumor cells/fragments in mice or rats),
2. Syngeneic models (murine tumor cells/fragments in mice or rats), or
3. Humanized models (human tumor cells/fragments in mice or rats), mice harboring part of the human immune system (HIS). Examples of HIS mouse are:
 - Subcutaneous co-engraftment with human immune cells (f.e. human PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells))
 - intraperitoneal or intravenous engraftment with human immune cells (f.ePBMCs)
 - CD34⁺ Hematopoietic stem cell (HSC) reconstitution in young immunocompromised mice. Mice will then be purchased as fully humanized animals.
 - Human Transgenic models (mice will be purchased from appropriate sources)

Within this animal procedure different methods for tumor cell inoculation can be used to allow orthotopic tumor growth or metastasis formation as indicated below from a) to e):

a) Orthotopic tumor cell inoculation without surgery:

Breast cancer cell lines can be implanted subcutaneously into the "fat pads" of mice which represent the mammary glands of mice or rats. For melanoma models the tumor cells can be implanted directly intradermally. This organ specific injection route can in some cases lead to metastasis in other organs. These implantation methods do not need a surgery involving anesthesia.

b) Orthotopic tumor cell inoculation with surgery:
Cancer models, like those derived from pancreas, prostate, kidney, ovary, colon, or other solid cancer forms, need a surgery to get access to the organ of interest in order to establish successfully an orthotopic tumor model in mice or rats. This organ specific injection route can in some cases lead to metastasis in other distant organs. These implantation methods do need anesthesia and in most cases pain relieving methods as well.

c) Intravenous tumor cell inoculation:
Injection of tumor cells in the bloodstream can lead to metastasis formation in different organs. For leukemic cells this often leads to homing and metastasis in different organs and is also known as "a disseminated tumor model". When intravenous injection in the tail vein is applied for other, mainly "bigger" solid cancer cell, the tumor cells home into the lungs and can be used as a lung metastasis model. This injection method does not need surgery or anesthesia.

d) Intra-cardiac tumor cell inoculation:
Injection of tumor cells into the left heart ventricle can be applied when metastasis to different organs is of interest and when metastasis mainly into the lungs needs to be avoided. This method does not include surgery, but intra-cardiac injection needs the use of anesthesia.

e) Intraperitoneal tumor cell inoculation:
This method can be selected when the influence of the peritoneal microenvironment needs to be studied. In that case for example gastric cancer cells or alternative cell will be implanted intraperitoneally. This injection method does not need surgery or anesthesia.

In general, after tumor cell inoculation, the antibodies of interest (antibody variants, - formats, Antibody Drug Conjugates (ADCs), etc. or combinations hereof) will be administered with or without a combination of cytostatics or other anti-cancer agents in these models. Tumor growth (in mm³) will be followed in time by imaging (bioluminescence/fluorescence) or alternatively by Caliper measurements, or a combination hereof. "Tumor volume" measured by imaging or by caliper will be the primary readout parameter. Differences in tumor volume, growth rate, tumor growth inhibition or tumor regression induced by the antibody variants compared to the control group and to each other will be addressed in these studies. The outcome will be supported by statistical analysis, where possible, as indicated below.

Secondary parameters may include blood, tissue or tumor analysis. In some models these secondary parameters can be regarded as primary readout parameters. For example in vivo tumor models where circulating blood biomarker analysis is important in relation to the antibody drug. Or in tumor models, where the effect of the antibody on the tumor microenvironment is an important mechanism of action. In these experiments tumor tissue collection and analysis will be used as primary readout parameter. But in all studies tumor volumes will be measured.

In case new orthotopic or metastasis tumor models have to be set up, only the tumor development is addressed with respect to tumor take, growth rate and variation. The purpose of these establishment studies is the determination of the tumor cell inoculation conditions.

Procedure will be the same as describe below, except for the antibody treatment.

When more complex orthotopic or metastasis models have to be established, such as tumor cell inoculation procedures with surgery or by intracardiac inoculation, we expect the need for practicing upfront establishment of the specific tumor model. This is described in appendix 3.

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

For each animal experiment described in this animal procedure: "orthotopic tumor and metastasis models", the following steps will be taken:



| [Redacted line of text]

[Redacted line of text]

[Redacted line of text]

| [Redacted line of text]

| [Redacted line of text]

| [Redacted line of text]

| [Redacted line of text]

| [Redacted line of text]

| [Redacted line of text]

| [Redacted line of text]

| [Redacted line of text]

| [Redacted line of text]

| [Redacted line of text]

[Redacted line of text]

[Redacted line of text]

[Redacted line of text]

[Redacted line of text]

[Redacted line of text]

[Redacted line of text]

[Redacted line of text]

| [Redacted line of text]

[Redacted line of text]

[REDACTED]

- [REDACTED]
- [REDACTED]

[REDACTED]

- [REDACTED]

[REDACTED]

- [REDACTED]
- [REDACTED]

[REDACTED]

- [REDACTED]

[REDACTED]

- [REDACTED]

- [REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

* total blood sampling will not exceed the maximal limit. Methods for blood sampling include; submandibular vein puncture, vena sephena puncture, tail vein puncture or alternative approved/advised methods

A general experiment will take normally up to 16 weeks. However, depending on the efficacy of the drug, some animals can be studied for long term resistance, or development of immune memory. These studies can take maximally up to 52 weeks.

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

To get an indication for the proper group sizes per study a power/sample size analysis has been done based on the tumor volumes, since the research described in this application indicates "tumor volume" as the primary parameter for tumor burden, a continuous variable readout, calculated on the basis of measurements with (digital) calipers in two dimensions.

Power and groups size analysis:

[REDACTED]

[REDACTED]

[Redacted text block]

Group size selection:

Based on the power analysis described above we want to select the following group sizes:

- [Redacted list item 1]
- [Redacted list item 2]
- [Redacted list item 3]
- [Redacted list item 4]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

Statistical analysis

In general and if possible, a standard statistical analysis will be as much as possible applied as follows:

[REDACTED]

This analysis can be adapted in the future when new insights appear.

In case of only establishing a new orthotopic or metastasis tumor model statistical analysis is not applied, since treatment is absent in these studies

B. The animals

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

We expect to have an average of [REDACTED] antibody projects active per year, for which we perform in total an average of [REDACTED] experiments per year. This includes both animals procedures described in animal procedure I: subcutaneous tumor models as well as the animals experiments described in animal procedure II: orthotopic tumor and metastasis models. (see also Addenda Table 1: number of animals)

Within this animal procedure II (orthotopic tumor and metastasis models) we expect to perform [REDACTED] experiments per year. ([REDACTED] models for efficacy testing [REDACTED] models to be established).

In average we expect to use [REDACTED] animals per experiments for the orthotopic tumor and metastasis models, which will be [REDACTED] animals per year.

For the establishment of new orthotopic or metastasis tumor models we expect the use of [REDACTED] animal per experiment. We expect the development of [REDACTED] models per year. Which is [REDACTED] animals per year.

This will lead to the final use within this animal procedure to a total of [REDACTED] animals in 5 years. Of this it is anticipated to need [REDACTED] in the coming 5 years.

In addition we expect to need of [REDACTED] newly ordered animals per year for practising of the different techniques described in this project application, which will be [REDACTED] animals for practicing purposes only for the coming 5 years. We expect the need of [REDACTED] in total for practicing purposes. This is described in appendix 3: practicing of techniques for orthotopic and metastasis models.

There is extensive experience in tumor models in mice and rats which allows translation of the potency of a novel drug to human patients.

For the animal studies described in this application we intend to use different mouse or rat strains

Especially for orthotopic and metastasis models and/or where imaging is applied we will use mouse and rat strains recommended in the literature for a particular orthotopic/metastasis model, or will use animal strains we have experience with (see below). For syngeneic models we have to use the strains where the cells originated from.

In most of our studies we aim to test antibodies specifically targeting (human) tumor antigens, where human tumor cell lines (or fragments) need to be used for implantation. In order to prevent rejection of the tumor cells, it is necessary to use immune deficient mice and rats. We most frequently use CB17 SCID or nude mice. Both, nude and CB17 SCID mice, lack the T-cells subset allowing a better tumor outgrowth. CB17 SCID mice, in addition, have no B-cells meaning they also have no mouse IgG. For the rats we mostly use A-thymic nude rats.

Immune competent mice (mostly BALB/c or C57bl/6) will be used for syngeneic tumor models, where it is important to study the tumor microenvironment. At this moment it is well known that the tumor microenvironment is important for the development of the tumor, and by targeting this environment (for example with a specific antibody) it can lead to tumor growth inhibition. In these cases it is important that the antibody used also recognizes the murine targets. Depending on the origin of the murine tumor cell line the right strain for the respective model needs to be chosen.

NOD SCID mice lack T-cells in addition to B-cells, and also functional macrophages, complement components, as well as functional Natural Killer cells. Therefore, these mice are often used to study bispecific antibodies in which one part is directed against the human target on the tumor cell and the other part is focused on the human immune cell. In these mice, human immune cells will be co-transplanted together with human tumor cells. That allows the efficacy testing of a bispecific antibody targeting the human immune cells and the human tumor cells in an in vivo setting as described in (Labrijn et al, PNAS, 2013). For these studies even mice with additional immune deficiencies such as NSG/NOG or BRGS mice can be used as well.

The use of NSG or NOG (NOD-SCID IL-2Rg^{-/-}), but also BRGS mice and NOD SCID mice are described for experiments in which human blood cells are intraperitoneally or intravenously implanted. All these mice are immune deficient, lack B-, T- and NK-cells, and have defects in macrophages. When PBMCs are inoculated in these mice, the human T-cells are the most expanding human cell population and can be used for T-cell targeting drugs, which is nicely shown by Bacac M *et al.* (Clin Can Res, 2016)

The NSG (and the BRGS mice) or derivatives hereof are used for the already mentioned CD34+cell HSC-His model allowing the expansion of a diversity of human immune cells in these mice [Legrand, PNAS, 2011]. These human immune system (HIS)-mice will be used in experiments where the tumor microenvironment needs to be studied or when a mechanism of action of the drug includes activation or inhibition of the human immune cells or the tumor microenvironment (Morton et al, Cancer Res 2016).

Rat xenograft models using athymic nude rats are mostly used for experiments (e.g. in biomarker studies) when repetitive blood samples are required in amounts impossible to get from single mice. Athymic nude rats do not have T cells and allows the outgrowth of implanted human tumor cells, although in many cases a pre-treatment with cyclophosphamide or irradiation might be needed for a proper tumor outgrowth with an acceptable variation. In addition, for the evaluation of novel antibody formats rat models might be of interest because the complement system in rats allows a better ex vivo analysis since the complement components seem much more stable.

We have a strong preference for the use of female mice, because it has been shown that male mice have a different activity in the innate complement system than female mice (Beurskens F et al, Clin Exp Biol, 1999) and this may influence the effectiveness of the antibodies. To minimize the variation within a single test and between different tests (intra- and inter-variation) we prefer to be limited to one gender. This allows a more accurate statistical analysis and can lead to the use of fewer mice per group. In

addition, we prefer females because these are easier to accommodate (less mutual aggression) than males and are easier to regroup. We want to avoid to house animals alone in one cage because of aggressiveness, which is often the case with males.

However, we do include in some experiments a mixture of males and females, for example the HIS mice are both male and female since these animals are seen as individuals and will be analyzed on a more individual basis. Furthermore, sometimes we have experiments with males only, for example when we want to study the efficacy of our antibodies in prostate cancer.

If the CCD approves, we are open to setup some tumor models in male mice as well and compare the sex difference with respect to antibody efficacy

In general we use mice at an age between 5 and 14 weeks old. Young mice normally have a much better tumor take rate. Per experiment we try to keep the mice in an age difference of maximal 2 weeks, since a higher difference might lead to difference in tumor outgrowth. However, sometimes we are restricted to a certain age of the mice because of technical feasibilities. For example humanized NSG or BRGS mice are somewhat older before tumor cell injection, since first the human immune system has to be established, which can take up to 12-14 weeks.

For each animal experiment it will be carefully considered which background, strain, gender and age is required for having an optimal or most translatable readout for the research question to be addressed in that particular experiment and the efficacy of an antibody drug.

In the future other or new mice and rat strains might be developed that allow better engraftment of tumor cells and/or humane immune cells, and might be used in the animal studies as well.

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.

Most mice/rats will not be re-used.

However in some experiments we may consider to use some animals for training purposes before the animals will be euthanized.

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,

In vitro studies to analyze the binding properties of the antibodies to the tumor target and to test their functional anti-tumor activity will always be performed before the start of any in vivo experiment. This allows a first scaling down step of the antibody panel. However in vitro data only will not give an exclusive and complete insight into the anti-tumor efficacy of the antibody of interest. Testing the efficacy of antibodies in in vivo tumor models represents a more complex system which is more comparable to the tumor of the patient and allows the influence of additional factors, such as blood supply, the tumor microenvironment and the contribution of the immune system to the efficacy of the antibody drug. This results in a better and more complete overview on the efficacy of the drugs and allows a better translation to the use in cancer patients.

Reduction,

All the individual tumor models are carefully designed. The variation of the tumor growth (homogeneous or heterogeneous), the predicted efficacy of the drug, and the research question is always taken into

account. At each experiment a well thought experimental design is made in which a good scientific outcome is balanced to the total number of mice used in the experiment. This is supported by a power analysis and suggested group sizes described in 2A.

Furthermore bio-distribution of the antibody of interest to the site of the tumor is also very important for the final efficacy of the drug and can only be determined in in vivo settings. To support this feature the pharmacokinetics of the antibody drugs is studied using a parallel project application which in general uses less mice than a tumor model experiment. Using these data we can detect very well the half-life of the specific antibody in circulation. And together with in vitro data we can better predict the effective dose in the tumor models described in this application. Overall following this strategy, this will lead to the use of fewer mice.

Furthermore, we are intensively involved in setting up alternative model systems such as [REDACTED]. In the coming years new techniques will be developed and evaluated if these techniques can successfully replace, refine or reduce the use of animal experiments. However to explore this, in the first coming years we expect the need of several animal tumor models to evaluate the applicability of the alternative model systems

Refinement

We put a lot of effort in the refinement of the animal tumor models. By having dedicated people we observe, learn and adjust in consecutive studies, so that we know what to expect and in cases of (unexpected) discomfort we can determine how to act to prevent the animals from reaching the "Human End Point" (HEP).

For the maximal tumor size in mice the code of practise "animal experiments in cancer research" (Inspectie W&V, Zutphen/The Hague 1999) describes a tumor volume of 2000 mm³. In our studies we intend to euthanize the mice when a tumor volume above 1500 mm³ is reached. In this way we reduce the discomfort of the mice due to a large tumor size. Also in case of tumor growth in rats, we will euthanize as much as possible the rats before the suggested HEP of 40 cm³ or a diameter of 4.2 cm in the code of practise.

In case of orthotopic tumors or metastasis, we will follow in most cases the tumor development by imaging, and can anticipate on the appearance of HEP related with tumor growth and act accordingly to avoid the HEP as much as possible. When performing consecutive studies with orthotopic models we get a feeling on the time lines and the in vivo luciferase activity. We are then even more cautious when animals reach human endpoints.

With respect to the appearance of ulcerations at the site of the tumors our team has made an instruction guide how to act and how to handle in case an open wound is observed. This has been discussed extensively within our Animal Welfare Body and is communicated and instructed to the responsible animal caretakers as well. See Addendum III " tumorgroei gerelateerde verschijnselen")

Finally, we make sure that our dedicated personnel remains skilled and will, therefore, be trained regularly, by participating in courses or to learn new techniques in house. Most handlings described in the project applications are standard techniques, and in cases when new techniques need to be learned we prefer to first practise on dead or terminal animals under anaesthesia. In some cases as additional mice/or rats will be ordered for the use of practising only ([as described in Appendix 3](#)).

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

The following measures will be taken to minimize the tumor model related discomfort:

- 1) Intensive observation for clinical signs (like abnormal behaviour, posture and appearance) will be done 1-2 times a week, and increased to 3 times a week in periods where we can expect discomfort.
- 2) 1 to 3 times a week tumor volumes will be measured and when tumors are above 1500 mm³ tumors will be stopped, so that only a minimal number of mice reach the human endpoint of 2000 mm³. When imaging is applied to follow tumor growth we can (based on imaging values,

time point in the study and tumor type) anticipate when HEP can be reached. We will act accordingly to minimize the discomfort of the mice and rats as much as possible, with keeping the scientific value as high as possible.

- 3) In case of models that show a wound at the location of the tumor, observation is intensified or preliminary stopped before severe ulcerations appear
- 4) Body weight measurements are included in all experiments where discomfort is expected or when it is unknown.

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 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.

For all treatments with antibodies or other test compounds as well as for the implantation into the mammary fat pads (breast cancer models) or intradermally (melanoma models) or intravenously (leukemic and other metastasis models) no anesthesia or analgesia is required because the distress for the animals is very low.

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

-For all surgeries as well as intracardiac tumor cell injections the animals will receive anesthesia
-To prevent pain, an analgesic is applied 30 minutes-1 hour before the surgery and can be repeated 24 hours after the implantation.

- The painkillers needed for more severe pain, will only be applied after consultation of the veterinarian

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

In some humanized mice models which are adjusted with humane immune cells, we can expect "Graft versus Host Disease"

Explain why these effects may emerge.

- In these models human PBMCs are injected i.p. or i.v., the human T-cells are the most expanding human cell population. The cytotoxic T-cells then recognize the mouse as non-self and can react with the murine body cells. This graft versus host reaction can be observed by clinical signs such as abnormal behaviour, posture and appearance and can be expected 4-6 week after i.p. or i.v. injection of human PBMCs.
- When the PBMCs are subcutaneous co-injected with the tumor cells, only in a few cases these clinical signs are observed. And a graft versus host reaction can be recognized occasionally in these incidences as well.
- When CD34⁺ hematopoietic stem cells are implanted in [in young mice \(of 1 -3 weeks old\)](#),, the human immune cells will be trained in the thymus to recognize the mouse cells as "selves" and, therefore, no graft versus host reaction (or only at a very minimal level) will appear in these mice

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

In the period of expected graft versus host reaction, observation will be increased and if possible mice will be preventively euthanized before reaching this point.

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.

Since tumor cells/fragments are implanted in the mice/rats, we can expect tumor growth related adverse effects, which can lead to tumor related humane endpoints. We use the following humane endpoints as guidance:

1. A large (visible) tumor volume is a specific humane endpoint in these studies and will be monitored by caliper measurements for the breast cancer and melanoma models throughout the whole study: According to Code of practice animal experiment in cancer research) HEP tumor volume = 2000 mm³ for mice and 40 cm³ or a max diameter of 4.2 cm in rats. [However in most cases we stop the mice when tumor volumes of > 1500 mm³ are reached](#)
2. When tumors are not visible, imaging is applied in most studies to follow tumor growth. Based on imaging values, time point in the study and tumor type, we anticipate when the HEP can be reached. Humane endpoint is for these non-visible tumors mostly observed by the clinical signs and body weight loss.
3. Ulcerations at the site of the tumor in breast cancer and melanoma orthotopic models have to be considered as a specific HEP in these studies.
4. Body weight loss (> 20%)
5. Clinical signs, most important for orthotopic models since mostly no primary tumor is visible, are: abnormal behaviour, dyspnea (difficulties with breathing), salivation, no response on incentives, apathy, involuntary shaking of the body or limbs (tremor), convulsion (where the body muscles contract and relax rapidly and repeatedly), self-mutilation, piloerection, abnormal non-physiological posture, paralysis, severe Diarrhea. The level of severeness of these clinical signs can be used to determine if humane HEP is reached.
6. For some specific leukemic/metastasis models hind leg paralysis is described as a clinical observation. The tumor cells home to different organs/tissues. The paralysis of the hind legs just prior to death is associated with the presence of neoplastic nodules within the spinal canal. (Jin-Song Yan, et al, Chin J of Cancer 2009) and will be considered as a HEP in these studies.
7. Graft versus Host disease. (this will be only expected in humanized mice, as described in I)

When a HEP is reached animals will be taken out of the study and prematurely euthanized in most of the

cases. In some cases where we observe in an early time-point of the study an (unexpected) adverse event close to HEP we might consider to leave the animals in the study for a very short time (1-3 days) because a repetition of the entire study would consume again several mice. In this case we will increase the observation rate, put them eventually in a separate warmed cage, and/or, when observing weight loss, give a subcutaneous PBS injection to recover body fluid. If after 3 days the animals still is not recovered, the rat/mice has to be euthanized.

Indicate the likely incidence.

Especially for the orthotopic models where we can apply caliper measurements (breast cancer and melanoma models), we can anticipate when the HEP with respect to tumor size will be reached. Therefore, only a minimal of animals will reach the max tumor volume as human endpoint. For orthotopic and metastasis models, where no primary tumor is easily visible, we visualize primary tumors as well as metastases by applying imaging techniques. In that respect we get a quantitative readout for the tumor and metastasis burden. This, but also the timing in the model and the appearance of clinical signs have to be taken into account to address animal's discomfort and HEP. In models in which we have intensive experience we do not expect that any of the animals will reach the human endpoint. However, in models that have heterogeneous tumor growth and/or where we have less experience we can expect more mice to reach the human endpoint.

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 procedures have in general a moderate level of discomfort. In some cases where no tumor development takes place we can expect only mild discomfort and in some cases when animals reach unexpectedly the HEP the discomfort is higher. In a typical experiment we expect:

In 10% a mild discomfort

In 87% a moderate discomfort

In 3% a severe discomfort

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 are specifically ordered for this procedure and they cannot be used for another type of experiment since they have been injected with tumor cells

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

1. This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
2. A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
3. For more information, see our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
4. 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'. | 24400 | |
| 1.2 Provide the name of the licenced establishment. | [REDACTED] | |
| 1.3 List the serial number and type of animal procedure. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i> | Serial number 3 | Type of animal procedure 1. Practicing of several techniques for orthotopic tumor and metastasis tumor models |

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 here described animal procedures include only the practicing of different techniques needed to establish orthotopic and/or metastasis models.

We expect the need of additional mice and/or rats for practicing of two procedures described in appendix 2 (orthotopic/metastasis models). These methods include method b) orthotopic tumor cell inoculation with surgery and method d) intracardiac inoculation of tumor cells. Since we have limited experience with both these techniques, it is important to validate the correct way of tumor cell injection and surgery before establishment and performing antibody efficacy studies. To practice these procedures we will apply standardized techniques that are described in literature or we will be trained by people having experience in the establishment of these models.

Additional animals for practicing are not needed for the following methods: a) orthotopic implantation without surgery, c) intravenous inoculation and e) intraperitoneal inoculation (described in Appendix 2). These techniques are already established and intensively applied in the efficacy testing of the antibodies in development, so no additional practicing is needed. Also for the methods described in appendix 1 (subcutaneous implantation of tumor cells) additional mice /or rats for practicing are not required since this technique is applied in most of our experiments and personnel is already trained and skilled in these techniques.

[REDACTED]

After surgery the recovery of the mice/rat will be monitored.

[REDACTED]

A general practicing procedure will take up to 1 week. However, in case of successful recovery of the animal after surgery it can be considered to include the steps as described above to monitor the tumor outgrowth. This will allow us to check the specific sites/organs of tumor outgrowth and allow us to validate if the implantation techniques were properly performed. Depending on the tumor growth these can take up to a maximum of 1 month.

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

The animals used in this appendix are only used for practicing purposes, and no statistical analysis will be needed to support the primary endpoints of these practicing studies.)

B. The animals

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

The number of animals needed in these practising procedures will be limited to the number of personnel to be trained (██████████ per technician). Basic trainings steps (such as localization of the specific organs, orientation and route of injection will be first trained (if possible) on animals euthanized in parallel studies.

For the practising procedures described in this appendix we expect the need of 1 session per year. We foresee the need for practicing these skills for ██████████ technicians, So we expect the need of ███ newly ordered animals per year, which will be █████ animals for practicing purposes only for the coming 5 years. We expect the need of ██████████ in total. (See also addendum Table 1)

There is extensive experience in tumor models in mice and rats which allows the most optimal tumor growth and translation of the potency of a novel drug to human patients. The mice or rat strain used for these training purposes will be based on the animal strain needed for the particular tumor model to be established.

Details for rational of choice of different rat or mice strains are described in Appendix 2.B.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

The animal studies described in this appendix are used to optimize and refine the animal experiments described in appendix II (orthotopic tumor and metastasis models). By applying these practising procedures before the real establishment of the tumor model, we will enhance the success rate of the new orthotopic tumor and metastasis models.

By performing these practising studies we make sure that our dedicated personnel remains skilled. Therefore, training on a regular basis, either by participating in courses or by learning new techniques in house is essential. Also for these new techniques, specific training or dedicated external courses will increase the skills on these techniques

Furthermore the 3R's described in appendix I and II also apply for these practising studies.

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

The following measures will be taken to minimize the tumor model related discomfort:

- 1) The training techniques will be performed under anaesthesia, and if needed painkillers will be applied.
 - 2) Intensive observation for clinical signs (like abnormal behaviour, posture and appearance) will be done the first days after surgery/tumor cell inoculation.
-

- 3) Only when recovery of the mice/rat is successful by means of visual clinical signs (like normal behaviour, motility, absence of piloerection), follow up monitoring can be initiated in some of the mice or rats. **If so,**
- body weight measurements are included.
 - When using luciferase or fluorescent tumor cells tumor volumes will be monitored up to weekly by imaging. At the moment that tumors can be visualized by imaging, it can be validated if the tumor growth occurs in the expected organ(s). When this is confirmed, the animal will be euthanized.

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 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.

-For all surgeries as well as intracardiac tumor cell injections the animals will receive anesthesia
-To prevent pain, an analgesic is applied 30 minutes-1 hour before the surgery and can be repeated 24 hours after the implantation.

- The painkillers needed for more severe pain, will only be applied after consultation of the veterinarian

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

NA

Explain why these effects may emerge.

-

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

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

Since this appendix includes only practising of new techniques, it might be that mice or rats encounter discomfort/stress/complications after surgery due to the moderate skills on these certain techniques by the technician(s). However, before starting practising on the animals in this protocol, ex vivo training will be performed first by means of theoretical training and training on sacrificed animals in parallel projects.

We intend to stop most animals in this procedure directly after recovery of surgery. However, in some cases, if recovery is successful, animals will be euthanized as soon as we detect tumor appearance. If we observe tumor development, the location of the tumor will be checked and the animals will be euthanized. The maximum observation time is 1 month, if no tumor development is observed, the animals will be euthanized earlier.

Because of this rather short tumor procedure it is not likely that the animals will reach the humane endpoint related to tumor growth.

Humane endpoints in this procedure will therefore mostly be defined by clinical signs and body weight loss as described in point 1 and 2. However we cannot fully predict the timing of tumor take appearance, and since small tumors can also cause adverse effects we might encounter tumor growth related discomfort as well.

1. Clinical signs, most important for orthotopical models since mostly no primary tumor is visible, are: abnormal behaviour, dyspnea (difficulties with breathing), salivation, no response on incentives, apathy, involuntary shaking of the body or limbs (tremor), convulsion (where the body muscles contract and relax rapidly and repeatedly), self-mutilation, piloerection, abnormal non-physiological posture, paralysis, severe Diarrhea. The level of severeness of these clinical signs can be used to determine if humane endpoint is reached.
2. If we observe longer than 1 week, bodyweight measurements will be included. At Body weight loss (> 20%) the humane endpoint is reached.

When a Humane endpoint is reached animals will be directly euthanized.

Indicate the likely incidence.

K. Classification of severity of procedures

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

The procedures in general cause a moderate level of discomfort. In some cases where we euthanize the animals under anaesthesia we expect only mild discomfort. However in most cases we will monitor the recovery of the animals from anaesthesia and follow the mice/rats to check the tumor formation after 1 to 3 weeks. In some cases where the animals do not successfully recover from surgery severe discomfort can be encountered. Therefore in general we expect in the practising procedures:

In 10% mild discomfort

In 84% moderate discomfort
In 6% severe discomfort

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

Animals are specifically ordered for this procedure and they cannot be used for another type of experiment since they have been injected with tumor cells

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.

x Yes



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Genmab B.V.

[REDACTED]
Yalelaan 60
3508 AD 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
AVD2440020171264
Bijlagen
1

25 APR 2017

Datum 24 april 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte mevrouw [REDACTED]

Op 31 maart 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Research and Evaluation of therapeutic test antibodies in tumor models in mice and rats" met aanvraagnummer AVD2440020171264. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 20 april 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Naar aanleiding van onze vragen is de NTS aangepast naar eenvoudiger taal op enkele punten, is het ongerief van de dieren duidelijker beschreven in de NTS, is de doelcategorie aangevuld, is hergebruik correct ingevuld, is de acclimatisatieperiode verlengd van 3 dagen naar 1 week, zijn de handelingen bij de dieren en de reden voor doden van de dieren verhelderd, het gebruik van beide geslachten beschreven, en de experimentduur van de handelingen in bijlage 3.4.4.3 verkort.

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.

De algemene voorwaarde(n) zijn opgenomen op grond van artikel 1d lid 4, artikel 10a1 lid 2, artikel 10 lid 2 en/of artikel 10a3 van de wet.

Vanwege het translationele karakter van het onderzoek, en om het aantal dieren in voorraad gedood te beperken, wordt een voorwaarde toegevoegd m.b.t. het gebruik van beide geslachten.

U kunt met uw project "Research and Evaluation of therapeutic test antibodies in tumor models in mice and rats" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 mei 2017 tot en met 1 mei 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Datum:
24 april 2017
Aanvraagnummer:
AVD2440020171264

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.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie Utrecht gevoegd. Dit advies is opgesteld op 29 maart 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

In aanvulling op het DEC-advies stelt de CCD voorwaarden. De voorwaarden staan in de vergunning beschreven. Voor het overige nemen wij het advies van de DEC 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.

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

Datum:
24 april 2017
Aanvraagnummer:
AVD2440020171264



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Genmab B.V.
Adres: Yalelaan 60
Postcode en plaats: 3584 CM UTRECHT
Deelnemersnummer: 24400

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 mei 2017 tot en met 1 mei 2022, voor het project "Research and Evaluation of therapeutic test antibodies in tumor models in mice and rats" met aanvraagnummer AVD2440020171264, volgens advies van Dierexperimentencommissie Utrecht. Hierbij is afgeweken van het DEC-advies. Er worden aanvullende voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 31 maart 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 20 april 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 20 april 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 29 maart 2017, ontvangen op 31 maart 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 20 april 2017

Aanvraagnummer:
 AVD2440020171264

| Naam proef | Diersoort/ Stam | Aantal dieren | Ernst | Opmerkingen |
|--|---------------------------------------|---------------|---|-------------|
| 3.4.4.1 Subcutaneous tumor models | | | | |
| | Muizen (<i>Mus musculus</i>) / | ■ | 3% Ernstig 75% Matig 22% Licht | |
| | Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) / | ■ | 3% Ernstig 75% Matig 22% Licht | |
| 3.4.4.2 Orthotopic tumor and Metastasis models | | | | |
| | Muizen (<i>Mus musculus</i>) / | ■ | 3% Ernstig 87% Matig 10% Licht | |
| | Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) / | ■ | 3% Ernstig 87% Matig 10% Licht | |
| 3.4.4.3 Practicing of several techniques for orthotopic tumor and metastasis tumor models | | | | |

Aanvraagnummer:
AVD2440020171264

| | | | | |
|--|---------------------------------------|---|---|--|
| | Muizen (<i>Mus musculus</i>) / | ■ | 6% Ernstig 84% Matig 10% Licht | |
| | Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) / | ■ | 6% Ernstig 84% Matig 10% Licht | |

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.

Tenminste 2 tumormodellen zullen worden opgezet in zowel mannelijke als vrouwelijke muizen en verschillen in de resultaten hierin zullen worden onderzocht.

Aanvraagnummer:
AVD2440020171264

De CCD ziet graag aan het einde van de looptijd van de vergunning een terugkoppeling van de ervaringen opgedaan met het opzetten van de modellen in beide geslachten. Dit kan ook geïncorporeerd in een nieuwe aanvraag.



Aanvraagnummer:

AVD2440020171264

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:
AVD2440020171264

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.

| Inventaris Wob-verzoek W17-09 | | | | | | | | | |
|-------------------------------|--|-----------------|------|--------|-------|-------------------|--------|--------|------|
| | | wordt verstrekt | | | | weigeringsgronden | | | |
| nr. | document | reeds openbaar | niet | geheel | deels | 10.1.c | 10.2.e | 10.2.g | 11.1 |
| | NTS20171289 | | | | | | | | |
| 1 | Aanvraagformulier | | | | x | | x | x | |
| 2 | Projectvoorstel oud | | | | x | | | x | |
| 3 | Niet-technische samenvatting oud | | | | x | | | x | |
| 4 | Bijlage beschrijving dierproeven oud | | | | x | | | x | |
| 5 | DEC-advies | | | | x | | x | x | |
| 6 | Ontvangstbevestiging | | | | x | | x | x | |
| 7 | Verzoek aanvulling aanvraag | | | | x | | x | x | |
| 8 | Projectvoorstel nieuw | | | | x | | | x | |
| 9 | Bijlage beschrijving dierproeven nieuw | | | | x | | | x | |
| 10 | Niet-technische samenvatting nieuw | x | | | | | | | |
| 11 | Advies CCD | | x | | | | | | x |
| 12 | Beschikking en vergunning | | | | x | | x | x | |



Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

- U bent van plan om één of meerdere dierproeven uit te voeren.
- Met dit formulier vraagt u een vergunning aan voor het project dat u wilt uitvoeren. Of u geeft aan wat u in het vergunde project wilt wijzigen.
- Meer informatie over de voorwaarden vindt u op de website www.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 | |
| | | Tenaamstelling van het rekeningnummer | |
| 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 | <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 september 2017 |
| Einddatum | 31 augustus 2022 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Preventie ██████████ disorders in Parkinson's disease: a novel preclinical model
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Het voorkomen van ██████████ stoornissen in de ziekte van Parkinson: een nieuw preklinisch model
- 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?

Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1035

Wijziging € Lege

4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.

Via een eenmalige incasso

Na ontvangst van de factuur*

Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.

* 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:

Factuuradres:

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

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

Amsterdam

Datum

03 - 04 - 2019

Handtekening



Form Project proposal

- This form should be used to write the project proposal for animal procedures.
- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed.
- For more information on the project proposal, see our website (www.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.

Parkinson's disease is the second most common neurodegenerative disorder after Alzheimer's disease. It is a progressive disorder, characterized by severe motor symptoms and motor dysfunctions and affects approximately 2% of the population. Whereas our understanding of the etiology of Parkinson's disease

has increased over the last decade, to date there is no curative therapy. One of the underlying causes of Parkinson's disease is degeneration of the brain's dopamine neurotransmitter system. Therefore in Parkinson's disease many of the motor symptoms can be improved by dopamine replacement therapy to boost the activity of the dopamine system. This dopamine replacement therapy consists of chronic treatment with the dopamine precursor levodopa and chronic treatment with dopamine receptor agonists such as pramipexole, or a combination of levodopa and dopamine receptor agonist.

Unfortunately, frequent side-effects of these dopamine replacement therapies are [REDACTED] disorders following onset of the treatment and they pose a major burden on patients, their families and caregivers. It is estimated that [REDACTED] disorders develop in 15% to even up to 25% of patients and commonly include pathological gambling, compulsive sexual behaviour, compulsive buying and binge eating [1,2]. Results of cross-sectional studies have revealed some generic factors associated with an increased risk for [REDACTED] disorders, e.g. young age of onset, trait impulsivity, (family)history of addiction and depression. Nonetheless, current knowledge of the characteristics related to increased susceptibility of developing [REDACTED] disorders is insufficient to adequately predict or prevent these disorders in daily clinical practice. More importantly, the mechanisms underlying the development and the course of [REDACTED] disorders in Parkinson's disease are poorly understood and cannot be directly manipulated in clinical populations.

Also, there is no effective therapy to prevent the onset of [REDACTED] disorders arising with dopamine therapies. Therefore having access to a translational animal model, which unravels the mechanisms and reliably predicts the risk for [REDACTED] disorders when treated with dopamine replacement therapy, will be a valuable model to develop novel or to refine existing pharmacotherapies for Parkinson's disease that do not induce [REDACTED] disorders. Moreover, the availability of such a model will also allow testing of adjuvant pharmacotherapies that alleviate [REDACTED] disorders.

This project aims to **develop a novel translational animal model for Parkinson's disease mimicking the risk to develop [REDACTED] disorders upon dopamine therapy and unraveling the underlying brain mechanisms**. As such, this novel animal model may be utilized as a preclinical tool to facilitate and aid the development of novel pharmacotherapies for Parkinson's disease that do not induce [REDACTED] disorders. Establishing such a model will have a great impact on the field given the sense of urgency from both clinicians as well as patients. In addition, if this novel model is successful another aim is to test whether adjuvant therapy reduces the risk to develop [REDACTED] disorders.

Previous and current work using different approaches to mimic Parkinson's disease pathology in animals, including 6-OHDA lesions and alpha-synuclein viral overexpression, have indeed demonstrated development of [REDACTED] deficits and altered responsivity to dopamine therapies. However, the interventions in such animal models are irreversible, invasive by inducing permanent brain damage and lack specific or temporal control over relevant brain pathways.

To address these limitations, this project will take advantage of recent technological advances to highly selectively and temporally-precise manipulate and uncover crucial brain pathways that could drive the risk for [REDACTED] disorder development in Parkinson's disease. This will be achieved by the novel innovative chemogenetic approach called designer-receptors exclusively activated by designer drugs (DREADD) to mimic Parkinson-related pathology in cortico-striato-thalamo-cortical brain pathways, since these pathways are thought to underlie the risk to develop [REDACTED] disorders [3]. The DREADD approach will be further specified in **paragraph 3.4** (Research Strategy). First, we will combine DREADD with dopamine therapy in the same animals performing cognitive tasks that capture [REDACTED] deficits as a proxy to mimic clinical [REDACTED] disorders in Parkinson's disease. Second, upon establishing this animal model, we will study the effects of adjuvant pharmacotherapy to ameliorate dopamine therapy-induced [REDACTED] disorders.

[1] Vriend C, et al (2014) Neurosci Biobehav Rev 38: 60-71.

[2] Weintraub D, et al (2015) Mov Disord 30:121-127.

[3] Gerfen CR and Surmeier DJ (2011) Ann Rev Neurosci 34: 441-466.

3.2 Purpose

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

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

The **main purpose and objective** of this project is to develop a novel translational animal model that mimics the risk of developing [REDACTED] disorders after dopamine therapy as a preclinical animal model to facilitate and aid the development of novel pharmacotherapies without the risk of disturbed [REDACTED]

In line with this main objective, the specific sub-objectives are:

Objective 1a: To establish differential effects of dopamine agonist therapy on DREADD modulation of cortico-striato-thalamo-cortical brain pathways as a proxy and proof-of-concept to mimic clinical [REDACTED] disorders in Parkinson's disease

For this sub-objective, we will address the causal involvement of manipulating specific neural brain pathways in the onset of [REDACTED] disturbances. Furthermore, we will address the question which dopamine agonist monotherapy, levodopa or pramipexole, is most likely to induce deficits in [REDACTED] after subchronic treatment. Levodopa and pramipexole are different classes of dopamine therapy and clinically might possess subtle differences in the risk for onset of [REDACTED] disorder. Therefore, it is important to test both compounds in our novel animal model, since our model allows to further dissect the causal effects of levodopa or pramipexole treatment and their differences on deficits in [REDACTED]

Objective 1b: Effects of adjuvant pharmacotherapy to suppress dopamine therapy-induced [REDACTED] deficits

For this sub-objective, we will address the question whether adjuvant treatment, on top of the dopamine therapy that has the most pronounced risk to develop impulsivity, is able to suppress these effects of dopamine therapy on [REDACTED] deficits. More specifically, we will focus here on three different classes of clinically-used drugs as adjuvant therapies, namely 1) the antidepressant drug and selective serotonin reuptake inhibitor citalopram; 2) the anti-ADHD drug and selective norepinephrine reuptake inhibitor atomoxetine; and 3) the opioid antagonist naltrexone. These drugs are selected, since they have demonstrated to possess beneficial effects on [REDACTED] under different circumstances in both rats and humans, and therefore seem promising candidates as an adjuvant therapy in the clinic. However, none of these three classes of drugs have the indication Parkinson's disease, and moreover to our knowledge have not been prescribed as adjuvant therapy to dopamine replacement therapy. Therefore, our study will provide important information regarding the effectivity and applicability of this approach.

The work described in this project will be funded by an international peer-reviewed research grant from a non-profit organization that funds research into the etiology and treatment of neurodegenerative disorders including Parkinson's Disease.

The main objective and sub-objectives of the project are **achievable**, since:

- 1) we have ample experience using DREADD as a methodology for neural interventions that are crucial to increase our understanding of the brain pathways involved
- 2) we have a strong track-record and experience in translational cognitive tasks capturing [REDACTED] deficits, documented by many scientific papers in international journals
- 3) our facility has adequate numbers of operant chambers to run the cognitive tasks and housing facilities for the project
- 4) in addition to research technicians who will run part of the experiments, the research grant allows hiring full time staff at the postdoctoral level to complete all of these experiments within the time-frame of the project
- 5) all of the equipment needed for DREADD approaches is already present and the viral vectors needed are commercially available, in addition to the pharmacotherapies which are commercially available

3.3 Relevance

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

Scientific relevance

Randomized clinical trials are highly costly and lengthy in duration, therefore having access to a translational preclinical model which reliably predicts [REDACTED] disturbances following dopamine therapy will be a valuable model that will aid the development of novel or refinement of existing

pharmacotherapies for Parkinson's disease without the risk to induce deficits in [REDACTED]. Furthermore, the DREADD approach of circuit-relevant and temporal specific manipulation of neural pathways will allow unique insights into the aetiology and mechanisms of [REDACTED] disorder development beyond the currently existing Parkinson's disease animal models and beyond what can be studied in clinical populations.

Social relevance

Despite the clinical efficacy of dopamine therapy in ameliorating motor symptoms in Parkinson's disease, there is no effective intervention to prevent the onset of potential deficits in [REDACTED] arising with pharmacotherapy. Given the tremendous burden of [REDACTED] disorders on patients, their families and caregivers, novel (adjuvant) pharmacotherapies that do not cause disturbances in [REDACTED] are highly needed. The experiments described in this project are intended to aid the development of such novel (adjuvant) pharmacotherapies for Parkinson's disease.

3.4 Research strategy

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

Objective 1a: To establish differential effects of dopamine agonist therapy on DREADD modulation of cortico-striato-thalamo-cortical brain pathways as a proxy and proof-of-concept to mimic clinical [REDACTED] disorders in Parkinson's disease

To address **objective 1a** and to mimic altered cortico-striato-thalamo-cortical brain pathway functioning as a way to mimic Parkinson pathology, we will employ an innovative retro-DREADD procedure [1], which permits remote control of specific neural pathways. Essentially, DREADDs (engineered G protein-coupled receptors) are targeted to specific neuronal populations using viral-vector mediated gene transfer and can be transiently activated by a synthetic pharmacological agent, that is otherwise inert. As such, DREADD provides the unique opportunity to selectively and transiently activate or silence these brain pathways and to determine their functional relevance in freely moving animals performing in cognitive tasks. This will allow unique insights into the aetiology and mechanisms of [REDACTED] disorder development beyond the currently existing Parkinson's disease animal models and beyond what can be studied in clinical populations.

Given the specific importance of the ventral cortico-striato-thalamo-cortical circuit in onset of [REDACTED] disorders, we use a dual-virus strategy to target defined neural circuits. For this, we first inject into the target region (e.g. NAc) a viral vector that is transported in a retrograde direction back to the projecting region (e.g. mPFC). In the projection region, we inject another virus that encodes the DREADD, but does not express this receptor unless the other viral vector is present. Therefore, DREADD expression is restricted to neurons defined by their circuit connectivity. With this approach, we can study the contribution of specific cortico-striato-thalamo-cortical brain pathways in mediating the effect of dopamine therapy on the onset of [REDACTED] deficits. The projections we aim to study are depicted in **Figure 1**, and in different groups of rats we will inject a combination of the excitatory and inhibitory DREADD virus [2] into the projection brain area and inject the other viral vector in the target region of this brain area within the same animals.

Following inhibitory or excitatory DREADD expression, animals will be trained in translational cognitive tasks including the rodent stop-signal task measuring cognitive control and a rodent gambling task measuring risk-based decision-making as a proxy of [REDACTED] deficits. Upon stable baseline performance, we will probe altered brain pathway functioning on cognitive control/ risk-based decisions and motor function by DREADD activation using systemic administration of DREADD ligands to either inhibit or activate the pathways under investigation. These experiments will unravel whether manipulation of specific brain pathways to mimic Parkinson pathology already induces [REDACTED] deficits.

Following these tests, while still trained in the cognitive tasks on a daily basis, dopamine therapy will start and animals will receive subchronic levodopa treatment or pramipexole treatment for 21 days and on days 1, 7, 14 and 21 we will additionally administer the DREADD ligands to assess the interaction

between dopamine therapy and altered cortico-striato-thalamo-cortical brain pathway connectivity on [REDACTED] deficits.

Based on the outcomes of these experiments we will select the specific cortico-striato-thalamo-cortical brain pathways which in combination with dopamine therapy (either levodopa or pramipexole treatment) are most likely to induce deficits in [REDACTED] in order to further address **objective 1b**.

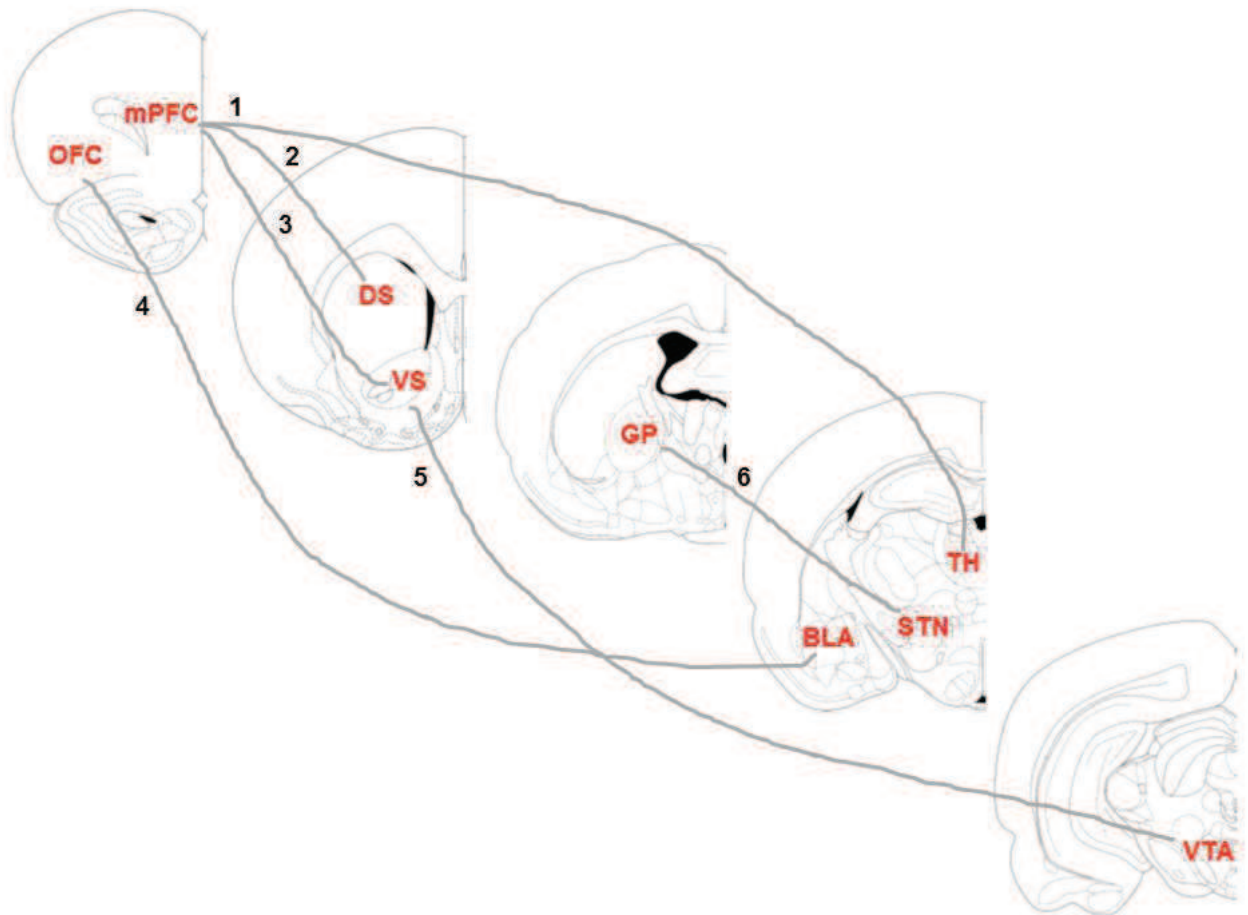


Figure 1. Schematic depiction of the different cortico-striato-thalamo-cortical brain pathways that will be targeted in the project. 1) thalamus to mPFC; 2) mPFC to dorsal striatum, DS; 3) mPFC to ventral striatum, VS; 4) orbitofrontal cortex, OFC, to basolateral amygdala, BLA; 5) ventral tegmental area, VTA, to VS; 6) subthalamic nucleus, STN, to globus pallidus, GP. Depicted are coronal sections of the rat brain [adapted from 3].

Objective 1b: Effects of adjuvant pharmacotherapy to suppress dopamine therapy-induced [REDACTED] deficits

In this set of experiments, we will assess the effects of adjuvant pharmacotherapy on levodopa- or pramipexole-induced disturbances in [REDACTED] in the pathways that have been found to be most importantly involved in the onset of these disturbances. We will here focus on the SSRI citalopram, the SNRI atomoxetine and the opioid antagonist naltrexone as adjuvant therapies, given 1) the beneficial effects of these compounds on [REDACTED] and 2) the fact that these compounds are in clinical use. If successful, this will indicate that the model has immense potential for follow-up experiments to search for novel pharmacotherapies to treat Parkinson's disease without the risk of developing deficits in [REDACTED].

[1] Marchant NJ, et al (2016) Neuropsychopharmacology 41: 402-409.

[2] Vardy E, et al (2015) Neuron 86: 936-946.

[3] Paxinos and Watson (1998) Academic Press Ltd.

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.

As described in **paragraph 3.4** (Research Strategy), all animals in the experiments described in **both objective 1a and objective 1b** will undergo the same procedures and will be tested in each of the different components of the project following the same time-line, namely 1) viral expression of inhibitory or excitatory DREADD will be established in all animals; 2) animals will be trained in the cognitive tasks until baseline performance; 3) animals will receive pharmacological treatments with DREADD ligands and dopamine therapy (**objective 1a**) or DREADD ligands, dopamine therapy and adjuvant therapy (**objective 1b**) and 4) ex vivo analyses following behavioural testing.

Ad 1. Viral DREADDs expression:

To incorporate inhibitory or excitatory DREADDs to manipulate relevant brain pathways, viral vectors that travel along axons need to be expressed in relevant brain regions. For this, we will perform intracranial viral surgery prior to the cognitive testing. Then following recovery, animals will be trained in the cognitive tasks as described below. The primary outcome measures of viral DREADDs expression are sufficient levels of viral vector expression. This will be determined in study 1.

Ad 2. Cognitive tasks measuring [REDACTED] deficits:

Following recovery of the intracranial viral surgery for DREADD and viral vector expression in the selected brain pathways, animals will be trained daily during weekdays in either the rodent stop-signal task or the rodent gambling task until stable baseline performance is achieved. Training of these tasks takes place in operant chambers which are computer-controlled boxes containing levers, nosepoke units or other operanda that the subjects can operate, and visual stimuli and a pellet dispenser that can deliver small highly palatable food pellets. Both of the employed tasks are rodent analogues of existing human neuropsychological tasks, i.e. the stop-signal task and IOWA gambling task.

Briefly, in the rodent stop-signal task subjects are trained to make a response as quickly as possible once a go stimulus (=visual stimulus) is presented to earn a reward. Occasionally, this go stimulus is followed by a stop stimulus (=auditory stimulus) instructing the subject to withhold making a response.

Successful inhibition upon stop stimulus presentation also leads to reward. Behavioural performance on these latter stop stimulus trials reflects response inhibition capacities and is the primary measure of the task. Poor response inhibition capacities in the task reflect [REDACTED] deficits.

In the rodent gambling task, that measures risky decision-making, rats are allowed to choose between 4 different response options, each one of them is associated with a different size of palatable food pellets and aversive wait periods to receive these pellets. There are 2 safe response options which are associated with low numbers of food pellets (1 or 2 pellets) and short wait periods. In contrast, the risky response options are associated with higher number of food pellets (3 or 4 pellets) and long wait periods. Optimal performance in this task would be to prefer the safe response options, which result in a nett larger win of food pellets. A preference for the risky response options results in a nett lower win of food pellets and reflects [REDACTED] deficits.

Primary outcome measure of these cognitive tasks is stable baseline performance in terms of response inhibition (stop-signal task) and risky decision-making (gambling task).

Ad 3. Pharmacological manipulation with DREADD ligands, dopamine therapy and adjuvant pharmacotherapy:

Upon stable baseline performance, before and during dopamine therapy we will probe altered brain pathway functioning on cognitive control/ risk-based decisions and motor function by DREADD activation using systemic administration of DREADD ligands. For subchronic dopamine therapy with either levodopa or pramipexole (**objective 1a**) or the combination of dopamine therapy with adjuvant therapy (**objective 1b**), animals will receive a single dose of the drug which will be administered peripherally once daily before testing in the cognitive tasks for 21 subsequent days. For both levodopa and pramipexole as DRT both a low and high dose will be tested in different groups using a between-subjects design. Adjuvant therapy consists of either the SSRI citalopram, the SNRI atomoxetine and the opioid

antagonist naltrexone.

In these experiments, the primary outcome measures are the effects of DREADD manipulation and dopamine therapy alone or combined with adjuvant pharmacotherapy on response inhibition (stop-signal task) and risky decision-making (gambling task).

Ad 4. Ex vivo analyses

We will sacrifice the animals at the end of the behavioural phase of experiments for subsequent ex vivo analyses. This in order to further unravel neurobiological changes that have occurred in the specific brain pathways. We will dissect brains to perform molecular biological or neurophysiological experiments aimed at understanding the neurobiological changes that have occurred in the selected brain pathways upon DREADD manipulation and their interaction with dopamine therapy. Molecular biological experiments will focus on changes in mRNA or protein levels of various neurotransmitter receptors such as, for instance, dopamine receptors as primary outcome measures. Neurophysiological experiments will focus on functional physiological changes in the selected brain pathways that were targeted with DREADD as primary outcome measures.

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

The coherence between the different components and steps of the project is depicted in **Figure 2**.



Figure 2. Outline of decision points where animals will be used or not depending on the outcome of experiments. Note that only the maximum estimated numbers of animals within each study are depicted.

STUDY 1 (Milestone 1):

In order to optimize the expression levels of the inhibitory or excitatory DREADD virus and viral vector in the target region, we will first conduct pilot studies, in which we intracranially express these viruses. These studies we will determine the optimal conditions for DREADD expression and viral vector expression in the different cortico-striato-thalamo-cortical pathways.

STUDY 2 (Milestone 2):

To address **objective 1a**, we will combine inhibitory and excitatory DREADDs in different brain pathways with either levodopa or pramipexole to develop a novel animal model to study deficits in [REDACTED] in Parkinson’s disease. Thus this novel model aims to elucidate altered brain pathways that combined with dopamine therapy induce disturbed [REDACTED] as a proxy of [REDACTED] disorders in Parkinson’s disease. Therefore, we will perform experiments described under this objective to pinpoint which combination of brain pathway DREADD manipulation and dopamine therapy is most powerful to evoke and to mimic [REDACTED] deficits.

STUDY 3 (Milestone 3):

To address **objective 1b**, we will test whether adjuvant pharmacotherapy (citalopram, atomoxetine and naltrexone) is capable of suppressing and preventing the onset of deficits in [REDACTED] after dopamine therapy. Here we will only study the DREADD brain pathways and dopamine therapy combinations that have induced [REDACTED] deficits. As such, the number of experiments and subjects required here depends on the results of the second series. We will test all three different adjuvant pharmacotherapies in these selected relevant DREADD brain pathways and dopamine therapy combinations.

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 | DREADD expression and pharmacotherapeutic interventions during behaviour |
| 2 | |
| 3 | |
| 4 | |
| 5 | |
| 6 | |
| 7 | |
| 8 | |
| 9 | |
| 10 | |



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.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

| | |
|------------------------------|--|
| 1.1 Titel van het project | Het voorkomen van ██████████ stoornissen in de ziekte van Parkinson: een nieuw preklinisch model |
| 1.2 Looptijd van het project | 5 jaar |
| 1.3 Trefwoorden (maximaal 5) | Parkinson, ██████████ stoornissen, dopaminetekort behandeling, hersenen |

2 Categorie van het project

| | |
|--|---|
| 2.1 In welke categorie valt het project. <i>U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.</i> | <input checked="" type="checkbox"/> Fundamenteel onderzoek |
| | <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 de gezondheid |
| | <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 Projectbeschrijving

| | |
|---|--|
| 3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang) | De ziekte van Parkinson is een veelvoorkomende hersenaandoening die ongeveer 2% van de bevolking treft en die wordt gekenmerkt door ernstige motorische stoornissen veroorzaakt door tekorten in de boodschapperstof dopamine in de hersenen. Deze boodschapperstof dopamine is belangrijk in de communicatie tussen hersencellen. De symptomen van de ziekte van Parkinson worden na verloop van tijd steeds erger en behandeling van de symptomen bestaat meestal uit medicijnen die het tekort aan dopamine in de hersenen aanvullen. Als gevolg van deze behandeling krijgt een aanzienlijk deel van de patiënten te maken met ernstige psychiatrische afwijkingen zoals dwangmatig seksueel gedrag, dwangmatig koopgedrag en eetstoornissen. Deze ongewenste bijwerkingen zijn psychisch zeer belastend voor zowel de patiënt als voor de partner en de sociale omgeving. Deze afwijkingen worden |
|---|--|

samengevat onder de noemer [REDACTED] stoornissen.

Neurobiologische kennis is noodzakelijk om de oorzaak van deze [REDACTED] stoornissen na dopaminetekort behandeling te begrijpen en te voorkomen.

Dit project richt zich op de hersencircuits die verantwoordelijk zijn voor het ontstaan van [REDACTED] stoornissen na dopaminetekort behandeling teneinde in de toekomst betere behandelingen te kunnen ontwikkelen.

- 3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?
- Uit dit project zal blijken welke hersengebieden verantwoordelijk kunnen zijn voor het ontstaan van [REDACTED] na behandeling van dopaminetekorten. Daarnaast zal worden onderzocht of het gelijktijdig gebruik van een ander medicijn een oplossing biedt voor [REDACTED] stoornissen. Deze kennis zal de ontwikkeling van nieuwe therapeutische behandelingen voor de ziekte van Parkinson zonder ontwikkeling van [REDACTED] stoornissen kunnen versnellen.
- 3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?
- Experimenten zullen worden uitgevoerd met ratten. Maximaal zijn 3140 dieren nodig.
- 3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?
- Tijdens een operatie onder adequate anesthesie krijgen de dieren een virale vector ingespoten in de hersenen zodat op een later moment hersencircuits zeer selectief gemanipuleerd kunnen worden en het effect op gedrag bestudeerd kan worden. De operaties, het bijkomen uit de narcose en het geven van de medicijnen kunnen tot tijdelijk ongerief leiden.
- 3.5 Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?
- Hersenoperatie: matig ongerief
Gedragstaken en geven medicijnen: licht ongerief
- Alle dieren ondergaan matig ongerief
- 3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?
- Aan het einde van de experimenten zullen de dieren worden gedood en zal hersenmateriaal gebruikt worden voor verder onderzoek.

4 Drie V's

- 4.1 **Vervanging**
Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.
- Hersenaandoeningen zijn zeer complex en het zeer selectief manipuleren van hersenen teneinde oorzakelijke verbanden vast te stellen hoe [REDACTED] stoornissen ontstaan na dopamine behandeling is nog niet mogelijk bij mensen en maakt proefdieronderzoek noodzakelijk. Doordat gedragstesten worden uitgevoerd kan geen gebruik van celkweken worden gemaakt.
- 4.2 **Vermindering**
Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.
- De best gevalideerde gedragsmodellen voor [REDACTED] worden gebruikt en daarnaast wordt er een poweranalyse gebruikt om het aantal te gebruiken dieren tot een minimum te beperken.
- Na elk experiment vindt er een afweging plaats (op basis van de verkregen resultaten) over het wel of niet uitvoeren van vervolgexperimenten. Zo zullen vervolgexperimenten alleen plaatsvinden als er een duidelijke relatie is gevonden tussen een bepaald hersengebied en [REDACTED]

stoornissen.

4.3 **Verfijning**

Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diermodel(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.

De rat is de meest gebruikte diersoort in modellen voor ██████████. De gebruikte diermodellen voor ██████████ zijn direct afgeleid van neuropsychologische testen voor de mens en beschikken over een grote mate van voorspelbaarheid ten aanzien van het gedrag in mensen.

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

Er vinden dagelijkse welzijnsrapportages plaats waarbij het dier op uiterlijke gezondheidskenmerken en welzijn wordt gescoord. Daarnaast worden gedurende en na de hersenoperatie anesthesie en pijnstilling gebruikt om het ongerief van de ingrepen tot een minimum te beperken en worden duidelijk omschreven humane eindpunten toegepast. Operaties en biotechnische handelingen worden uitgevoerd door ervaren personeel aan de hand van gevalideerde protocollen en onder wettelijke toezicht.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen



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'. | 11400 | |
| 1.2 Provide the name of the licenced establishment. | VUmc | |
| 1.3 List the serial number and type of animal procedure. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i> | Serial number 1 | Type of animal procedure DREADD expression and pharmacotherapeutic interventions during behaviour |

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 outline of the experiments of the project is depicted below in **Figure 1**.

STUDY 1



STUDY 2



STUDY 3



Figure 1. General outline of experiments. **STUDY 1:** Pilot studies for optimizing DREADD expression in selected brain pathways. **STUDY 2:** DREADD in selected brain pathways combined with dopamine therapy alone to study onset of deficits in [REDACTED] **STUDY 3:** DREADD in selected brain pathways combined with dopamine therapy + adjuvant therapy to ameliorate deficits in [REDACTED]

STUDY 1. Pilot studies to optimize DREADD expression in selected brain pathways

In order to develop a novel animal model mimicking the pathology of Parkinson’s disease, we use a dual-virus strategy to target specific cortico-striato-thalamo-cortical brain pathways. For this, we first inject into the target region (e.g. NAc) a viral vector that is transported in a retrograde direction back to the projecting region (e.g. mPFC). In the projection region, we inject a virus that encodes the DREADD, but does not express this receptor the viral vector is present. Therefore, DREADD expression is restricted to neurons defined by their circuit connectivity. With this approach, we can study the contribution of different brain pathways in mediating the effect of DRT on ICD development.

Prior to conducting the behavioural experiments, we will optimize the viral expression patterns of the DREADD constructs in each of the selected brain pathways in pilot studies before we proceed with this pathway in the behavioural experiments. As shown in **Table 1**, for these pilot studies there are 2 Factors: brain pathway (6 pathways) X Virus (DREADD virus: inhibitory or excitatory).

During two surgeries, we will place the rat into the stereotaxic frame and use a needle attached to the stereotact to accurately inject the two viral vectors (DREADD and target region viral vector) into the specific brain regions (projection and target region). After recovery and a waiting period of approximately 4-8 weeks to allow sufficient DREADD expression, animals will be sacrificed to determine viral expression patterns in brain tissue.

PRIMARY OUTCOME PARAMETERS: The primary outcome of these pilot studies is the level of DREADD expression and target region viral vector expression in the selected brain pathways. These expression levels should be sufficient in order to continue with the behavioural experiments.

Table 1. Estimated animal numbers in STUDY 1, pilots for DREADD expression

| <i>STUDY 1</i> | <i>Virus injection</i> | <i>Test Drug</i> | <i>N per group</i> | <i>Total N per experiment</i> |
|--|---|------------------|--------------------|---|
| Pilot infusions DREADD in selected brain pathways for sufficient expression levels | Inhibitory and excitatory DREADDs +target region viral vector | none | 10 | 2 DREADDs X 6 CSTC pathways X 10 rats = 120 rats |

STUDY 2. Objective 1a: Differential effects of dopamine agonist therapy on DREADD modulation of cortico-striato-thalamo-cortical brain pathways as a proxy and proof-of-concept to mimic clinical [REDACTED] disorders in Parkinson’s disease

Here we will combine DREADD in different cortico-striato-thalamo-cortical circuits with either levodopa or pramipexole dopamine therapy in animals that are trained in the stop-signal task to measure response inhibition, or a gambling task to measure risky decision-making. This in order to unravel the underlying brain pathways and mechanisms as a novel model to mimic [REDACTED] disorders in Parkinson’s disease.

Description of the cognitive tasks:

In Parkinson’s disease, deficits in [REDACTED] are characterized by an inability to suppress certain (inappropriate) impulses that may lead to maladaptive behaviour including hypersexuality, compulsive

buying and gambling behaviour. To capitulate on these different clinical aspects using a translational approach we will employ 1) the stop-signal task to measure cognitive control and 2) the rodent gambling task to measure risky decision making. These tasks are instrumental learning tasks which take place in operant chambers outside of the home cage of the animals. Training in each of these tasks takes 2-3 months daily training per task and since both tasks measure different forms of [REDACTED] it is not feasible to test both tasks within the same individuals. Therefore separate groups of animals will be required for each task.

Ad 1) In laboratory settings response inhibition is an often used behavioural measure to assess cognitive control, that is the ability to control one's impulses. The stop-signal task measures response inhibition and requires subjects to inhibit inappropriate responses when certain cues, in this case stop-signals are provided. Briefly, in this task subjects are trained to make a response as quickly as possible once a go stimulus (=visual stimulus) is presented. Occasionally, this go stimulus is followed by a stop stimulus (=auditory stimulus) instructing the subject to withhold making a response. Behavioural performance on these latter stop stimulus trials reflects response inhibition capacities and is the primary measure of the task. Whereas the stop-signal task is designed to primarily tax response inhibition, the task also measures reaction latencies on go trials, prematurely expressed responses before go stimulus presentations and omitted trials. These parameters control for other behavioural alterations such as motivation to participate in the task (omitted trials), general deficits in inhibitory control (prematurely expressed responses) and changes in motor performance (reaction latencies and omitted trials).

Ad 2) The rodent gambling task will be employed to assess risky-decision making. This translational task is adopted from the Iowa gambling task and requires rats to choose between 4 different response options, each one of them is associated with a different size of palatable food pellets and aversive wait periods to receive these pellets. The safe response options are associated with low numbers of food pellets (1 or 2 pellets) and short wait periods, whereas the risky options are associated with higher number of food pellets (3 or 4 pellets) and long wait periods. Optimal performance in this task would be to prefer the safe response options, which result in a net larger win of food pellets. A preference for the risky response options results in a net lower win of food pellets and reflects [REDACTED] deficits.

Estimated number of animals

For the experimental groups receiving dopamine replacement therapy there are 5 Factors: brain pathway (6 pathways) X Virus (DREADD viral vectors: combination of inhibitory and excitatory) X dopamine replacement therapy (levodopa, pramipexole) X Dose (placebo, low dose, high dose) X cognitive task (stop-signal task, gambling task) as indicated in **Table 2**.

During surgery, we will place the rat into the stereotaxic frame and use a needle attached to the stereotact to accurately inject the two viruses (DREADD and target region viral vector) into the specific brain regions (projection and target region). Based on recent work showing successful combination of excitatory and inhibitory DREADDs by multiplexing these different DREADDs within individuals [1], we will also multiplex these DREADDs within the same individuals. This will lead to a tremendous **reduction** in the number of animals used in the project. After recovery, animals will be trained daily in the cognitive tasks and upon establishment of baseline performance, first tests with the DREADD ligands will be conducted in the cognitive tasks, followed by dopamine therapy in combination with DREADD ligands in the cognitive tasks.

Control DREADD virus experiments:

Only in the CSTC pathways in which we observed that DREADD manipulation per se or in combination with DRT induced deficits in [REDACTED] we will conduct the same experiments yet instead of using the DREADD+ target region viral vector, a control viral vector will be used. This in order to control for the expression of the DREADD itself on behavioural performance and the development of ICDS.

Thus, the amount of these control animals required for these experiments is dependent on the outcome of experiments described above. However, we estimate that control animals for a maximum of 3 brain pathways combined with dopamine therapy induce deficits in [REDACTED]

For these control groups receiving dopamine replacement therapy there are 5 Factors: brain pathway (3

pathways) X Virus (DREADD viral vectors: combination of inhibitory and excitatory with control viral vector) X dopamine replacement therapy (levodopa or pramipexole) X Dose (placebo or low dose or high dose) X cognitive task (stop-signal task, gambling task) as indicated in **Table 2**.

PRIMARY OUTCOME PARAMETERS: In these experiments the primary outcome measures are the effects of DREADD manipulation and dopamine therapy on response inhibition (stop-signal task) and risky decision-making (gambling task).

We will sacrifice the animals at the end of the behavioural phase of the experiment for subsequent analyses. This in order to further unravel neurobiological changes that have occurred in the specific brain pathways. We will dissect brains to perform molecular biological or neurophysiological experiments aimed at understanding the neurobiological changes that have occurred in the selected brain pathways upon DREADD manipulation and their interaction with dopamine therapy. Molecular biological experiments will focus on changes in mRNA or protein levels of various neurotransmitter receptors such as, for instance, dopamine receptors. Neurophysiological experiments will focus on functional physiological changes in the selected brain pathways that were targeted with DREADD.

Table 2. Estimated animal numbers in STUDY 2, DREADD + dopamine therapy:

| <i>STUDY 2</i> | <i>Virus injection</i> | <i>Test Drug</i> | <i>N per group</i> | <i>Total N per experiment</i> |
|-------------------------------------|---|--|--------------------|--|
| DREADD and dopamine therapy | Combination inhibitory and excitatory DREADDs (=experimental groups) | DREADD ligand/ levodopa or pramipexole | 20 | 6 CSTC pathway X 1 DREADDs X 2 DRTs X 3 Doses X 2 Tasks X 20 rats = 1440 rats |
| Control DREADD and dopamine therapy | Combination inhibitory and excitatory DREADDs+ control viral vector (=control groups) | DREADD ligand/ levodopa or pramipexole | 20 | Maximal number: 3 CSTC pathway X 1 DREADDs X 2 DRTs X 3 Doses X 2 Tasks X 20 rats = 720 rats Minimal number: 1 CSTC pathway X 1 DREADDs X 1 DRT X 3 doses X 2 Task X 20 rats = 120 rats |

STUDY 3. Objective 1b: Effects of adjuvant pharmacotherapy to suppress dopamine therapy-induced [REDACTED] deficits:

Here to address **objective 1b**, we will assess the effects of adjuvant pharmacotherapy on levodopa- or pramipexole-induced ICDs, in the pathways that have been found to induce onset of [REDACTED] disturbances. We will here focus on the SSRI citalopram, the SNRI atomoxetine and the opioid antagonist naltrexone as adjuvant therapies, given 1) the beneficial effects of these compounds on [REDACTED] and 2) the fact that these compounds are in clinical use.

For the experimental groups receiving dopamine replacement therapy + adjuvant therapy there are 5 Factors: CSTC pathway (6 pathways) X Virus (DREADD virus: combination of inhibitory and excitatory) X

dopamine replacement therapy (levodopa or pramipexole) X Adjuvant (citalopram, atomoxetine, naltrexone) X cognitive task (stop-signal task, gambling task) as indicated in **Table 3**.

PRIMARY OUTCOME PARAMETERS: In these experiments the primary outcome measures are the effects of adjuvant therapy on DREADD + DRT induced deficits in response inhibition (stop-signal task) and risky decision-making (gambling task).

Similar to the ex vivo experiments described in STUDY 2, we will sacrifice the animals at the end of the behavioural phase of the experiment for subsequent analyses. This in order to further unravel neurobiological changes that have occurred in the specific brain pathways. We will dissect brains to perform molecular biological or neurophysiological experiments aimed at understanding the neurobiological changes that have occurred in the selected brain pathways upon DREADD manipulation and their interaction with dopamine therapy. Molecular biological experiments will focus on changes in mRNA or protein levels of various neurotransmitter receptors such as, for instance, dopamine receptors. Neurophysiological experiments will focus on functional physiological changes in the selected brain pathways that were targeted with DREADD.

Table 3: Estimated number of subjects STUDY 3, DREADD, DRT + adjuvant therapy.

| <i>STUDY 3</i> | <i>Virus injection</i> | <i>Test Drugs</i> | <i>N per group</i> | <i>Total N per experiment</i> |
|---|---|---|--------------------|---|
| DREADD,DRT+ Adjuvant on ICD development | Combination inhibitory and excitatory DREADDs | 1.DREADD ligand/ levodopa or pramipexole 2. Adjuvant therapy: vehicle, citalopram, atomoxetine, naltrexone | 20 | Maximal number: 6 CSTC pathway X 1 DREADD X 1 dopamine therapy X 4 Adjuvants X 2 Task X 20 rats = 860 rats Minimal number: 1 CSTC pathway X 1 DREADD X 1 DRT X 4 Adjuvants X 2 Task X 20 rats = 160 rats |

[1] Vardy E, et al (2015) Neuron 86: 936-946.

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

Each rat will undergo surgery, which will occur prior to the beginning of the training in the cognitive tasks. During the surgery we will provide adequate anesthesia and analgesia. After surgery we will monitor weight and general indicators of health such as presence of grooming, porphyrin secretions, etc., for a week.

Following recovery of intracranial viral surgery for DREADDs expression in the selected brain pathways, animals will be trained daily during weekdays in either the rodent stop-signal task or the rodent gambling task until stable baseline performance is achieved. This usually takes 2-3 months of task training to establish stable baseline performance. Training of these tasks takes place in operant chambers which are computer-controlled boxes containing levers, nosepoke units or other (e.g. touchscreen-operated) operanda that the subjects can operate, and visual stimuli and a pellet dispenser that can deliver highly

palatable food pellets. Both of the employed behavioural tasks are rodent analogues of existing human neuropsychological tasks, i.e. the stop-signal task and IOWA gambling task.

In all rats (with the exception of rats in STUDY 1 the pilot DREADD expression experiments) following baseline performance in the cognitive tasks, rats will receive systemic drug injections (subcutaneous or intraperitoneal) prior to a training session with the DREADD ligands to activate the inhibitory or excitatory DREADD pathway. These drug injections are fast (5 – 20 sec) and only cause mild discomfort. There is no off-target pharmacological action of the DREADD ligand, indeed this is a major advantage of the DREADD approach as the ligands only bind to the DREADD receptor. These DREADD ligand experiments will take place over a period of 2-4 weeks, with at least one day of injection-free baseline training days in between and will provide crucial information on whether inhibition or activation of a selected CSTC pathway is able to modulate [REDACTED]

Following these DREADD ligands tests, there will be an injection-free training period of 2-4 weeks, after which dopamine therapy (or dopamine therapy + adjuvant therapy) will commence. During dopamine therapy rats will receive a daily systemic drug injection (subcutaneous or intraperitoneal) with either placebo, levodopa or pramipexole alone (**STUDY 2, objective 1a**) or in combination with adjuvant therapy (**STUDY 3, objective 1b**; citalopram, atomoxetine, naltrexone) prior to training in the cognitive task. Dopamine therapy will last for 21 days, and on selected days during this period (e.g. day 1, 7, 14 and 21) rats will receive an additional injection with the DREADD ligand before the training session. These drug injections are fast (5 – 20 sec) and only causes mild discomfort. In STUDY 3, adjuvant therapy is given simultaneously with dopamine therapy and whenever possible combined within the same syringe and injection.

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

For statistical analysis of the primary outcome measures (response inhibition and risky decision-making), we will use analyses of variance (ANOVA) to determine significant effects between treatment groups and repeated measures ANOVA to statistically test within-subject effects. In case of statistical main effects, appropriate post-hoc comparisons will be conducted (e.g. Student-Newmann-Keuls tests, or paired T-tests).

In our experience, animal behaviour is inherently variable. There is only limited evidence available using the proposed DREADD approach combined with dopamine therapy. Therefore we conducted a power analysis taking into account recent findings employing a DREADD approach. This power analysis estimates that a group size of n=20 per group in order to have sufficient power to detect significant effects. (PARAMETERS power analysis: two-sided tests; Type I error: 5%; Power: 90%; Standard deviation: approximately 30%; Effect size: approximately 35%; Dropout rate: 20%).

In all experiments, the group sizes include the expected number of rats that will be excluded because of experimental factors, such as anatomically misplaced viral injection, rats that do not acquire stable performance in the cognitive tasks, poor health after surgery, etc. In our extensive experience the dropout rate is 20% for one of the aforementioned reasons. By allocating 20 rats per group we can reliably expect to have minimum of 16 rats included for statistical analysis, which is an appropriate number to detect statistically significant effects based on the variability of the proposed work.

B. The animals

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

Although we acknowledge and support the recent guideline by the National Institutes of Health (USA) to use equal numbers of male and female subjects in experimental research, we will use only male rats in the present project. This because, recent studies have indicated that estrus cycle can affect performance in cognitive tasks measuring [REDACTED] [1,2]. In order to control for this variability, we would need to increase the sample sizes if female rats are included. Therefore in order **to reduce** the total number of animals required for the project, the proposed work will be conducted in male rats only.

We are using rats because they have the cognitive capabilities required to understand and perform stably

in the cognitive tasks. Indeed, the rat is the best (and most used) animal to study the psychological and neural mechanisms of [REDACTED]. Because of this it is not possible to study these questions in other species, such as for instance mice.

The rats will be approximately 12 weeks old when we receive them from the certified supplier. The experiments will typically take around 6-7 months to complete from arrival in the animal facility to end of experiment. Rats will be housed socially in pairs.

The estimated numbers are justified in **Table 1, Table 2 and Table 3** as follows:

STUDY 1: Total N=120

STUDY 2: Total N=1560 (minimum) or N=2160 (maximum)

STUDY 3: Total N=160 (minimum) or N=860 (maximum)

TOTAL estimated numbers: N=120 (minimum) or N=3140 (maximum)

[1] Diekhof (2016) Horm Behav 74: 186-193.

[2] Reimers, et al (2014) Front Neurosci 8: 401

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 rat is the best (and most widely used) animal model to study the psychological and neurobiological mechanisms of [REDACTED]. The objectives of this project are to unravel the causal contribution of altered functioning of selected brain pathways and their interaction with dopamine therapy on the onset [REDACTED] disturbances. These experimental questions cannot be addressed in clinical patient populations, because we cannot directly modify functioning of these brain pathways in humans, nor combine this with dopamine therapy. Since the primary outcome measures are behavioural measures, in vitro models are not useful.

REDUCTION: Because of the variability in animal behaviour, reducing the sample size will result in much lower statistical power, potentially leading to ambiguous and non-reproducible results. The current sample sizes in the project are optimized using power analysis and the smallest possible sizes in order to obtain reliable results. Because inclusion of female rats would tremendously increase the number of animals, this project will only include male rats. Also, the inhibitory and excitatory DREADDs will be multiplexed within individuals.

REFINEMENT: We will undertake every effort to reduce the pain and suffering experienced throughout these experiments. Appropriate analgesia and anaesthetics will be used during and after the surgical procedures.

The animals will be monitored after surgery to ensure that recovery occurs as expected. All procedures that have the potential for animal harm (surgery, injections, sacrifice) will be conducted by well-trained and experienced researchers/technicians along standard operating procedures.

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

The rats will be housed in pairs and will be handled prior to training to reduce stress of initial exposure to the operant chambers. Likewise, in case of systemic injections the animals will be handled and habituated to the procedure prior to the injections.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

The experiments in this proposal are using novel DREADD intervention techniques in combination with novel behavioural approaches to study [REDACTED] deficits in rodents. These experiments have not been performed, and this specific combination of approaches is not conducted by other laboratories in the world. In consultation with colleagues in the field, we are the first to take this combined approach to develop a novel animal model mimicking Parkinson's disease.

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.

During the surgeries, we will use standard surgical procedure to reduce pain and suffering. Before the start of the surgery we will provide adequate pain relief. After this, we will induce anaesthesia and maintain the anaesthetised state throughout the surgery. Prior to the skin incision, we will inject (subcutaneous) a local anaesthetic into the incision site. After surgery the animal will be monitored for a

week (recording weight and general indicators of health such as presence of grooming, porphyrin secretions, etc.), and analgesia will be administered if necessary.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

1. Surgeries for the viral infusions will all have an impact on the animals welfare.
2. During training in the cognitive tasks animals will be placed on a mild food restriction procedure
3. During tests with DREADD ligands and dopamine therapy (with or without adjuvant therapy) animals will receive systemic injections.

Explain why these effects may emerge.

1. Because the surgeries involve skin incision and exposing the brain (for virus injection) there is a risk of infection.
2. Apart from earning food in the cognitive tasks, rats will receive additional food daily to maintain a mild food restriction scheme. Without food-restriction, rats are not sufficiently motivated to perform in the cognitive task thereby rendering the reliability of the results. To prevent this, rats are kept on food-restriction during training in the cognitive tasks.
3. Injecting the animals will cause moderate discomfort initially that will reduce as the rat habituates to this experience, yet the discomfort remains. Unfortunately, we have no alternative to reliably deliver the DREADD ligands and dopamine/adjuvant therapy non-invasively.

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

1. Surgeries will be conducted under sterile conditions. Only when, despite these aseptic measures, infections do occur we will treat those animals with antibiotics.
2. Discomfort of drug injections will be alleviated by prior handling and habituation to the procedure. Furthermore, only trained and skilled researchers and technicians will perform the injections thereby minimizing the discomfort caused by the systemic injections. Moreover, whenever possible the different ligands will be combined within a single injection/syringe to reduce the number of injections.

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 observe the rats for the following humane endpoints throughout the experiment:

- Loss of body weight: >20% in 24 hour period.
- Immobility: If on close examination the rat is unable to move around within their homecage
- Poor coat conditions: signs that the rat is not grooming which persist for multiple days
- Tremors/Convulsions
- Self-damage
- Abnormal body posture: Any indication that the rat has suffered an injury which causes them to be unable to maintain normal body posture for an extended period of time

Indicate the likely incidence.

<2%

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 total N=3140 rats that will experience the level of discomfort categorised as 'moderate'. In particular, this will occur at the start of experiments where the surgical procedure will cause moderate discomfort.

Following this animals will undergo behavioural training in the cognitive task which will cause mild discomfort paired with food-restriction which will cause moderate discomfort.

Finally, the systemic injections throughout the experiments will cause mild discomfort.

| Procedure | STUDY# | Duration | Discomfort |
|------------------------------|--------------------|---|-----------------|
| Surgery for DREADD virus | STUDY 1,2,3 | 1 day | Moderate |
| Food restriction | STUDY 2,3 | 5-7 months | Moderate |
| Training in cognitive tasks | STUDY 2,3 | 5-7 months | Mild |
| Systemic injections | STUDY 2,3 | 2-3 months (over this period: total expected injections per rat approximately 40-50) | Mild |
| Cumulative discomfort | STUDY 1,2,3 | | 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 need to analyse the rat brains with 1) immunohistochemistry to verify the expression of the viral mediated DREADDs, 2) molecular biological techniques to study ex vivo molecular changes, 3) neurophysiological techniques to study functional ex vivo physiological changes

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

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

Yes

Format DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer:

11400

2. Titel van het project:

Preventing [REDACTED] disorders in Parkinson's disease: a novel preclinical model

3. Titel van de NTS:

Het voorkomen van [REDACTED] stoornissen in de ziekte van Parkinson: een nieuw preklinisch model

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: 31-01-2017
- aanvraag compleet: 31-01-2017
- in vergadering besproken: 14-02-2017 en 14-03-2017
- anderszins behandeld: *n.v.t.*
- termijnonderbreking(en) van / tot: 15-02-2017 tot 01-03-2017
- besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen: *n.v.t.*
- aanpassing aanvraag: 01-03-2017
- advies aan CCD: 03-04-2017

7. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.

-Datum advies IvD: 31-01-2017

-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: 15-02-2017

- Strekking gestelde vragen: *De inhoud van de NTS moet in overeenstemming worden gebracht met het projectvoorstel. De DEC leden hebben graag meer toelichting bij het diemodel en de treatment. De translatie van het model moet duidelijker naar voren komen, wat wordt er al gedaan in de kliniek? De uitleesparameters zijn onduidelijk, wil men het Parkinson model nabootsen of alleen het effect van de medicijnen? Men moet meer go/no go momenten benoemen. Volgens de DEC kan*

het aantal dieren in de controle groep worden verminderd, de onderbouwing van het aantal dieren moet beter.

- Datum antwoord: 01-03-2017

- 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. Vanwege de aard en hoeveelheid van de vragen is de DEC van mening dat het project terug moet komen tijdens de eerstvolgende DEC vergadering op 14 maart.*

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. *Het project is 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. 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 het bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

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 Wet Natuurbescherming).: n.v.t.*
3. *De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën fundamenteel en translationeel onderzoek zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling. De doelstelling is helder omschreven.*

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.*

De ziekte van Parkinson is een veel voorkomende hersenaandoening die wordt gekenmerkt door ernstige motorische stoornissen veroorzaakt door tekorten in de boodschapperstof dopamine in

de hersenen. De behandeling van de ziekte bestaat meestal uit medicijnen die het tekort aan dopamine in de hersenen aanvullen. Echter kunnen de bijwerkingen van deze medicijnen psychiatrische afwijkingen, zogenaamde ██████████ stoornissen, veroorzaken.

Het directe doel van deze studie is onderzoeken welke hersengebieden verantwoordelijk kunnen zijn voor het ontstaan van ██████████ toornissen na behandeling van dopaminetekorten bij patiënten met de ziekte van Parkinson. En of het gelijktijdig gebruik van een ander medicijn een oplossing kan bieden voor het ontstaan van deze ██████████ toornissen. Het uiteindelijke doel van de studie is deze nieuw verworven kennis toe te kunnen passen voor de ontwikkeling van nieuwe therapeutische behandelingen voor de ziekte van Parkinson waarbij geen ██████████ stoornissen ontstaan.

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 zijn: 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 de betrokken onderzoekers en het betreffende wetenschappelijke veld is: Het vergroten van de wetenschappelijke kennis. Waarden die voor patiënten bevorderd worden: De fundamentele kennis zal bijdragen aan het ontwikkelen van nieuwe therapeutische behandelingen voor patiënten met de ziekte van Parkinson om zo hun kwaliteit van leven te verbeteren.

6. Is er aanleiding voor de DEC om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken?: 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. Licht uw beoordeling toe.

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. Licht uw beoordeling toe.

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 bijdragen aan het beschikbaar komen van nieuwe therapeutische behandelingen voor mensen met de ziekte van Parkinson. De gevraagde looptijd van 5 jaar acht de DEC reëel gezien de opbouw, de grootte van de onderzoeksgroep en de financiële ondersteuning.

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.

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.

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 cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe.

Het ongerief als gevolg van de dierproeven is naar de mening van de DEC door de aanvragers realistisch ingeschat en geclassificeerd.

Het cumulatieve ongerief voor alle dieren is maximaal matig. Tijdens de experimenten zal er sprake zijn van een operatie om de toediening van een virale vector mogelijk te maken en wordt voedsel-restrictie toegepast wat beide leidt tot matig ongerief. Daarnaast zullen de dieren licht ongerief ervaren als gevolg van de cognitieve gedragstaken en de systemische injecties.

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.

De integriteit van de dieren zal worden aangetast omdat de dieren een operatie ondergaan, voedselrestrictie krijgen, gedragstaken uitvoeren, injecties krijgen en omdat de dieren worden gedood.

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.

De criteria voor humane eindpunten zijn goed gedefinieerd. De humane eindpunten zullen worden toegepast, wanneer er duidelijke veranderingen zijn in het gewicht en het gedrag van de dieren of wanneer de dieren niet herstellen na de operatie. Men verwacht de humane eindpunten toe te passen bij minder dan 2% van de dieren. Voordat de dieren meer dan matig ongerief zullen ondervinden worden de humane eindpunten toegepast.

3V's

14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Licht uw beoordeling toe

Het project is in overeenstemming met de vereisten ten aanzien van de vervanging van dierproeven. Het gebruik van proefdier vrije methoden of minder complexe diersoorten is volgens de DEC niet mogelijk.

Hersenaandoeningen zijn zeer complex en het zeer selectief manipuleren van de hersenen om de oorzakelijke verbanden vast te stellen met betrekking tot [REDACTED] stoornissen en dopamine therapie is nog niet mogelijk bij mensen. Deze complexiteit is op dit moment nog niet na te bootsen met het kweken van cellen, daarom is het gebruik van proefdieren noodzakelijk. Daarnaast zullen er gedragstesten worden uitgevoerd, dit is niet mogelijk met celkweek.

De keuze voor het gebruik van ratten is naar het oordeel van de DEC gerechtvaardigd. De rat is de meest gebruikte diersoort in modellen voor [REDACTED]. De gebruikte diermodellen voor [REDACTED] zijn direct afgeleid van neuropsychologische testen voor de mens en beschikken over een grote mate van voorspelbaarheid ten aanzien van het gedrag in mensen.

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.

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. Men zal op meerdere punten in het project een selectie maken, zo zullen vervolg experimenten alleen plaatsvinden als er een duidelijke relatie is gevonden tussen een bepaald hersengebied en [REDACTED] stoornissen.

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 3140 ratten 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. 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.

Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd.

De dieren krijgen tijd om te acclimatiseren, worden sociaal gehuisvest en intensief gemonitord. Passende anesthesie en pijnbestrijding zal de gevolgen van de ingrepen minimaliseren. Alle procedures zullen uitgevoerd worden door ervaren en bekwaam personeel.

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: *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.

In dit project zullen alleen mannelijke ratten worden gebruikt. Recente studies hebben aangegeven dat de oestrus cyclus bij vrouwelijke dieren invloed kan hebben op de prestaties van de dieren in cognitieve taken waarbij ██████████ wordt gemeten (Vriend C, et al (2014) Neurosci Biobehav Rev 38: 60-71 en Weintraub D, et al (2015) Mov Disord 30:121-127). Door mannelijke en vrouwelijke dieren te gebruiken zal de variatie binnen de groepen groter worden en zijn grotere groepen nodig om dezelfde effecten te kunnen aantonen; om deze reden is besloten om alleen mannelijke dieren te gebruiken.

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.

Na het euthanaseren van de dieren zal men het hersenweefsel verzamelen voor verdere analyse. Er wordt een dodingsmethode uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU gebruikt.

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?

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

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 het ontstaan van ██████████ stoornissen na behandeling van dopaminetekorten bij de behandeling van Parkinson, en daarmee het ontwikkelen van nieuwe effectieve therapeutische behandelingen zonder ██████████ stoornissen voor patiënten met de ziekte van Parkinson het gebruik van maximaal 3140 ratten in de dierproef die daarvan maximaal matig 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 de dieren ondervinden maximaal matig ongerief. Dat leidt tot veel nadeel voor deze proefdieren. De waarden voor de betrokken onderzoekers en het en het betreffende wetenschappelijke veld: veel voordeel vanwege de kennisontwikkeling. De waarden die voor de patiënten bevorderd worden: Mogelijk op termijn veel voordeel wanneer de dierproef bijdraagt aan het ter beschikking komen van nieuwe effectieve therapeutische behandelingen zonder [REDACTED] stoornissen.

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 3140 ratten die hiervoor als proefdieren gebruikt worden. Voor het verkrijgen van kennis over [REDACTED] stoornissen gericht op het ontwikkelen van nieuwe therapeutische behandelingen voor de ziekte van Parkinson, 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.

Volgens de DEC rechtvaardigen de doeleinden van dit project het voorgestelde gebruik van dieren. Het doel van deze studie is het verkrijgen van kennis over [REDACTED] stoornissen voor het ontwikkelen van nieuwe therapeutische behandelingen voor Parkinson zonder deze stoornissen als bijwerking. Het verwachte resultaat, in het kader van het beschikbaar komen van nieuwe behandelingen voor patiënten met de ziekte van Parkinson is afgewogen tegen het, als maximaal matig 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 3140 ratten 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 wetenschappelijk en maatschappelijk belang wordt door de DEC ingeschat als substantieel. De resultaten van dit onderzoek zullen informatie geven over [REDACTED] stoornissen en zullen mogelijk bijdragen aan het beschikbaar komen van een effectievere behandeling van Parkinson.

(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 wetenschappelijk en maatschappelijk belang van het onderzoek naar het oordeel van de DEC opweegt tegen het gebruik van maximaal 3140 ratten en het daarbij verwachte matige 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*).

Er is geen dilemma geconstateerd.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUmc) te Amsterdam

T.a.v. [redacted]
[redacted]
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
AVD1140020171289
Bijlagen
2

Datum 6 april 2017
Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 4 april 2017. Het gaat om uw project "Preventing [redacted] disorders in Parkinson's disease: a novel preclinical model". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1140020171289. 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:

6 april 2017

Aanvraagnummer:

AVD1140020171289

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
6 april 2017
Aanvraagnummer:
AVD1140020171289

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:
6 april 2017
Aanvraagnummer:
AVD1140020171289

Gegevens gemachtigde

BSN: [REDACTED]
Naam: [REDACTED]
Adres: [REDACTED]
Postcode en plaats: [REDACTED] AMSTERDAM
Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Ja

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 september 2017
Geplande einddatum: 31 augustus 2022
Titel project: Preventing [REDACTED] disorders in Parkinson's disease: a novel preclinical model
Titel niet-technische samenvatting: Het voorkomen van [REDACTED] stoornissen In de ziekte van Parkinson: een nieuw preklinisch model
Naam DEC: DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum
Postadres DEC: [REDACTED]
1BT Amsterdam / Nederland
E-mailadres DEC: [REDACTED]

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1035,-
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: 3 april 2017

Datum:

6 april 2017

Aanvraagnummer:

AVD1140020171289



> 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
AVD1140020171289

Bijlagen

2

Datum 6 april 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 6 april 2017
Vervaldatum: 6 mei 2017
Factuurnummer: 171289

| Omschrijving | Bedrag |
|---|-----------|
| Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD1140020171289 | € 1035,00 |

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

T.a.v. [REDACTED]

[REDACTED]
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
AVD1140020171289

Datum 14 april 2017
Betreft aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 4 april 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Preventing [REDACTED] disorders in Parkinson's disease: a novel preclinical model" met aanvraagnummer AVD1140020171289. 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

- 1) U beschrijft milde voerrestrictie tijdens training van de cognitieve taken, wat met een matig ongerief gepaard gaat. Kunt u nader specificeren hoe deze voerrestrictie wordt uitgevoerd? (hoeveelheid voer, periodes zonder voer?).
- 2) Het aantal dieren dat u beschrijft in bijlage 3.4.4.1 in tabel 3 lijkt incorrect te zijn ($6 \times 1 \times 1 \times 4 \times 2 \times 20 = 960$ en niet 860). Kunt u dit nakijken en indien nodig aanpassen in zowel de bijlage als 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:

14 april 2017

Aanvraagnummer:

AVD1140020171289

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: Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUmc) te Amsterdam

Adres:

Postcode en plaats:

Aanvraagnummer: AVD1140020171289

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:

14 april 2017

Aanvraagnummer:

AVD1140020171289

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



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.

Parkinson's disease is the second most common neurodegenerative disorder after Alzheimer's disease. It is a progressive disorder, characterized by severe motor symptoms and motor dysfunctions and affects approximately 2% of the population. Whereas our understanding of the etiology of Parkinson's disease

has increased over the last decade, to date there is no curative therapy. One of the underlying causes of Parkinson's disease is degeneration of the brain's dopamine neurotransmitter system. Therefore in Parkinson's disease many of the motor symptoms can be improved by dopamine replacement therapy to boost the activity of the dopamine system. This dopamine replacement therapy consists of chronic treatment with the dopamine precursor levodopa and chronic treatment with dopamine receptor agonists such as pramipexole, or a combination of levodopa and dopamine receptor agonist.

Unfortunately, frequent side-effects of these dopamine replacement therapies are [REDACTED] disorders following onset of the treatment and they pose a major burden on patients, their families and caregivers. It is estimated that [REDACTED] disorders develop in 15% to even up to 25% of patients and commonly include pathological gambling, compulsive sexual behaviour, compulsive buying and binge eating [1,2]. Results of cross-sectional studies have revealed some generic factors associated with an increased risk for [REDACTED] disorders, e.g. young age of onset, trait impulsivity, (family)history of addiction and depression. Nonetheless, current knowledge of the characteristics related to increased susceptibility of developing [REDACTED] disorders is insufficient to adequately predict or prevent these disorders in daily clinical practice. More importantly, the mechanisms underlying the development and the course of [REDACTED] disorders in Parkinson's disease are poorly understood and cannot be directly manipulated in clinical populations.

Also, there is no effective therapy to prevent the onset of [REDACTED] disorders arising with dopamine therapies. Therefore having access to a translational animal model, which unravels the mechanisms and reliably predicts the risk for [REDACTED] disorders when treated with dopamine replacement therapy, will be a valuable model to develop novel or to refine existing pharmacotherapies for Parkinson's disease that do not induce [REDACTED] disorders. Moreover, the availability of such a model will also allow testing of adjuvant pharmacotherapies that alleviate [REDACTED] disorders.

This project aims to **develop a novel translational animal model for Parkinson's disease mimicking the risk to develop [REDACTED] disorders upon dopamine therapy and unraveling the underlying brain mechanisms**. As such, this novel animal model may be utilized as a preclinical tool to facilitate and aid the development of novel pharmacotherapies for Parkinson's disease that do not induce [REDACTED] disorders. Establishing such a model will have a great impact on the field given the sense of urgency from both clinicians as well as patients. In addition, if this novel model is successful another aim is to test whether adjuvant therapy reduces the risk to develop [REDACTED] disorders.

Previous and current work using different approaches to mimic Parkinson's disease pathology in animals, including 6-OHDA lesions and alpha-synuclein viral overexpression, have indeed demonstrated development of [REDACTED] deficits and altered responsivity to dopamine therapies. However, the interventions in such animal models are irreversible, invasive by inducing permanent brain damage and lack specific or temporal control over relevant brain pathways.

To address these limitations, this project will take advantage of recent technological advances to highly selectively and temporally-precise manipulate and uncover crucial brain pathways that could drive the risk for [REDACTED] disorder development in Parkinson's disease. This will be achieved by the novel innovative chemogenetic approach called designer-receptors exclusively activated by designer drugs (DREADD) to mimic Parkinson-related pathology in cortico-striato-thalamo-cortical brain pathways, since these pathways are thought to underlie the risk to develop [REDACTED] disorders [3]. The DREADD approach will be further specified in **paragraph 3.4** (Research Strategy). First, we will combine DREADD with dopamine therapy in the same animals performing cognitive tasks that capture [REDACTED] deficits as a proxy to mimic clinical [REDACTED] disorders in Parkinson's disease. Second, upon establishing this animal model, we will study the effects of adjuvant pharmacotherapy to ameliorate dopamine therapy-induced [REDACTED] disorders.

[1] Vriend C, et al (2014) *Neurosci Biobehav Rev* 38: 60-71.

[2] Weintraub D, et al (2015) *Mov Disord* 30:121-127.

[3] Gerfen CR and Surmeier DJ (2011) *Ann Rev Neurosci* 34: 441-466.

3.2 Purpose

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

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

The **main purpose and objective** of this project is to develop a novel translational animal model that mimics the risk of developing [REDACTED] disorders after dopamine therapy as a preclinical animal model to facilitate and aid the development of novel pharmacotherapies without the risk of disturbed [REDACTED]

In line with this main objective, the specific sub-objectives are:

Objective 1a: To establish differential effects of dopamine agonist therapy on DREADD modulation of cortico-striato-thalamo-cortical brain pathways as a proxy and proof-of-concept to mimic clinical [REDACTED] disorders in Parkinson's disease

For this sub-objective, we will address the causal involvement of manipulating specific neural brain pathways in the onset of [REDACTED] disturbances. Furthermore, we will address the question which dopamine agonist monotherapy, levodopa or pramipexole, is most likely to induce deficits in [REDACTED] after subchronic treatment. Levodopa and pramipexole are different classes of dopamine therapy and clinically might possess subtle differences in the risk for onset of [REDACTED] disorder. Therefore, it is important to test both compounds in our novel animal model, since our model allows to further dissect the causal effects of levodopa or pramipexole treatment and their differences on deficits in [REDACTED]

Objective 1b: Effects of adjuvant pharmacotherapy to suppress dopamine therapy-induced [REDACTED] deficits

For this sub-objective, we will address the question whether adjuvant treatment, on top of the dopamine therapy that has the most pronounced risk to develop impulsivity, is able to suppress these effects of dopamine therapy on [REDACTED] deficits. More specifically, we will focus here on three different classes of clinically-used drugs as adjuvant therapies, namely 1) the antidepressant drug and selective serotonin reuptake inhibitor citalopram; 2) the anti-ADHD drug and selective norepinephrine reuptake inhibitor atomoxetine; and 3) the opioid antagonist naltrexone. These drugs are selected, since they have demonstrated to possess beneficial effects on [REDACTED] under different circumstances in both rats and humans, and therefore seem promising candidates as an adjuvant therapy in the clinic. However, none of these three classes of drugs have the indication Parkinson's disease, and moreover to our knowledge have not been prescribed as adjuvant therapy to dopamine replacement therapy. Therefore, our study will provide important information regarding the effectivity and applicability of this approach.

The work described in this project will be funded by an international peer-reviewed research grant from a non-profit organization that funds research into the etiology and treatment of neurodegenerative disorders including Parkinson's Disease.

The main objective and sub-objectives of the project are **achievable**, since:

- 1) we have ample experience using DREADD as a methodology for neural interventions that are crucial to increase our understanding of the brain pathways involved
- 2) we have a strong track-record and experience in translational cognitive tasks capturing [REDACTED] deficits, documented by many scientific papers in international journals
- 3) our facility has adequate numbers of operant chambers to run the cognitive tasks and housing facilities for the project
- 4) in addition to research technicians who will run part of the experiments, the research grant allows hiring full time staff at the postdoctoral level to complete all of these experiments within the time-frame of the project
- 5) all of the equipment needed for DREADD approaches is already present and the viral vectors needed are commercially available, in addition to the pharmacotherapies which are commercially available

3.3 Relevance

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

Scientific relevance

Randomized clinical trials are highly costly and lengthy in duration, therefore having access to a translational preclinical model which reliably predicts [REDACTED] disturbances following dopamine therapy will be a valuable model that will aid the development of novel or refinement of existing pharmacotherapies for Parkinson's disease without the risk to induce deficits in [REDACTED]

Furthermore, the DREADD approach of circuit-relevant and temporal specific manipulation of neural pathways will allow unique insights into the aetiology and mechanisms of [REDACTED] disorder development beyond the currently existing Parkinson's disease animal models and beyond what can be studied in clinical populations.

Social relevance

Despite the clinical efficacy of dopamine therapy in ameliorating motor symptoms in Parkinson's disease, there is no effective intervention to prevent the onset of potential deficits in [REDACTED] arising with pharmacotherapy. Given the tremendous burden of [REDACTED] disorders on patients, their families and caregivers, novel (adjuvant) pharmacotherapies that do not cause disturbances in [REDACTED] are highly needed. The experiments described in this project are intended to aid the development of such novel (adjuvant) pharmacotherapies for Parkinson's disease.

3.4 Research strategy

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

Objective 1a: To establish differential effects of dopamine agonist therapy on DREADD modulation of cortico-striato-thalamo-cortical brain pathways as a proxy and proof-of-concept to mimic clinical [REDACTED] disorders in Parkinson's disease

To address **objective 1a** and to mimic altered cortico-striato-thalamo-cortical brain pathway functioning as a way to mimic Parkinson pathology, we will employ an innovative retro-DREADD procedure [1], which permits remote control of specific neural pathways. Essentially, DREADDs (engineered G protein-coupled receptors) are targeted to specific neuronal populations using viral-vector mediated gene transfer and can be transiently activated by a synthetic pharmacological agent, that is otherwise inert. As such, DREADD provides the unique opportunity to selectively and transiently activate or silence these brain pathways and to determine their functional relevance in freely moving animals performing in cognitive tasks. This will allow unique insights into the aetiology and mechanisms of [REDACTED] disorder development beyond the currently existing Parkinson's disease animal models and beyond what can be studied in clinical populations.

Given the specific importance of the ventral cortico-striato-thalamo-cortical circuit in onset of [REDACTED] disorders, we use a dual-virus strategy to target defined neural circuits. For this, we first inject into the target region (e.g. NAc) a viral vector that is transported in a retrograde direction back to the projecting region (e.g. mPFC). In the projection region, we inject another virus that encodes the DREADD, but does not express this receptor unless the other viral vector is present. Therefore, DREADD expression is restricted to neurons defined by their circuit connectivity. With this approach, we can study the contribution of specific cortico-striato-thalamo-cortical brain pathways in mediating the effect of dopamine therapy on the onset of [REDACTED] deficits. The projections we aim to study are depicted in **Figure 1**, and in different groups of rats we will inject a combination of the excitatory and inhibitory DREADD virus [2] into the projection brain area and inject the other viral vector in the target region of this brain area within the same animals.

Following inhibitory or excitatory DREADD expression, animals will be trained in translational cognitive tasks including the rodent stop-signal task measuring cognitive control and a rodent gambling task measuring risk-based decision-making as a proxy of [REDACTED] deficits. Upon stable baseline performance, we will probe altered brain pathway functioning on cognitive control/ risk-based decisions and motor function by DREADD activation using systemic administration of DREADD ligands to either inhibit or activate the pathways under investigation. These experiments will unravel whether manipulation of specific brain pathways to mimic Parkinson pathology already induces [REDACTED] deficits.

Following these tests, while still trained in the cognitive tasks on a daily basis, dopamine therapy will start and animals will receive subchronic levodopa treatment or pramipexole treatment for 21 days and on days 1, 7, 14 and 21 we will additionally administer the DREADD ligands to assess the interaction between dopamine therapy and altered cortico-striato-thalamo-cortical brain pathway connectivity on

deficits.

Based on the outcomes of these experiments we will select the specific cortico-striato-thalamo-cortical brain pathways which in combination with dopamine therapy (either levodopa or pramipexole treatment) are most likely to induce deficits in [REDACTED] in order to further address **objective 1b**.

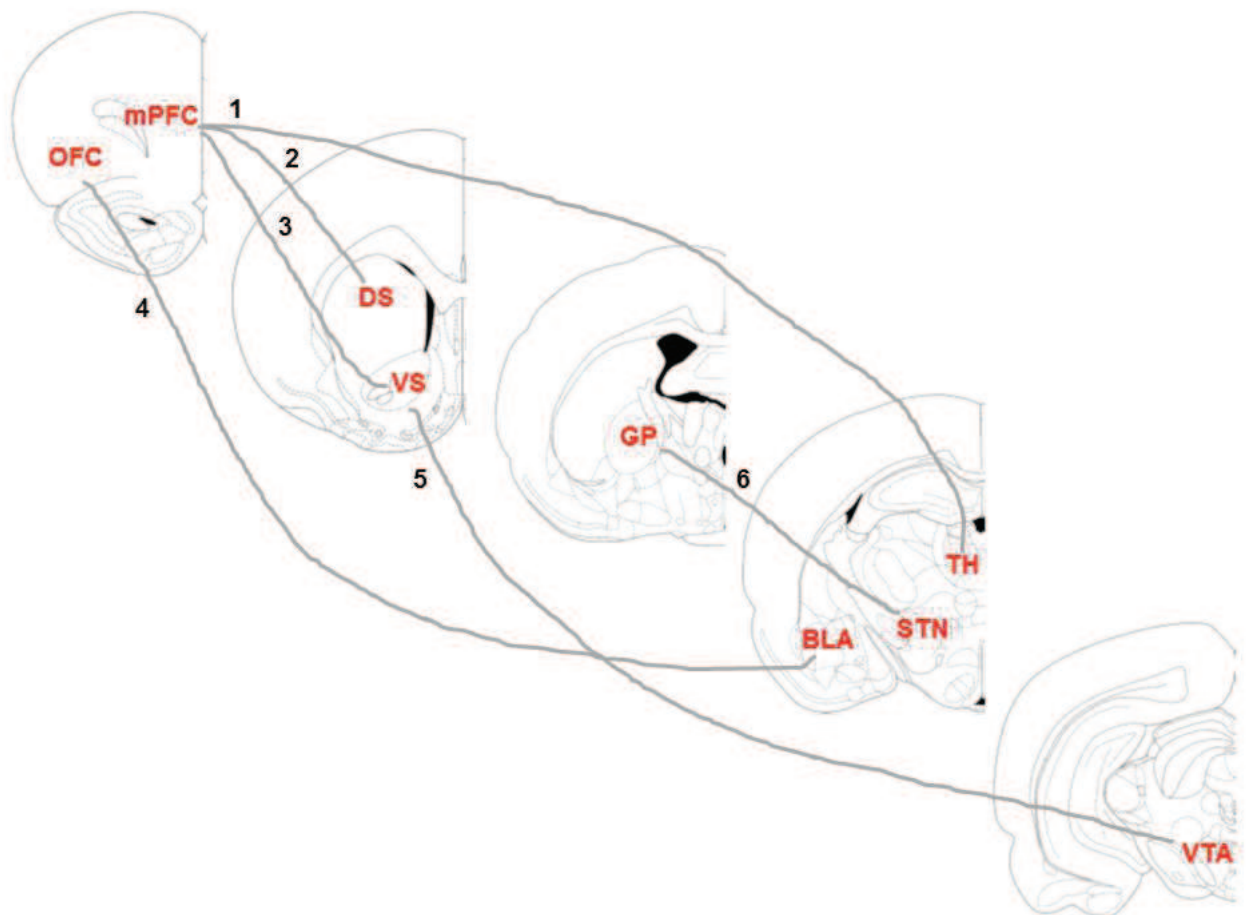


Figure 1. Schematic depiction of the different cortico-striato-thalamo-cortical brain pathways that will be targeted in the project. 1) thalamus to mPFC; 2) mPFC to dorsal striatum, DS; 3) mPFC to ventral striatum, VS; 4) orbitofrontal cortex, OFC, to basolateral amygdala, BLA; 5) ventral tegmental area, VTA, to VS; 6) subthalamic nucleus, STN, to globus pallidus, GP. Depicted are coronal sections of the rat brain [adapted from 3].

Objective 1b: Effects of adjuvant pharmacotherapy to suppress dopamine therapy-induced [REDACTED] deficits

In this set of experiments, we will assess the effects of adjuvant pharmacotherapy on levodopa- or pramipexole-induced disturbances in [REDACTED] in the pathways that have been found to be most importantly involved in the onset of these disturbances. We will here focus on the SSRI citalopram, the SNRI atomoxetine and the opioid antagonist naltrexone as adjuvant therapies, given 1) the beneficial effects of these compounds on [REDACTED] and 2) the fact that these compounds are in clinical use. If successful, this will indicate that the model has immense potential for follow-up experiments to search for novel pharmacotherapies to treat Parkinson's disease without the risk of developing deficits in [REDACTED].

[1] Marchant NJ, et al (2016) Neuropsychopharmacology 41: 402-409.

[2] Vardy E, et al (2015) Neuron 86: 936-946.

[3] Paxinos and Watson (1998) Academic Press Ltd.

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.

As described in **paragraph 3.4** (Research Strategy), all animals in the experiments described in **both objective 1a and objective 1b** will undergo the same procedures and will be tested in each of the different components of the project following the same time-line, namely 1) viral expression of inhibitory or excitatory DREADD will be established in all animals; 2) animals will be trained in the cognitive tasks until baseline performance; 3) animals will receive pharmacological treatments with DREADD ligands and dopamine therapy (**objective 1a**) or DREADD ligands, dopamine therapy and adjuvant therapy (**objective 1b**) and 4) ex vivo analyses following behavioural testing.

Ad 1. Viral DREADDs expression:

To incorporate inhibitory or excitatory DREADDs to manipulate relevant brain pathways, viral vectors that travel along axons need to be expressed in relevant brain regions. For this, we will perform intracranial viral surgery prior to the cognitive testing. Then following recovery, animals will be trained in the cognitive tasks as described below. The primary outcome measures of viral DREADDs expression are sufficient levels of viral vector expression. This will be determined in study 1.

Ad 2. Cognitive tasks measuring [REDACTED] deficits:

Following recovery of the intracranial viral surgery for DREADD and viral vector expression in the selected brain pathways, animals will be trained daily during weekdays in either the rodent stop-signal task or the rodent gambling task until stable baseline performance is achieved. Training of these tasks takes place in operant chambers which are computer-controlled boxes containing levers, nosepoke units or other operanda that the subjects can operate, and visual stimuli and a pellet dispenser that can deliver small highly palatable food pellets. Both of the employed tasks are rodent analogues of existing human neuropsychological tasks, i.e. the stop-signal task and IOWA gambling task. Briefly, in the rodent stop-signal task subjects are trained to make a response as quickly as possible once a go stimulus (=visual stimulus) is presented to earn a reward. Occasionally, this go stimulus is followed by a stop stimulus (=auditory stimulus) instructing the subject to withhold making a response. Successful inhibition upon stop stimulus presentation also leads to reward. Behavioural performance on these latter stop stimulus trials reflects response inhibition capacities and is the primary measure of the task. Poor response inhibition capacities in the task reflect [REDACTED] deficits. In the rodent gambling task, that measures risky decision-making, rats are allowed to choose between 4 different response options, each one of them is associated with a different size of palatable food pellets and aversive wait periods to receive these pellets. There are 2 safe response options which are associated with low numbers of food pellets (1 or 2 pellets) and short wait periods. In contrast, the risky response options are associated with higher number of food pellets (3 or 4 pellets) and long wait periods. Optimal performance in this task would be to prefer the safe response options, which result in a nett larger win of food pellets. A preference for the risky response options results in a nett lower win of food pellets and reflects [REDACTED] deficits. Primary outcome measure of these cognitive tasks is stable baseline performance in terms of response inhibition (stop-signal task) and risky decision-making (gambling task).

Ad 3. Pharmacological manipulation with DREADD ligands, dopamine therapy and adjuvant pharmacotherapy:

Upon stable baseline performance, before and during dopamine therapy we will probe altered brain pathway functioning on cognitive control/ risk-based decisions and motor function by DREADD activation using systemic administration of DREADD ligands. For subchronic dopamine therapy with either levodopa or pramipexole (**objective 1a**) or the combination of dopamine therapy with adjuvant therapy (**objective 1b**), animals will receive a single dose of the drug which will be administered peripherally once daily before testing in the cognitive tasks for 21 subsequent days. For both levodopa and pramipexole as DRT both a low and high dose will be tested in different groups using a between-subjects design. Adjuvant therapy consists of either the SSRI citalopram, the SNRI atomoxetine and the opioid antagonist naltrexone.

In these experiments, the primary outcome measures are the effects of DREADD manipulation and dopamine therapy alone or combined with adjuvant pharmacotherapy on response inhibition (stop-signal task) and risky decision-making (gambling task).

Ad 4. Ex vivo analyses

We will sacrifice the animals at the end of the behavioural phase of experiments for subsequent ex vivo analyses. This in order to further unravel neurobiological changes that have occurred in the specific brain pathways. We will dissect brains to perform molecular biological or neurophysiological experiments aimed at understanding the neurobiological changes that have occurred in the selected brain pathways upon DREADD manipulation and their interaction with dopamine therapy. Molecular biological experiments will focus on changes in mRNA or protein levels of various neurotransmitter receptors such as, for instance, dopamine receptors as primary outcome measures. Neurophysiological experiments will focus on functional physiological changes in the selected brain pathways that were targeted with DREADD as primary outcome measures.

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

The coherence between the different components and steps of the project is depicted in **Figure 2**.



Figure 2. Outline of decision points where animals will be used or not depending on the outcome of experiments. Note that only the maximum estimated numbers of animals within each study are depicted.

STUDY 1 (Milestone 1):

In order to optimize the expression levels of the inhibitory or excitatory DREADD virus and viral vector in the target region, we will first conduct pilot studies, in which we intracranially express these viruses. These studies we will determine the optimal conditions for DREADD expression and viral vector expression in the different cortico-striato-thalamo-cortical pathways.

STUDY 2 (Milestone 2):

To address **objective 1a**, we will combine inhibitory and excitatory DREADDs in different brain pathways

with either levodopa or pramipexole to develop a novel animal model to study deficits in [REDACTED] in Parkinson's disease. Thus this novel model aims to elucidate altered brain pathways that combined with dopamine therapy induce disturbed [REDACTED] as a proxy of [REDACTED] disorders in Parkinson's disease. Therefore, we will perform experiments described under this objective to pinpoint which combination of brain pathway DREADD manipulation and dopamine therapy is most powerful to evoke and to mimic [REDACTED] deficits.

STUDY 3 (Milestone 3):

To address **objective 1b**, we will test whether adjuvant pharmacotherapy (citalopram, atomoxetine and naltrexone) is capable of suppressing and preventing the onset of deficits in [REDACTED] after dopamine therapy. Here we will only study the DREADD brain pathways and dopamine therapy combinations that have induced [REDACTED] deficits. As such, the number of experiments and subjects required here depends on the results of the second series. We will test all three different adjuvant pharmacotherapies in these selected relevant DREADD brain pathways and dopamine therapy combinations.

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 | DREADD expression and pharmacotherapeutic interventions during behaviour |
| 2 | |
| 3 | |
| 4 | |
| 5 | |
| 6 | |
| 7 | |
| 8 | |
| 9 | |
| 10 | |



Appendix Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website (www.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'. | 11400 | |
| 1.2 Provide the name of the licenced establishment. | VUmc | |
| 1.3 List the serial number and type of animal procedure. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i> | Serial number 1 | Type of animal procedure DREADD expression and pharmacotherapeutic interventions during behaviour |

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 outline of the experiments of the project is depicted below in **Figure 1**.

STUDY 1



STUDY 2



STUDY 3



Figure 1. General outline of experiments. **STUDY 1:** Pilot studies for optimizing DREADD expression in selected brain pathways. **STUDY 2:** DREADD in selected brain pathways combined with dopamine therapy alone to study onset of deficits in [REDACTED] **STUDY 3:** DREADD in selected brain pathways combined with dopamine therapy + adjuvant therapy to ameliorate deficits in [REDACTED]

STUDY 1. Pilot studies to optimize DREADD expression in selected brain pathways

In order to develop a novel animal model mimicking the pathology of Parkinson’s disease, we use a dual-virus strategy to target specific cortico-striato-thalamo-cortical brain pathways. For this, we first inject into the target region (e.g. NAc) a viral vector that is transported in a retrograde direction back to the projecting region (e.g. mPFC). In the projection region, we inject a virus that encodes the DREADD, but does not express this receptor the viral vector is present. Therefore, DREADD expression is restricted to neurons defined by their circuit connectivity. With this approach, we can study the contribution of different brain pathways in mediating the effect of DRT on ICD development.

Prior to conducting the behavioural experiments, we will optimize the viral expression patterns of the DREADD constructs in each of the selected brain pathways in pilot studies before we proceed with this pathway in the behavioural experiments. As shown in **Table 1**, for these pilot studies there are 2 Factors: brain pathway (6 pathways) X Virus (DREADD virus: inhibitory or excitatory).

During two surgeries, we will place the rat into the stereotaxic frame and use a needle attached to the stereotact to accurately inject the two viral vectors (DREADD and target region viral vector) into the specific brain regions (projection and target region). After recovery and a waiting period of approximately 4-8 weeks to allow sufficient DREADD expression, animals will be sacrificed to determine viral expression patterns in brain tissue.

PRIMARY OUTCOME PARAMETERS: The primary outcome of these pilot studies is the level of DREADD expression and target region viral vector expression in the selected brain pathways. These expression levels should be sufficient in order to continue with the behavioural experiments.

Table 1. Estimated animal numbers in STUDY 1, pilots for DREADD expression

| <i>STUDY 1</i> | <i>Virus injection</i> | <i>Test Drug</i> | <i>N per group</i> | <i>Total N per experiment</i> |
|--|---|------------------|--------------------|---|
| Pilot infusions DREADD in selected brain pathways for sufficient expression levels | Inhibitory and excitatory DREADDs +target region viral vector | none | 10 | 2 DREADDs X 6 CSTC pathways X 10 rats = 120 rats |

STUDY 2. Objective 1a: Differential effects of dopamine agonist therapy on DREADD modulation of cortico-striato-thalamo-cortical brain pathways as a proxy and proof-of-concept to mimic clinical [REDACTED] disorders in Parkinson’s disease

Here we will combine DREADD in different cortico-striato-thalamo-cortical circuits with either levodopa or pramipexole dopamine therapy in animals that are trained in the stop-signal task to measure response inhibition, or a gambling task to measure risky decision-making. This in order to unravel the underlying brain pathways and mechanisms as a novel model to mimic [REDACTED] disorders in Parkinson’s disease.

Description of the cognitive tasks:

In Parkinson’s disease, deficits in [REDACTED] are characterized by an inability to suppress certain (inappropriate) impulses that may lead to maladaptive behaviour including hypersexuality, compulsive

buying and gambling behaviour. To capitulate on these different clinical aspects using a translational approach we will employ 1) the stop-signal task to measure cognitive control and 2) the rodent gambling task to measure risky decision making. These tasks are instrumental learning tasks which take place in operant chambers outside of the home cage of the animals. Training in each of these tasks takes 2-3 months daily training per task and since both tasks measure different forms of [REDACTED] it is not feasible to test both tasks within the same individuals. Therefore separate groups of animals will be required for each task.

Ad 1) In laboratory settings response inhibition is an often used behavioural measure to assess cognitive control, that is the ability to control one's impulses. The stop-signal task measures response inhibition and requires subjects to inhibit inappropriate responses when certain cues, in this case stop-signals are provided. Briefly, in this task subjects are trained to make a response as quickly as possible once a go stimulus (=visual stimulus) is presented. Occasionally, this go stimulus is followed by a stop stimulus (=auditory stimulus) instructing the subject to withhold making a response. Behavioural performance on these latter stop stimulus trials reflects response inhibition capacities and is the primary measure of the task. Whereas the stop-signal task is designed to primarily tax response inhibition, the task also measures reaction latencies on go trials, prematurely expressed responses before go stimulus presentations and omitted trials. These parameters control for other behavioural alterations such as motivation to participate in the task (omitted trials), general deficits in inhibitory control (prematurely expressed responses) and changes in motor performance (reaction latencies and omitted trials).

Ad 2) The rodent gambling task will be employed to assess risky-decision making. This translational task is adopted from the Iowa gambling task and requires rats to choose between 4 different response options, each one of them is associated with a different size of palatable food pellets and aversive wait periods to receive these pellets. The safe response options are associated with low numbers of food pellets (1 or 2 pellets) and short wait periods, whereas the risky options are associated with higher number of food pellets (3 or 4 pellets) and long wait periods. Optimal performance in this task would be to prefer the safe response options, which result in a net larger win of food pellets. A preference for the risky response options results in a net lower win of food pellets and reflects [REDACTED] deficits.

Estimated number of animals

For the experimental groups receiving dopamine replacement therapy there are 5 Factors: brain pathway (6 pathways) X Virus (DREADD viral vectors: combination of inhibitory and excitatory) X dopamine replacement therapy (levodopa, pramipexole) X Dose (placebo, low dose, high dose) X cognitive task (stop-signal task, gambling task) as indicated in **Table 2**.

During surgery, we will place the rat into the stereotaxic frame and use a needle attached to the stereotact to accurately inject the two viruses (DREADD and target region viral vector) into the specific brain regions (projection and target region). Based on recent work showing successful combination of excitatory and inhibitory DREADDs by multiplexing these different DREADDs within individuals [1], we will also multiplex these DREADDs within the same individuals. This will lead to a tremendous **reduction** in the number of animals used in the project. After recovery, animals will be trained daily in the cognitive tasks and upon establishment of baseline performance, first tests with the DREADD ligands will be conducted in the cognitive tasks, followed by dopamine therapy in combination with DREADD ligands in the cognitive tasks.

Control DREADD virus experiments:

Only in the CSTC pathways in which we observed that DREADD manipulation per se or in combination with DRT induced deficits in [REDACTED] we will conduct the same experiments yet instead of using the DREADD+ target region viral vector, a control viral vector will be used. This in order to control for the expression of the DREADD itself on behavioural performance and the development of ICDS.

Thus, the amount of these control animals required for these experiments is dependent on the outcome of experiments described above. However, we estimate that control animals for a maximum of 3 brain pathways combined with dopamine therapy induce deficits in [REDACTED]

For these control groups receiving dopamine replacement therapy there are 5 Factors: brain pathway (3

pathways) X Virus (DREADD viral vectors: combination of inhibitory and excitatory with control viral vector) X dopamine replacement therapy (levodopa or pramipexole) X Dose (placebo or low dose or high dose) X cognitive task (stop-signal task, gambling task) as indicated in **Table 2**.

PRIMARY OUTCOME PARAMETERS: In these experiments the primary outcome measures are the effects of DREADD manipulation and dopamine therapy on response inhibition (stop-signal task) and risky decision-making (gambling task).

We will sacrifice the animals at the end of the behavioural phase of the experiment for subsequent analyses. This in order to further unravel neurobiological changes that have occurred in the specific brain pathways. We will dissect brains to perform molecular biological or neurophysiological experiments aimed at understanding the neurobiological changes that have occurred in the selected brain pathways upon DREADD manipulation and their interaction with dopamine therapy. Molecular biological experiments will focus on changes in mRNA or protein levels of various neurotransmitter receptors such as, for instance, dopamine receptors. Neurophysiological experiments will focus on functional physiological changes in the selected brain pathways that were targeted with DREADD.

Table 2. Estimated animal numbers in STUDY 2, DREADD + dopamine therapy:

| <i>STUDY 2</i> | <i>Virus injection</i> | <i>Test Drug</i> | <i>N per group</i> | <i>Total N per experiment</i> |
|-------------------------------------|---|--|--------------------|--|
| DREADD and dopamine therapy | Combination inhibitory and excitatory DREADDs (=experimental groups) | DREADD ligand/ levodopa or pramipexole | 20 | 6 CSTC pathway X 1 DREADDs X 2 DRTs X 3 Doses X 2 Tasks X 20 rats = 1440 rats |
| Control DREADD and dopamine therapy | Combination inhibitory and excitatory DREADDs+ control viral vector (=control groups) | DREADD ligand/ levodopa or pramipexole | 20 | Maximal number: 3 CSTC pathway X 1 DREADDs X 2 DRTs X 3 Doses X 2 Tasks X 20 rats = 720 rats Minimal number: 1 CSTC pathway X 1 DREADDs X 1 DRT X 3 doses X 2 Task X 20 rats = 120 rats |

STUDY 3. Objective 1b: Effects of adjuvant pharmacotherapy to suppress dopamine therapy-induced [REDACTED] deficits:

Here to address **objective 1b**, we will assess the effects of adjuvant pharmacotherapy on levodopa- or pramipexole-induced ICDs, in the pathways that have been found to induce onset of [REDACTED] disturbances. We will here focus on the SSRI citalopram, the SNRI atomoxetine and the opioid antagonist naltrexone as adjuvant therapies, given 1) the beneficial effects of these compounds on [REDACTED] and 2) the fact that these compounds are in clinical use.

For the experimental groups receiving dopamine replacement therapy + adjuvant therapy there are 5 Factors: CSTC pathway (6 pathways) X Virus (DREADD virus: combination of inhibitory and excitatory) X

dopamine replacement therapy (levodopa or pramipexole) X Adjuvant (citalopram, atomoxetine, naltrexone) X cognitive task (stop-signal task, gambling task) as indicated in **Table 3**.

PRIMARY OUTCOME PARAMETERS: In these experiments the primary outcome measures are the effects of adjuvant therapy on DREADD + DRT induced deficits in response inhibition (stop-signal task) and risky decision-making (gambling task).

Similar to the ex vivo experiments described in STUDY 2, we will sacrifice the animals at the end of the behavioural phase of the experiment for subsequent analyses. This in order to further unravel neurobiological changes that have occurred in the specific brain pathways. We will dissect brains to perform molecular biological or neurophysiological experiments aimed at understanding the neurobiological changes that have occurred in the selected brain pathways upon DREADD manipulation and their interaction with dopamine therapy. Molecular biological experiments will focus on changes in mRNA or protein levels of various neurotransmitter receptors such as, for instance, dopamine receptors. Neurophysiological experiments will focus on functional physiological changes in the selected brain pathways that were targeted with DREADD.

Table 3: Estimated number of subjects STUDY 3, DREADD, DRT + adjuvant therapy.

| <i>STUDY 3</i> | <i>Virus injection</i> | <i>Test Drugs</i> | <i>N per group</i> | <i>Total N per experiment</i> |
|---|---|---|--------------------|---|
| DREADD,DRT+ Adjuvant on ICD development | Combination inhibitory and excitatory DREADDs | 1.DREADD ligand/ levodopa or pramipexole 2. Adjuvant therapy: vehicle, citalopram, atomoxetine, naltrexone | 20 | Maximal number: 6 CSTC pathway X 1 DREADD X 1 dopamine therapy X 4 Adjuvants X 2 Task X 20 rats = 960 rats Minimal number: 1 CSTC pathway X 1 DREADD X 1 DRT X 4 Adjuvants X 2 Task X 20 rats = 160 rats |

[1] Vardy E, et al (2015) Neuron 86: 936-946.

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

Each rat will undergo surgery, which will occur prior to the beginning of the training in the cognitive tasks. During the surgery we will provide adequate anesthesia and analgesia. After surgery we will monitor weight and general indicators of health such as presence of grooming, porphyrin secretions, etc., for a week.

Following recovery of intracranial viral surgery for DREADDs expression in the selected brain pathways, animals will be trained daily during weekdays in either the rodent stop-signal task or the rodent gambling task until stable baseline performance is achieved. This usually takes 2-3 months of task training to establish stable baseline performance. Training of these tasks takes place in operant chambers which are computer-controlled boxes containing levers, nosepoke units or other (e.g. touchscreen-operated) operanda that the subjects can operate, and visual stimuli and a pellet dispenser that can deliver highly

palatable food pellets. Both of the employed behavioural tasks are rodent analogues of existing human neuropsychological tasks, i.e. the stop-signal task and IOWA gambling task.

In all rats (with the exception of rats in STUDY 1 the pilot DREADD expression experiments) following baseline performance in the cognitive tasks, rats will receive systemic drug injections (subcutaneous or intraperitoneal) prior to a training session with the DREADD ligands to activate the inhibitory or excitatory DREADD pathway. These drug injections are fast (5 – 20 sec) and only cause mild discomfort. There is no off-target pharmacological action of the DREADD ligand, indeed this is a major advantage of the DREADD approach as the ligands only bind to the DREADD receptor. These DREADD ligand experiments will take place over a period of 2-4 weeks, with at least one day of injection-free baseline training days in between and will provide crucial information on whether inhibition or activation of a selected CSTC pathway is able to modulate [REDACTED]

Following these DREADD ligands tests, there will be an injection-free training period of 2-4 weeks, after which dopamine therapy (or dopamine therapy + adjuvant therapy) will commence. During dopamine therapy rats will receive a daily systemic drug injection (subcutaneous or intraperitoneal) with either placebo, levodopa or pramipexole alone (**STUDY 2, objective 1a**) or in combination with adjuvant therapy (**STUDY 3, objective 1b**; citalopram, atomoxetine, naltrexone) prior to training in the cognitive task. Dopamine therapy will last for 21 days, and on selected days during this period (e.g. day 1, 7, 14 and 21) rats will receive an additional injection with the DREADD ligand before the training session. These drug injections are fast (5 – 20 sec) and only causes mild discomfort. In STUDY 3, adjuvant therapy is given simultaneously with dopamine therapy and whenever possible combined within the same syringe and injection.

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

For statistical analysis of the primary outcome measures (response inhibition and risky decision-making), we will use analyses of variance (ANOVA) to determine significant effects between treatment groups and repeated measures ANOVA to statistically test within-subject effects. In case of statistical main effects, appropriate post-hoc comparisons will be conducted (e.g. Student-Newmann-Keuls tests, or paired T-tests).

In our experience, animal behaviour is inherently variable. There is only limited evidence available using the proposed DREADD approach combined with dopamine therapy. Therefore we conducted a power analysis taking into account recent findings employing a DREADD approach. This power analysis estimates that a group size of n=20 per group in order to have sufficient power to detect significant effects. (PARAMETERS power analysis: two-sided tests; Type I error: 5%; Power: 90%; Standard deviation: approximately 30%; Effect size: approximately 35%; Dropout rate: 20%).

In all experiments, the group sizes include the expected number of rats that will be excluded because of experimental factors, such as anatomically misplaced viral injection, rats that do not acquire stable performance in the cognitive tasks, poor health after surgery, etc. In our extensive experience the dropout rate is 20% for one of the aforementioned reasons. By allocating 20 rats per group we can reliably expect to have minimum of 16 rats included for statistical analysis, which is an appropriate number to detect statistically significant effects based on the variability of the proposed work.

B. The animals

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

Although we acknowledge and support the recent guideline by the National Institutes of Health (USA) to use equal numbers of male and female subjects in experimental research, we will use only male rats in the present project. This because, recent studies have indicated that estrus cycle can affect performance in cognitive tasks measuring [REDACTED] [1,2]. In order to control for this variability, we would need to increase the sample sizes if female rats are included. Therefore in order **to reduce** the total number of animals required for the project, the proposed work will be conducted in male rats only.

We are using rats because they have the cognitive capabilities required to understand and perform stably

in the cognitive tasks. Indeed, the rat is the best (and most used) animal to study the psychological and neural mechanisms of [REDACTED]. Because of this it is not possible to study these questions in other species, such as for instance mice.

The rats will be approximately 12 weeks old when we receive them from the certified supplier. The experiments will typically take around 6-7 months to complete from arrival in the animal facility to end of experiment. Rats will be housed socially in pairs.

The estimated numbers are justified in **Table 1, Table 2 and Table 3** as follows:

STUDY 1: Total N=120

STUDY 2: Total N=1560 (minimum) or N=2160 (maximum)

STUDY 3: Total N=160 (minimum) or N=960 (maximum)

TOTAL estimated numbers: N=120 (minimum) or N=3240 (maximum)

[1] Diekhof (2016) Horm Behav 74: 186-193.

[2] Reimers, et al (2014) Front Neurosci 8: 401

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 rat is the best (and most widely used) animal model to study the psychological and neurobiological mechanisms of [REDACTED]. The objectives of this project are to unravel the causal contribution of altered functioning of selected brain pathways and their interaction with dopamine therapy on the onset [REDACTED] disturbances. These experimental questions cannot be addressed in clinical patient populations, because we cannot directly modify functioning of these brain pathways in humans, nor combine this with dopamine therapy. Since the primary outcome measures are behavioural measures, in vitro models are not useful.

REDUCTION: Because of the variability in animal behaviour, reducing the sample size will result in much lower statistical power, potentially leading to ambiguous and non-reproducible results. The current sample sizes in the project are optimized using power analysis and the smallest possible sizes in order to obtain reliable results. Because inclusion of female rats would tremendously increase the number of animals, this project will only include male rats. Also, the inhibitory and excitatory DREADDs will be multiplexed within individuals.

REFINEMENT: We will undertake every effort to reduce the pain and suffering experienced throughout these experiments. Appropriate analgesia and anaesthetics will be used during and after the surgical procedures.

The animals will be monitored after surgery to ensure that recovery occurs as expected. All procedures that have the potential for animal harm (surgery, injections, sacrifice) will be conducted by well-trained and experienced researchers/technicians along standard operating procedures.

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

The rats will be housed in pairs and will be handled prior to training to reduce stress of initial exposure to the operant chambers. Likewise, in case of systemic injections the animals will be handled and habituated to the procedure prior to the injections.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

The experiments in this proposal are using novel DREADD intervention techniques in combination with novel behavioural approaches to study [REDACTED] deficits in rodents. These experiments have not been performed, and this specific combination of approaches is not conducted by other laboratories in the world. In consultation with colleagues in the field, we are the first to take this combined approach to develop a novel animal model mimicking Parkinson's disease.

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.

During the surgeries, we will use standard surgical procedure to reduce pain and suffering. Before the start of the surgery we will provide adequate pain relief. After this, we will induce anaesthesia and maintain the anaesthetised state throughout the surgery. Prior to the skin incision, we will inject (subcutaneous) a local anaesthetic into the incision site. After surgery the animal will be monitored for a

week (recording weight and general indicators of health such as presence of grooming, porphyrin secretions, etc.), and analgesia will be administered if necessary.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

1. Surgeries for the viral infusions will all have an impact on the animals welfare.
2. During training in the cognitive tasks animals will be placed on a mild food restriction procedure to maintain their weight at approximately 85% of their free-feeding weight.
3. During tests with DREADD ligands and dopamine therapy (with or without adjuvant therapy) animals will receive systemic injections.

Explain why these effects may emerge.

1. Because the surgeries involve skin incision and exposing the brain (for virus injection) there is a risk of infection.
2. Apart from earning food in the cognitive tasks, rats will receive additional food daily to maintain a mild food restriction scheme and maintain rats at approximately 85% of their free-feeding weight. Without food-restriction, rats are not sufficiently motivated to perform in the cognitive task thereby rendering the reliability of the results. To prevent this, rats are kept on food-restriction during training in the cognitive tasks and receive additional food every day.
3. Injecting the animals will cause moderate discomfort initially that will reduce as the rat habituates to this experience, yet the discomfort remains. Unfortunately, we have no alternative to reliably deliver the DREADD ligands and dopamine/adjuvant therapy non-invasively.

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

1. Surgeries will be conducted under sterile conditions. Only when, despite these aseptic measures, infections do occur we will treat those animals with antibiotics.
2. Discomfort of drug injections will be alleviated by prior handling and habituation to the procedure. Furthermore, only trained and skilled researchers and technicians will perform the injections thereby minimizing the discomfort caused by the systemic injections. Moreover, whenever possible the different ligands will be combined within a single injection/syringe to reduce the number of injections.

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 observe the rats for the following humane endpoints throughout the experiment:

- Loss of body weight: >20% in 24 hour period.
- Immobility: If on close examination the rat is unable to move around within their homecage
- Poor coat conditions: signs that the rat is not grooming which persist for multiple days
- Tremors/Convulsions
- Self-damage
- Abnormal body posture: Any indication that the rat has suffered an injury which causes them to be unable to maintain normal body posture for an extended period of time

Indicate the likely incidence.

<2%

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 total N=3240 rats that will experience the level of discomfort categorised as 'moderate'. In particular, this will occur at the start of experiments where the surgical procedure will cause moderate discomfort.

Following this animals will undergo behavioural training in the cognitive task which will cause mild discomfort paired with food-restriction which will cause moderate discomfort.

Finally, the systemic injections throughout the experiments will cause mild discomfort.

| Procedure | STUDY# | Duration | Discomfort |
|--|--------------------|--|-------------------|
| Surgery for DREADD virus | STUDY 1,2,3 | 1 day | Moderate |
| Food restriction to approximately 85% of free-feeding weight | STUDY 2,3 | 5-7 months | Moderate |
| Training in cognitive tasks | STUDY 2,3 | 5-7 months | Mild |
| Systemic injections | STUDY 2,3 | 2-3 months (over this period: total expected injections per rat approximately 40-50) | Mild |
| Cumulative discomfort | STUDY 1,2,3 | | 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 need to analyse the rat brains with 1) immunohistochemistry to verify the expression of the viral mediated DREADDs, 2) molecular biological techniques to study ex vivo molecular changes, 3) neurophysiological techniques to study functional ex vivo physiological changes

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

Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUmc) te
Amsterdam

T.a.v. [REDACTED]

[REDACTED] 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
AVD1140020171289

Bijlagen

1

26 APR. 2017

Datum 25 april 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 3 april 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Preventing [REDACTED] disorders in Parkinson's disease: a novel preclinical model" met aanvraagnummer AVD1140020171289. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 20 april 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Het voerrestrictie regime is nader beschreven en een miscalculatie in dieraantallen is verbeterd.

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.

De algemene voorwaarden zijn opgenomen op grond van artikel 1d lid 4, artikel 10a1 lid 2, artikel 10 lid 2 en/of artikel 10a3 van de wet.

U kunt met uw project "Preventing [REDACTED] disorders in Parkinson's disease: a novel preclinical model" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 september 2017 tot en met 31 augustus 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum gevoegd. Dit advies is opgesteld op 3 april 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet. Wij hebben de DEC om aanvullende informatie gevraagd. Op 24 april 2017 heeft de DEC gereageerd

op onze vragen. De communicatie met de onderzoeker is weergegeven. 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:
25 april 2017
Aanvraagnummer:
AVD1140020171289

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:
25 april 2017
Aanvraagnummer:
AVD1140020171289

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 1 september 2017 tot en met 31 augustus 2022, voor het project "Preventing [redacted] disorders in Parkinson's disease: a novel preclinical model" met aanvraagnummer AVD1140020171289, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum. 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 3 april 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 20 april 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 20 april 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 3 april 2017, ontvangen op 3 april 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 20 april 2017

| Naam proef | Diersoort/ Stam | Aantal dieren | Ernst | Opmerkingen |
|---|---------------------------------------|---------------|------------|-------------|
| 3.4.4.1 DREADD expression and pharmacotherapeutic interventions during behaviour | | | | |
| | Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) / | 3.240 | 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:
AVD1140020171289

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:

AVD1140020171289

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:

AVD1140020171289

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 W17-09 | | | | | | | | | | |
|-------------------------------|---------------------------------|-----------------|------|--------|-------|-------------------|--------|--------|------|--|
| | | wordt verstrekt | | | | weigeringsgronden | | | | |
| nr. | document NTS 20171290 | reeds openbaar | niet | geheel | deels | 10.1.c | 10.2.e | 10.2.g | 11.1 | |
| 1 | Aanvraagformulier | | | | x | | x | x | | |
| 2 | NTS | x | | | | | | | | |
| 3 | Projectvoorstel | | | | x | | x | x | | |
| 4 | Bijlage animal procedure 1 | | | | x | | x | x | | |
| 5 | DEC advies | | | | x | | x | x | | |
| 6 | Ontvangstbevestiging en factuur | | | | x | | x | x | | |
| 7 | Advies CCD | | x | | | | | | x | |
| 8 | Beschikking en vergunning | | | | x | | x | x | | |



Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

- U bent van plan om één of meerdere dierproeven uit te voeren.
- Met dit formulier vraagt u een vergunning aan voor het project dat u wilt uitvoeren. Of u geeft aan wat u in het vergunde project wilt wijzigen.
- Meer informatie over de voorwaarden vindt u op de website www.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 type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 10500 <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 | Rijksuniversiteit Groningen |
| | | Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde | [REDACTED] |
| | | KvK-nummer | 1179037 |
| 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 | A. Deusinglaan 1 [REDACTED] |
| | | Postbus | |
| | | Postcode en plaats | 9713AV Groningen |
| | | IBAN | NL45ABNA0474567206 |
| | | Tenaamstelling van het rekeningnummer | Rijksuniversiteit Groningen |
| 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 | <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 - 5 - 2017 |
| Einddatum | 1 - 5 - 2022 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- In vitro modellen ter bestudering van fibrose bij chronische ziekten
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- In vitro modellen ter bestudering van fibrose bij chronische ziekten
- 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] |
| E-mailadres | secrdec.umcg@umcg.nl |



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.

Voortdurende orgaanschade, bijvoorbeeld door een chronische ziekte, leidt tot fibrose. Hierbij wordt gezond weefsel vervangen door littekenweefsel, waardoor het orgaan steeds minder goed zal functioneren. Van alle ziekten met dodelijke afloop is 45% geassocieerd met fibrose. Voor fibrose-onderzoek wordt veel gebruik gemaakt van proefdieren, maar dat heeft tot op heden nog geen goede medicijnen opgeleverd. Daarnaast is er een wettelijke verplichting om de farmacologische effecten van potentiële geneesmiddelen in proefdieren te bepalen voordat deze in klinische studies aan mensen worden toegediend. Derhalve worden er veel muizen- en rattenstudies uitgevoerd ten behoeve van het fibrose onderzoek worden. **Daarnaast zijn er geen goede niet invasieve biomarkers voor fibrose beschikbaar en dienen proefdieren gedood te worden om orgaanfibrose te onderzoeken.**

Ontwikkeling van alternatieven voor dierproeven.

Voor onderzoek in het veld van fibrose worden wereldwijd veel proefdieren gebruikt. Deze studies gaan gepaard met veel ongerief voor de dieren omdat fibrose voornamelijk ontstaat na chronische schade. In 2013 werden er wereldwijd ongeveer 200.000 dieren puur voor fibrose onderzoek gebruikt, en dat aantal zal alleen maar zijn toegenomen aangezien fibrose door steeds meer groepen wordt onderzocht. Fibrose is een multicellulair proces en kan alleen worden onderzocht met een in vitro methode waarin de verschillende celtypen aanwezig zijn. Daarom zijn de precies-gesneden weefsel plakjes (PCTS, precision-cut tissue slices) ideaal, omdat hierin de cellen nog in hun normale omgeving aanwezig zijn.

Precies-gesneden weefselplakjes als ex vivo model.

Wij hebben in de afgelopen decennia het ex vivo model van precies-gesneden weefsel plakjes (PCTS, precision-cut tissue slices) ontwikkeld en aangetoond dat PCTS gemaakt van de ratten, muizen en humane lever, darm en nier gebruikt kunnen worden voor fibrose

Echter de kweekomstandigheden van PCTS dienen nog geoptimaliseerd te worden, omdat we tot nu toe fibrotische markers voornamelijk op gen-niveau kunnen meten. Voor humane lever PCTS hebben Starokozhko et al. de incubatie media nu zo geoptimaliseerd dat de vitaliteit en functionaliteit gedurende 5 dagen behouden blijft (Starokozhko, et al. *Toxicology in Vitro* 30: 288-299, 2015; Starokozhko, et al. *Arch Toxicol*, 1-14, 2016). Echter dienen we deze optimalisatie stap ook nog te maken voor PCTS van nier, darm- en longweefsel waarvan de vitaliteit in kweek beperkt is tot 24-48 uur.

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

- In het geval het project gericht is op één of meer onderzoeksdoelen: op welke vra(a)g(en) dient dit project antwoord(en) te verschaffen?
- In geval het een ander dan een onderzoeksdoel betreft: in welke concrete behoefte voorziet dit project?

Het uiteindelijke doel van het huidige onderzoeksvorstel is om met PCTS een betere voorspelling te doen welke geneesmiddelen in de mens antifibrotisch zullen zijn, daarnaast het proefdiergebruik in fibrose onderzoek te reduceren, het dierenleed te verminderen en uiteindelijk het gebruik van proefdieren zoveel mogelijk te vervangen.

De directe doelstellingen van dit project zijn:

1. Optimaliseren kweekmethode van lever, darm, long en nier PCTS.
2. Ontwikkelen van chronische ziektemodellen in PCTS.
3. Biomarkers voor fibrose vinden.
4. PCTS gebruiken om de effectiviteit van (potentiële) antifibrotische middelen te bestuderen.

Beschikbare onderzoeksfaciliteiten.

De onderzoeksgroep heeft jarenlange ervaring met het PCTS model en er is een speciale slice-faciliteit aanwezig. Hier zijn meerdere slicers en verschillende incubatiesystemen aanwezig en wordt intensief

samengewerkt met andere onderzoeksgroepen die ook met dit model werken. De capaciteit is ruim voldoende. Ook de faciliteiten voor de analyses van vitaliteit, gen- en eiwitniveau's zijn in ruime mate voorhanden. Zo zijn er faciliteiten voor microarray en proteomics analyse en een imaging centrum.

Beperking van het aantal proefdieren.

Door zoveel mogelijk de experimenten van verschillende projecten tegelijkertijd uit te voeren op de verschillende organen van het proefdier kan zo efficiënt mogelijk gebruik worden gemaakt van ieder proefdier. Door een goede planning van de experimenten kan het aantal proefdieren zo laag mogelijk worden gehouden. Dit is de standaardprocedure in onze groep en iedere onderzoeker neemt door de planning van de experimenten op elkaar af te stemmen, mede de verantwoordelijkheid hiervoor, wat de bewustwording van de onderzoekers voor het gebruik van proefdieren bevordert.

3.3 Belang

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

Het is wetenschappelijk en maatschappelijk van groot belang om de mechanismen van fibrose te onderzoeken. Van alle ziekten met dodelijke afloop is 45% geassocieerd met fibrose. Voor fibrose-onderzoek wordt veel gebruik gemaakt van proefdieren, maar dat heeft tot op heden nog geen goede medicijnen opgeleverd. Daarom is het heel belangrijk om species verschillen te begrijpen, zodat er een betere translatie naar de mens plaats kan vinden. **En we zullen de geoptimaliseerde kweekmethoden ook op humane PCTS gaan toepassen.**

Tevens is essentieel om het grote belang van *in vitro/ex vivo* testen als vervanging voor *in vivo* testen te benadrukken, zodat verdere terugdringen van het proefdiergebruik kan worden bewerkstelligd.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

1. Optimaliseren kweekmethode van lever, darm, long en nier PCTS

Omdat we chronische ziekten bestuderen is het noodzakelijk om PCTS langdurig te kunnen kweken.

Daarom zal onderzocht worden of verbetering in de samenstelling van het incubatiemedium de vitaliteit van lever, darm, nier en long PCTS van muizen en ratten kan worden verlengd tot 5 dagen. In dit tijdsbestek zijn de verschillende fasen van het fibrose proces (inflammatie, proliferatie en remodelatie) op zowel gen- als eiwitniveau te bestuderen. Om de kweekmethode te optimaliseren zullen we media testen welke commercieel verkrijgbare zijn alsmede media die worden gebruikt bij het kweken van organoïden (mini-organen, vaak zonder alle orgaan specifieke celtypes en niet in originele structuur, gekweekt uit stamcellen). Daarnaast zullen diverse componenten aan het incubatiemedium worden toegevoegd, waarmee we proberen aan te grijpen op verschillende processen die cellulaire stress veroorzaken, zoals ischemie-reperfusie. Als controle medium zal het incubatiemedium worden gebruikt dat sinds jaren in onze groep wordt gebruikt voor het kweken van slices. Het succes van de optimalisatie zal worden uitgelezen met verschillende fibrose markers op gen- en eiwitniveau (o.a. PCR, microarray, Western blotting en immunohistochemie).

2. Ontwikkelen van chronische ziektemodellen in PCTS, die uiteindelijk leiden tot fibrose

Gebruikmakend van de geoptimaliseerd en al aanwezige media, zullen we *in vitro* ziektemodellen ontwikkelen. **Een daarvan is de vervetting van de lever. Obesitas is een groot probleem in de westerse wereld. Obesitas leidt vaak tot vervetting van de lever, dit gaat nogal eens samen met een ontsteking en vormt daarmee de opmaat tot fibrose van de lever. Dit zal in de toekomst de belangrijkste oorzaak zijn van leverfibrose.** We zijn bezig om met behulp van specifieke media het vetgehalte in PCTS te verhogen. We zullen verder bestuderen of een vette PCTS uiteindelijk fibrose ontwikkeld. Indien dit model is opgezet zullen we dit model gebruiken om therapeutisch interventies te bestuderen. Ook inflammatie speelt een belangrijke rol bij het ontstaan van fibrose, daarom zullen verschillende cytokines (bijv. Transforming growth factor beta) toegevoegd worden aan het PCTS incubatie medium. We hebben binnen de RUG samenwerkingen met onderzoekers die proefdieronderzoek uitvoeren met bijv. vervette

levers of fibrotische organen. Deze samenwerkingsverbanden zullen we tijdens de 5 jaar ook uitbreiden, en we zullen de groepen actief benaderen om organen of stukjes weefsel van ratten en muizen, die bij een studie overblijven, voor onze studies te gebruiken. Uitleesparameters zijn ziektemodel specifiek en zullen op gen- en eiwitniveau worden bestudeerd.

3. Biomarkers voor fibrose vinden

Omdat er geen goede **niet invasieve** *in vivo* biomarkers voor fibrose zijn, zullen we de PCTS van doelstelling 1 en 2 gebruiken om biomarkers van orgaanfibrose te vinden. Hiervoor zullen we in detail bestuderen welke eiwitten er geproduceerd worden door PCTS gedurende het fibrose proces. Omdat we de multicellulaire omgeving van een orgaan *in vivo* kunnen nabootsen in PCTS, denken we dat orgaan specifieke biomarkers, ideaal *in vitro* kunnen worden onderzocht. Kandidaat biomarkers zullen gevalideerd worden in patient samples welke beschikbaar zijn via samenwerkingsverbanden met verschillende onderzoeksgroepen in het UMC Groningen. Biomarkers zullen vooral op eiwitniveau worden bestudeerd (ELISA, Westernblot, immunohistochemie en Luminex multiplex assays).

4. PCTS gebruiken om de effectiviteit van (potentiële) antifibrotische middelen te bestuderen

PCTS zullen worden gebruikt om in verschillende organen de antifibrotische effectiviteit van verschillende (potentiële) geneesmiddelen te bestuderen. **Transforming growth factor-beta (TGF- beta) en Platelet-derived growth factor (PDGF) zijn groeifactoren waarvan bekend is dat ze een rol spelen in het fibrose proces. Middelen die ingrijpen op de signaleringsroutes die worden geactiveerd door deze groeifactoren zullen worden getest in PCTS.** Daarbij zal gebruikt gemaakt worden van PCTS van doelstelling 1 en 2, maar ook al van PCTS die met huidige media worden geïncubeerd. De huidige fibrose markers (gen- en eiwitniveau) kunnen dan aangevuld worden met de biomarkers van doelstelling 3.

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

Voor ons onderzoek zullen er geen dierproeven worden uitgevoerd. Alle doelstellingen kunnen worden bestudeerd in PCTS verkregen uit weefsel van fokoverschot muizen of muizen en ratten uit studies van andere onderzoeksgroepen.

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.

Doelstelling 1-4 zullen zoveel mogelijk parallel worden uitgevoerd in de verschillende organen van een proefdier, zodat zo min mogelijk proefdieren worden gebruikt.

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

| Volgnummer | Type dierproef |
|------------|---|
| 1 | Het verzamelen van organen uit verschillende diersoorten om <i>in vitro</i> chronische ziekten en fibrose te bestuderen |
| 2 | |
| 3 | |
| 4 | |
| 5 | |
| 6 | |
| 7 | |
| 8 | |
| 9 | |
| 10 | |



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

| | | | |
|-----|---|-----------------------------|--|
| 1.1 | Vul uw deelnemernummer van de NVWA in. | 10500 | |
| 1.2 | Vul de naam van de instelling of organisatie in. | Rijksuniversiteit Groningen | |
| 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> | 3.4.4.1 | Het verzamelen van organen uit verschillende diersoorten om in vitro chronische ziekten en fibrose te bestuderen |

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

De experimentele opzet van de dierproef bestaat uit het onder narcose brengen van het proefdier, waarna de organen worden uitgenomen en het proefdier overlijdt door verbloeden. Van de organen (lever, nier, long en darmen) worden precies-gesneden weefselplakjes (precision-cut tissue slices, PCTS) gemaakt. De incubaties van PCTS worden geoptimaliseerd, ziektemodellen in vitro ontwikkeld die de oorzaak zijn van fibrose en antifibrotische stoffen zullen in PCTS getest worden. Als uitkomstparameters aan het eind van de incubaties van PCTS, passen we biomarkers toe. Voor de vitaliteit worden bijvoorbeeld ATP gehalte en morfologie gebruikt. Daarnaast worden per orgaan verschillende specifieke ziekte en fibrose biomarkers gebruikt op gen- en eiwitniveau.

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.

Onder isoflurane/zuurstof narcose worden de organen uitgenomen, waarna het proefdier overlijdt door verbloeden.

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

Uit onze ervaring met de techniek van PCT

is gebleken dat voor statistisch betrouwbare metingen van effecten op vitaliteit, gen- en eiwitniveau 4-5 proefdieren nodig zijn, waarbij binnen ieder experiment alle experimentele waarnemingen in drievoud (3 slices per conditie) worden gedaan. Het aantal experimenten dat per orgaan (lever, nier, darm en long) kan worden uitgevoerd, verschilt per orgaan: zo kunnen bijvoorbeeld van een rattenlever 150 slices worden gemaakt, van een muizenlever 40, van twee rattennieren ca. 80, van 2

muizennieren ca 40 en van ratten- en muizendarmen ongeveer 40-60 per regio (duodenum, jejunum, ileum en colon). Het werk wordt zodanig georganiseerd, dat meerdere onderzoekers tegelijk hun experimenten uitvoeren met de verschillende organen van een proefdier. Op deze manier kan zeer efficiënt gebruik worden gemaakt van ieder proefdier en kan het aantal proefdieren tot een minimum worden beperkt.

B. De dieren

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

De experimenten voor de hieronder beschreven doelstellingen 1-4 zullen op surplus muizen (fokoverschot) worden uitgevoerd. We hebben tot nu toe nog geen verschillen gezien in mannelijke of vrouwelijke muizen. In principe worden volwassen, max. 4 maanden oude, dieren gebruikt. De experimenten voor doelstellingen 1, 2, 3 en 4 zullen ook worden uitgevoerd in muizen en rattenorganen die overblijven na dierproeven van andere onderzoeksgroepen (overschot organen; figuur 1).

Alle experimenten worden met organen van 5 dieren uitgevoerd (n=5 biological replicates). Voor doelstelling 1. *Optimaliseren kweekmethode van lever, darm, long en nier PCTS* zullen surplus muizen worden gebruikt: De weergegeven hoeveelheid slices zijn leverslices. Uit dezelfde muis zullen ook nier, long en darmen worden gehaald.

- Per medium: 1 kweekmedium: 5 tijdstippen (bijv. 0, 24, 48, 72 en 96 uur), 5 uitleesparameters (bijv. ATP, mRNA, eiwit, morfologie, enzym activiteit), 3 slices per groep. (75 leverslices, dit zijn 2 muizen)

Er zullen 10 verschillende media gebruikt worden om de PCTS kweek te optimaliseren. Dat is bij biological replicate van 5 (n=5): 100 muizen voor 10 verschillende media.

- Per toegevoegd additief: 1 additief, 5 tijdstippen, 5 uitleesparameters, 3 slices per groep (75 slices)

Er zullen 10-15 verschillende additieven gebruikt worden om de PCTS kweek te optimaliseren. Dat is bij biological replicate van 5 (n=5): 100-150 muizen voor 10-15 verschillende additieven.

Totaal zijn er voor **doelstelling 1 maximaal 250 muizen** nodig. We proberen hier ook overschot organen van muizenstudies te gebruiken. Daarnaast zullen we de rattenstudies uitvoeren met overschot organen.

2. *Ontwikkelen van chronische ziektemodellen in PCTS, die leiden tot fibrose*, voor deze doelstelling zullen surplus muizen worden gebruikt: De weergegeven hoeveelheid slices zijn leverslices. Uit dezelfde muis zullen ook nier, long en darmen worden gehaald.

- Per aangepast medium/stimulus: 1 kweekmedium: 5 tijdstippen, 5 uitleesparameters, 3 slices per groep. (75 leverslices, dit zijn 2 muizen)

Er zullen 20-25 aangepast medium/stimuli getest worden om in PCTS ziektemodellen te ontwikkelen. Dat is bij biological replicate van 5 (n=5): 200-250 muizen voor 20-25 aangepast medium/stimuli.

Totaal zijn er voor **doelstelling 2 maximaal 250 muizen** nodig. We proberen hier ook overschot organen van muizenstudies te gebruiken. Daarnaast zullen we de rattenstudies uitvoeren met overschot organen.

3. *Biomarkers voor fibrose vinden*, zullen geen extra muizen of ratten worden gebruikt aangezien hiervoor de PCTS van doelstelling 1 en 2 worden gebruikt.

4. *PCTS gebruiken om de effectiviteit van (potentiële) antifibrotische middelen te bestuderen*, zullen surplus muizen worden gebruikt: De weergegeven hoeveelheid slices zijn leverslices. Uit dezelfde muis zullen ook nier, long en darmen worden gehaald.

- Per antifibrotisch middel: 1 kweekmedium: 5 tijdstippen/concentratie's antifibrotische middelen, 5 uitleesparameters, 3 slices per groep. (75 leverslices, dit zijn 2 muizen)

De effectiviteit van 40-50 antifibrotische middelen zal worden getest in PCTS. Dat is bij biological replicate van 5 (n=5): 400-500 muizen voor 40-50 antifibrotische middelen.

Totaal zijn er voor **doelstelling 4 maximaal 500 muizen** nodig. We proberen hier ook overschot organen van muizenstudies te gebruiken. Daarnaast zullen we de rattenstudies uitvoeren met overschot organen.

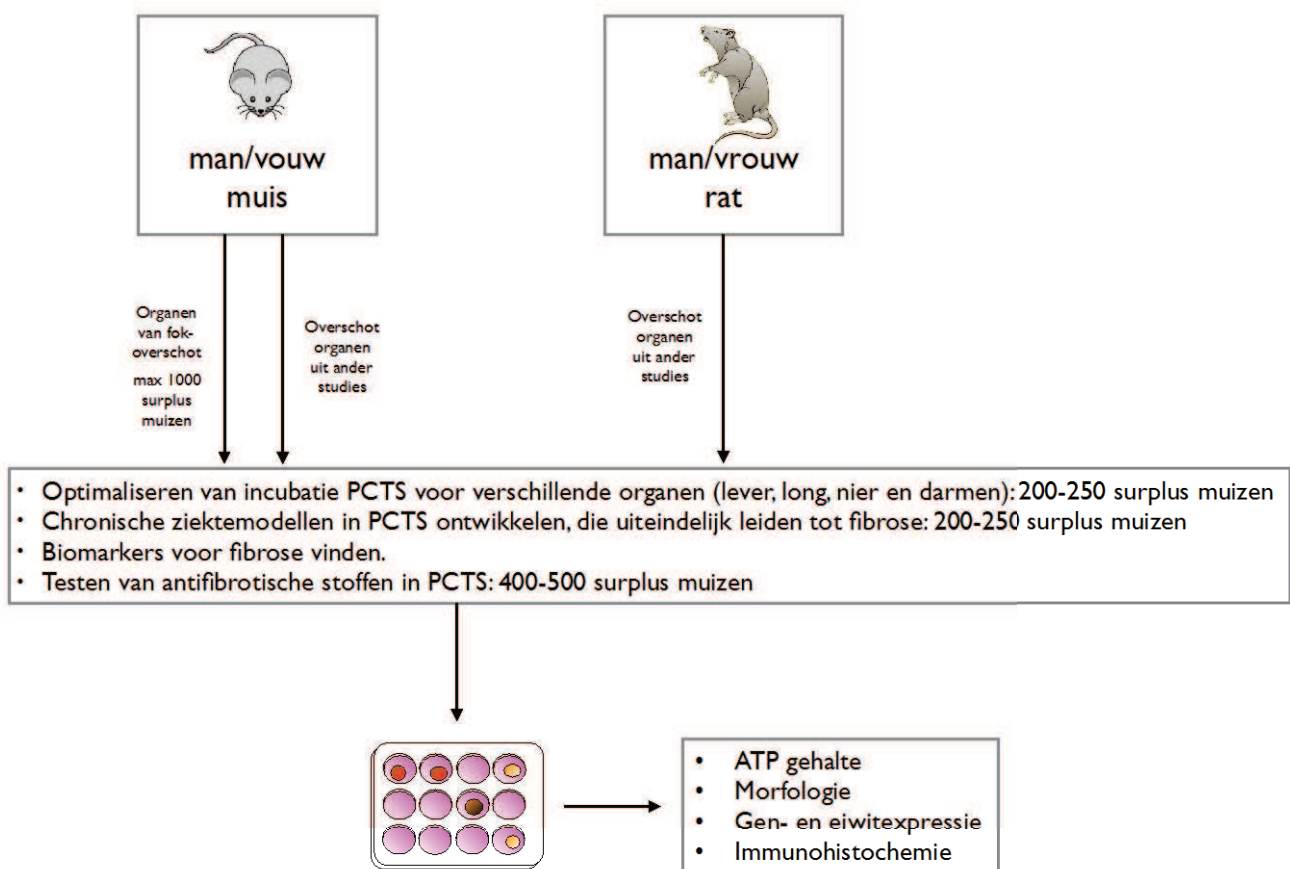


Fig. 1 Schematische voorstelling van de uit te voeren experimenten
 Voor dit onderzoek zullen dus alleen organen worden gebruikt van fokoverschot muizen en
 overschotorganen (muis en rat) van andere onderzoeksgroepen.

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.

VERMINDEREN:

Het gehele onderzoek is gebaseerd op de doelstelling om dierproeven te verminderen door gebruik te maken van het *ex vivo* model van PCTS. Hierdoor kunnen per dier een groot aantal experimenten worden uitgevoerd, die even zoveel *in vivo* experimenten kunnen vervangen. Dit betekent bijvoorbeeld voor doelstelling 4 dat er bij een *in vivo* studie 4 diermodellen voor de verschillende orgaanfibroses zouden

moeten worden gebruikt, vaak n=10, bij 5 doseringen, en bij 40 anti-fibrotische stoffen zijn er 8000 proefdieren nodig waar wij voor ons in in vitro ziektemodel maar 400 proefdieren nodig hebben. Ook worden alle experimenten van onze werkgroep zo gepland dat elk orgaan van het proefdier optimaal gebruikt wordt. De keuze van de dieren is gebaseerd op de meest gebruikte proefdieren in fibrose onderzoek.

VERVANGING:

Het streven is naar volledige vervanging door de techniek ook toe te passen op humaan weefsel. Echter dit is om twee redenen nog niet mogelijk: in de eerste plaats is het humane weefsel nog in onvoldoende mate beschikbaar. Aan verbetering hiervan wordt middels een landelijke commissie gewerkt. In de tweede plaats zijn dierproeven nog steeds voorgeschreven voor het testen van de farmacologische werking van stoffen. Het gebruik van cellen gedifferentieerd uit stamcellen en organoïden gemaakt van stamcellen is in opkomst en zal waarschijnlijk in de nabije toekomst kunnen worden toegepast bij fibrose onderzoek. Echter deze organoïden zullen voorlopig niet de complexe structuur van de organen met al hun verschillende celtypen in de weefselspecifieke onderlinge lokalisatie kunnen reflecteren en het PCTS model zal een plaats blijven innemen tussen de *in vivo* en *in vitro* modellen.

VERFIJNING:

Omdat de handelingen aan de dieren beperkt blijven tot onder narcose brengen, zijn geen extra maatregelen voor verfijning overwogen. Wel wordt bijgedragen aan verfijning door de fibrose inductie in vitro uit te voeren waardoor de dieren in vivo niet aan fibrose stimuli worden blootgesteld. Hierdoor gaan onze experimenten gepaard met geen leed voor de dieren.

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.

Door de uitstekende verzorging in de proefdierfaciliteiten van de CDP en de ervaring van de medewerkers met het zo stressvrij mogelijk onder narcose brengen van proefdieren, is de kans op pijn, lijden of angst tot een minimum beperkt. Er zijn geen nadelige invloeden op het milieu te verwachten.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

Dit type onderzoek is al jaren een belangrijke onderzoekslijn van onze werkgroep. Door de vele medewerkers die hieraan werken wordt voortdurend de literatuur doorzocht om uit te sluiten dat werk van anderen wordt gedupliceerd. Ook houden we op congressen en via andere kanalen voortdurend contact met onderzoekers in het veld. We doen het uiterste om te zorgen dat de resultaten van ons werk worden gepubliceerd zodat ook anderen geen werk gaan dupliceren.

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.

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.

nvt

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

nvt

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.

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

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.

terminaal

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.

Door uitname van de organen verbloeden de dieren en hebben ze geen kans op overleving

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

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: Interne RUG code **8091**
2. Titel van het project: **In vitro modellen ter bestudering van fibrose bij chronische ziekten**
3. Titel van de NTS: **In vitro modellen ter bestudering van fibrose bij chronische ziekten**
4. Type aanvraag:
X 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 : **08-03-2017**
 - aanvraag compleet: **08-03-2017**
 - in vergadering besproken: **16-03-2017**
 - anderszins behandeld: **28-03-2017**
 - termijnonderbreking(en) van / tot **21-03-2017 tot 27-03-2017**
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen **n.v.t.**
 - aanpassing aanvraag: **27-03-2017**
 - advies aan CCD: **04-04-2017**
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.
8. Eventueel horen van aanvrager: **n.v.t.**
 - Datum
 - Plaats
 - Aantal aanwezige DEC-leden
 - Aanwezige (namens) aanvrager
 - Gestelde vraag / vragen
 - Verstrek(e) antwoord(en)
 - Het horen van de aanvrager heeft wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag
9. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum: **21-03-2017**
 - Gestelde vraag/vragen:

1/ U geeft aan dat voor onderzoek in het veld van fibrose wereldwijd veel proefdieren worden gebruikt, maar dat zulks tot op heden nog geen goede medicijnen heeft opgeleverd. Tevens vermeldt u dat deze studies gepaard gaan met veel ongerief voor de dieren, omdat fibrose voornamelijk ontstaat na chronische schade. In 2013 werden er wereldwijd ongeveer 200.000 dieren puur voor fibrose onderzoek gebruikt en dat aantal zal alleen maar zijn toegenomen aangezien fibrose door steeds meer groepen wordt onderzocht. Het is aantrekkelijk dat u in uw onderzoek streeft naar optimalisatie van de kweekomstandigheden

van PCTS, maar dit lijkt gezien te moeten worden als middel behulpzaam bij de ontwikkeling van medicijnen tegen fibrose en niet zozeer als doel.

2/ U schetst echter een somber perspectief ten aanzien van het überhaupt beschikbaar komen van medicijnen tegen fibrose gegeven de mondiale inspanningen in deze richting. Uw onderzoeksvoorstel duidt in het geheel niet op potentiële farmaca, die in de nabije toekomst soulaas zouden kunnen bieden en daarmee lijkt er niet veel relevantie voor uw onderzoek naar optimalisatie van de kweekomstandigheden van PCTS.

3/ In relatie met bovenstaande opmerking: het duiden van dit projectvoorstel als tevens 'Translatieel of toegepast onderzoek' (Onder 2. Categorie van het project) lijkt dan ook niet correct.

4/ In de achtergrond geeft u aan dat er geen goede biomarkers voor fibrose zijn (anders dan op genniveau), terwijl u onder 3.4.1. aangeeft dat het succes van de optimalisatie zal worden uitgelezen met verschillende fibrose markers op gen- en eiwitniveau. Dit lijkt een discrepantie. Kunt u dit toelichten?

5/ Uw voorkeur in dit projectvoorstel lijkt duidelijk uit te gaan naar PCTS afkomstig van muizen. Kunt u dit nader toelichten temeer daar bij gebruik van ratten minder dieren noodzakelijk lijken te zijn?

6/ In het licht van vermindering bij dergelijk onderzoek is de onvermijdbare vraag natuurlijk in hoeverre gebruik van weefsel afkomstig uit slachthuizen soulaas zou kunnen bieden?

7/ Onder doel 2 Ontwikkelen van chronische ziektemodellen in PCTS noemt u met name leververvetting. Waarom gaat uw belangstelling vooral hiernaar uit?

8/ Dekt de titel "In vitro modellen ter bestudering van fibrose bij chronische ziekten" de lading niet beter?

9/ NTS: Onder 3. Projectbeschrijving wordt gesteld dat "In dit voorstel gaat het om weefsels die direct van mens of dier afkomstig zijn en slechts beperkte tijd kunnen worden geconserveerd". In het projectvoorstel lijkt gebruik van humane weefsels niet van toepassing.

- Datum antwoord: **27-03-2017**

- Verstrek(e) antwoord(en):

1/ Om chronische ziekten te bestuderen, moeten we ook instaat zijn om PCTS langdurig te kweken. Daarom is langdurig incuberen ook een doel in ons project. De volgende zin hebben toegevoegd aan Onderzoeksstrategie (Projectvoorstel dierproeven): '3.4.1. Doel 1.

Omdat we chronische ziekten bestuderen is het noodzakelijk om PCTS langdurig te kunnen kweken.'

2/ Het huidige onderzoek naar fibrose in knaagdieren heeft een aantal potentiële geneesmiddelen te berde gebracht. Dat zijn geneesmiddelen die ingrijpen op de transforming growth factor-beta (TGF- beta) en Platelet-derived growth factor (PDGF) signaleringsroutes. Volgende is aan de tekst toegevoegd (Projectvoorstel dierproeven): '3.4.1. Doel 4 Transforming growth factor-beta (TGF- beta) en Platelet-derived growth factor (PDGF) zijn groeifactoren waarvan bekend is dat ze een rol spelen in het fibrose proces. Middelen die ingrijpen op de signaleringsroutes die worden geactiveerd door deze groeifactoren zullen worden getest in PCTS.'

3/ We zullen de kennis verkregen uit dit project ook gebruiken om de kweekmethoden van humane PCTS te optimaliseren. Daarnaast zullen de ontwikkelde in vitro modellen voor chronische ziekten uiteindelijk gebruikt worden om te bepalen of een geneesmiddel werkt en gebruikt kan worden in de mens. Ook is het toegepast onderzoek omdat we de in vitro methoden willen gebruiken om in vivo experimenten in knaagdieren (gedeeltelijk) overbodig te maken. Volgende is aan de tekst (Projectvoorstel dierproeven) toegevoegd: '3.3 Belang En we zullen de geoptimaliseerde kweekmethoden ook op humane PCTS gaan toepassen.'

4/ Er zijn op dit moment geen goede niet invasieve biomarkers voor fibrose voorhanden en de proefdieren moeten worden gedood om orgaanfibrose te bestuderen. Om dat te verduidelijken hebben we het volgende aan de tekst (Projectvoorstel dierproeven) veranderd: '3.1 Daarnaast zijn er geen goede niet invasieve biomarkers voor fibrose beschikbaar en dienen proefdieren gedood te worden om orgaanfibrose te onderzoeken.' ; 3.3.4 3. Biomarkers voor fibrose vinden *Omdat er geen goede niet invasieve in vivo biomarkers voor fibrose zijn, zullen we de PCTS van doelstelling 1 en 2 gebruiken om biomarkers van orgaanfibrose te vinden.'*

5/ Muizen en ratten zijn beide even belangrijk voor het fibrose onderzoek. En om een alternatief aan te bieden voor in vivo fibrose onderzoek zullen de in vitro studies in beide species moeten worden uitgevoerd. Omdat we minder PCTS van muizenorganen kunnen maken zijn we genoodzaakt om meer (fokoverschot) muizen te gebruiken dan ratten.

6/ Omdat we een alternatief willen bieden voor de huidige in vivo fibrose experimenten in knaagdieren, voeren we de in vitro studies ook in knaagdieren uit. Daarnaast bestaan er op dit moment ook geen in vivo fibrose modellen waarin slachthuisdieren (o.a. koeien, varkens en schapen) worden gebruikt. Derhalve kunnen in vitro studies met weefsel afkomstig uit slachthuizen niet worden gecorreleerd met in vivo studies in deze dieren.

7/ Obesitas is een groot probleem in de westerse wereld. Obesitas leidt vaak tot vervetting van de lever, wat vaak hand in hand gaat met een ontsteking, en vormt daarmee de opmaat tot fibrose van de lever. Dit zal in de toekomst de belangrijkste oorzaak zijn van leverfibrose. Om dit te verduidelijken is het volgende aan de tekst (Projectvoorstel dierproeven) toegevoegd: '3.4.1 2. Ontwikkelen van chronische ziektemodellen in PCTS, die uiteindelijk leiden tot fibrose.'

Een daarvan is de vervetting van de lever. Obesitas is een groot probleem in de westerse wereld. Obesitas leidt vaak tot vervetting van de lever, dit gaat nogal eens samen met een ontsteking en vormt daarmee de opmaat tot fibrose van de lever. Dit zal in de toekomst de belangrijkste oorzaak zijn van leverfibrose.'

8/ Is aangepast in de aanvraagformulieren: Aanvraag Projectvergunning Dierproeven: bij 3.2 en 3.3 NTS: bij 1.1 Projectvoorstel dierproeven: bij 1.3.

9/ Is aangepast in NTS. Het volgende is aan de tekst (NTS) veranderd: '3. Projectbeschrijving "In dit voorstel gaat het om weefsels die direct van het dier afkomstig zijn en slechts beperkte tijd kunnen worden geconserveerd"

- **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)? 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.

JA

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.

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. Het is helder welke handelingen en ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft helder criteria beschreven op basis waarvan zal worden besloten het project wel of niet te continueren. 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. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

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 Wet Natuurbescherming).

Voor zover de DEC de mogelijke tegenstrijdigheid kan beoordelen is er geen aanleiding om deze strijdigheid met andere relevante wettelijke bepalingen aanwezig te achten. De DEC wil wel stellen dat deze signaleringsfunctie niet tot de wettelijke taken van de DEC behoort. *Mochten de DEC-RuG signalen bereiken aangaande mogelijke tegenstrijdigheid met wettelijke bepalingen dan zal zij onverwijld de vergunninghouder daarvan op de hoogte stellen.*

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*).

1. **Het directe doel is om de kweekmethode van lever, darm, long en nier PCTS te optimaliseren, het ontwikkelen van chronische ziektemodellen in PCTS, biomarkers voor fibrose vinden en de effectiviteit van (potentiële) antifibrotische middelen te bestuderen. Het uiteindelijke doel is om met PCTS een betere voorspelling te doen welke geneesmiddelen in de mens antifibrotisch zullen zijn, daarnaast het proefdiergebruik in fibrose onderzoek te reduceren, het dierenleed te verminderen en uiteindelijk het gebruik van proefdieren zoveel mogelijk te vervangen. Er is (deels) een directe en reële relatie tussen het directe en uiteindelijke doel: door gebruik van PCTS wordt proefdiergebruik teruggedrongen. Het project betreft een fundamenteel en translationeel onderzoek m.b.t. het hiervoor beschreven directe doel; het uiteindelijke doel zal binnen de looptijd van het project naar alle waarschijnlijkheid voor een groot deel niet gehaald worden. De aanvrager heeft duidelijk gemaakt wat dit project kan bijdragen aan het onderzoeksveld en 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 fundamentele project zijn de proefdieren, en op langere termijn mensen lijdend aan fibrosing van weefsels/organen

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 mensen bevorderd kunnen worden: wellicht een betere behandeling van fibrose bij chronische ziektes. Hierdoor kan de kwaliteit van

leven verbeterd worden van patiënten.

6. Is er aanleiding voor de DEC om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken?

Voor zover de DEC de beschreven effecten op het milieu kan beoordelen is er geen aanleiding om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu te betrekken. De DEC wil wel stellen dat deze signaleringsfunctie niet tot de wettelijke taken van de DEC behoort. Mochten de DEC-RuG signalen bereiken aangaande mogelijke effecten op het milieu dan zal zij onverwijld de vergunninghouder daarvan op de hoogte stellen.

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).* **NVT**
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 huisvesting en verzorging volgens de richtlijn gebeurt. Dit op basis van de daartoe strekkende verklaring van zowel de vertegenwoordiger van de vergunninghouder als de aanvrager onder respectievelijk punt 6 van de ondertekening van de aanvraag en punt F van de bijlage.

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*).

Dit lijkt realistisch ingeschat. 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 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 in deze aanvraag niet opportuun omdat alle dieren onder narcose gebracht worden en tijdens narcose getermineerd.

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. De voorgestelde experimenten zijn ook bedoeld als –op termijn- alternatief voor *in vivo* experimenten.

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.

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.

Het betreft geen wettelijk vereist onderzoek. 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 de onderhavige projectaanvraag worden mannelijke en vrouwelijke dieren gebruikt. 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, geef 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: dieren worden gedood om organen te kunnen uitnemen

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.

NVT

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.

Rechtvaardigen de doelstellingen van het project **"In vitro modellen ter bestudering van fibrose bij chronische ziekten"**, dat gericht is op zowel de verbetering van de behandelmethoden van fibrose bij chronische ziekten en daarmee de vergroting van de kans op herstel bij dergelijke patiënten als op vermindering van het proefdiergebruik het gebruik van met name surplus muizen in een terminaal experiment in de onderhavige aanvraag?

Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: **gering nadeel nog afgezien van de terugdringing van het proefdiergebruik.**

Waarden die voor de doelgroep bevorderd worden: **mogelijk reëel voordeel.**

Algemeen: **vergroting van medische kennis met betrekking tot de behandeling van fibrose leidend tot een verbeterde levensverwachting bij patiënten met een chronische ziekte.**

De DEC-RuG is van mening dat de belangen van de samenleving in het algemeen en de patiënten en hun naasten in het bijzonder binnen het project **"In vitro modellen ter bestudering van fibrose bij chronische ziekten"** zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de proefdieren. Voor de betrokken proefdieren leiden deze proeven in een terminaal experiment tot de dood. Zij worden door de experimenten in hun levensduur geschaad. Ten gevolge van de proeven zullen de dieren stress ondervinden voorafgaand aan de narcose.

Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit project echter leiden tot een uitbreiding van medisch-wetenschappelijke kennis over het behandelen van fibrose bij chronische ziekten. Voor de betreffende patiënten is verbetering van hun welzijn en mogelijk uitzicht op herstel van groot belang. Dit verhoogt hun levensverwachting en geeft een betere kwaliteit van leven. Tevens zal de kwaliteit van leven van hun naasten verbeterd worden. Van belang is ook de relevantie van dit onderzoek voor het verminderen van het aantal dierproeven. Vandaar dat de DEC-RuG het onderhavige onderzoek, zowel vanuit wetenschappelijk, translationeel als vanuit maatschappelijk oogpunt, van belang acht.

Het is aannemelijk dat de doelstelling behaald zal worden. De onderzoekers zullen zoveel mogelijk trachten het welzijn van de dieren te bevorderen, waardoor het werkelijke ongerief van de dieren beperkt blijft in relatie tot het te behalen voordeel.

Daarom beantwoordt de DEC-RuG de centrale morele vraag: Rechtvaardigt de doelstelling van het project **"In vitro modellen ter bestudering van fibrose bij chronische ziekten"**, dat gericht is op de verbetering van de behandeling van fibrose, in relatie tot de opoffering van de (surplus)dieren in het voorliggende project 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 belang van dit project naar haar mening zwaarder zulks mede in relatie tot vermindering van het proefdiergebruik. 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 tegemoet gekomen 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 **“In vitro modellen ter bestudering van fibrose bij chronische ziekten”** 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.

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

2. 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

Rijksuniversiteit Groningen

A. Deusinglaan 1
9713 AV GRONINGEN



**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
AVD1050020171290

Bijlagen

2

Datum 6 april 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 4 april 2017. Het gaat om uw project "In vitro modellen ter bestudering van fibrose bij chronische ziekten". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1050020171290. 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:

6 april 2017

Aanvraagnummer:

AVD1050020171290

Datum:
6 april 2017
Aanvraagnummer:
AVD1050020171290

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10500
Naam instelling of organisatie: Rijksuniversiteit Groningen
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 1179037
Straat en huisnummer: A. Deusinglaan 1
Postcode en plaats: 9713 AV GRONINGEN
IBAN: NL45ABNA0474567206
Tenaamstelling van het rekeningnummer: Rijksuniversiteit Groningen

Gegevens 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

Datum:

6 april 2017

Aanvraagnummer:

AVD050020171290

Over uw project

Geplande startdatum:

1 mei 2017

Geplande einddatum:

1 mei 2022

Titel project:

In vitro modellen ter bestudering van fibrose bij chronische ziekten

Titel niet-technische samenvatting:

In vitro modellen ter bestudering van fibrose bij chronische ziekten

Naam DEC:

DEC-RUG

Postadres DEC:

A. Deusinglaan 1, [REDACTED]

E-mailadres DEC:

secrdec.umcg@umcg.nl

Betaalgegevens

De leges bedragen:

€ 1035,-

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:

Groningen

Datum:

4 april 2017



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

[REDACTED]
A. Deusinglaan 1
9713 AV GRONINGEN



**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
AVD1050020171290

Bijlagen

2

Datum 6 april 2017

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 6 april 2017

Vervaldatum: 6 mei 2017

Factuurnummer: 171290

| Omschrijving | Bedrag |
|---|-----------|
| Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD1050020171290 | € 1035,00 |

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

Rijksuniversiteit Groningen

A. Deusinglaan 1
9713 AV GRONINGEN



**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
AVD1050020171290

Bijlagen

1

25 APR 2017

Datum 24 april 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 4 april 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "In vitro modellen ter bestudering van fibrose bij chronische ziekten" met aanvraagnummer AVD1050020171290. 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.

De algemene voorwaarde(n) zijn opgenomen op grond van artikel 1d lid 4, artikel 10a1 lid 2, artikel 10 lid 2 en/of artikel 10a3 van de wet.

U kunt met uw project "In vitro modellen ter bestudering van fibrose bij chronische ziekten" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 mei 2017 tot en met 30 april 2022. Deze termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat een vergunning een looptijd van maximaal 5 jaar kan hebben.

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 4 april 2017. 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:
24 april 2017
Aanvraagnummer:
AVD1050020171290

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



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: Rijksuniversiteit Groningen

Adres: A. Deusinglaan 1

Postcode en plaats: 9713 AV GRONINGEN

Deelnemersnummer: 10500

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 mei 2017 tot en met 30 april 2022, voor het project "In vitro modellen ter bestudering van fibrose bij chronische ziekten" met aanvraagnummer AVD1050020171290, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-RUG. 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 4 april 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 4 april 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 4 april 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 4 april 2017, ontvangen op 4 april 2017.

| Naam proef | Diersoort/ Stam | Aantal dieren | Ernst | Opmerkingen |
|---|----------------------------------|---------------|-----------|-------------|
| 3.4.4.1 Het verzamelen van organen uit verschillende diersoorten om in vitro chronische ziekten en fibrose te bestuderen | | | | |
| | Muizen (<i>Mus musculus</i>) / | 1.000 | Terminaal | |

Voorwaarden

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

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.

Aanvraagnummer:
AVD1050020171290

De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarde wijzigen of intrekken.



Aanvraagnummer:

AVD1050020171290

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 onvereenigbaar 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:
AVD1050020171290

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 W17-09 | | | | | | | | | | |
|-------------------------------|---|-----------------|------|--------|-------|-------------------|--------|--------|------|---|
| nr. | document NTS 20171324 | wordt verstrekt | | | | weigeringsgronden | | | | |
| | | reeds openbaar | niet | geheel | deels | 10.1.c | 10.2.e | 10.2.g | 11.1 | |
| 1 | Aanvraagformulier | | | | x | | x | x | | |
| 2A | NTS | | | x | | | | | | |
| 2B | NTS nieuw | x | | | | | | | | |
| 3 | Projectvoorstel | | | x | | | x | x | | |
| 4A | bijlage animal procedure 1 | | | x | | | x | x | | |
| 4B | bijlage animal procedure 2 | | | x | | | x | x | | |
| 5 | Ontvangstbevestiging en factuur | | | x | | | x | x | | |
| 6 | DEC advies | | | x | | | x | x | | |
| 7 | Mail verzoek om aanvullende informatie | | | x | | | x | x | | |
| 8 | Antwoord op verzoek om aanvullende informatie | | | x | | | x | x | | |
| 9 | Advies CCD | | x | | | | | | | x |
| 10 | Beschikking en vergunning | | | x | | | x | x | | |



12 APR. 2017

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 10500 <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 | Rijksuniversiteit Groningen |
| | | Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde | [REDACTED] |
| | | KvK-nummer | 1179037 |
| 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 | A. Deusinglaan 1 [REDACTED] |
| | | Postbus | |
| | | Postcode en plaats | 9713AV Groningen |
| | | IBAN | NL45ABNA0474567206 |
| | | Tenaamstelling van het rekeningnummer | Rijksuniversiteit Groningen |
| 1.4 | Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker. | (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. | (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? | <input type="checkbox"/> Ja > Stuur dan het ingevulde formulier <i>Melding Machtiging</i> mee met deze aanvraag | |
| | <input checked="" type="checkbox"/> 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 |
| | <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 |
| 2.2 Is dit een <i>wijziging</i> voor een project of dierproef waar al een vergunning voor verleend is? | <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 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 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 - 4 - 2017 |
| | Einddatum | 31 - 03 - 2022 |
| 3.2 Wat is de titel van het project? | The development of inner ear disease and treatment models | |
| 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting? | De ontwikkeling van modellen van binnenoor ziekte en behandeling | |
| 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] |
| | E-mailadres | secrdec.umcg@umcg.nl |

4 Betaalgegevens


- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1287 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 Groningen

Datum 18.04.2017

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.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

| | |
|------------------------------|--|
| 1.1 Titel van het project | De ontwikkeling van modellen van binnenoor ziekte en behandeling |
| 1.2 Looptijd van het project | 5 jaar |
| 1.3 Trefwoorden (maximaal 5) | Waarnemingsgehoorverlies, oorsuizen, draaiduizeligheid |

2 Categorie van het project

| | |
|--|---|
| 2.1 In welke categorie valt het project. <i>U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.</i> | <input checked="" type="checkbox"/> Fundamenteel onderzoek |
| | <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 de gezondheid |
| | <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 Projectbeschrijving

| | |
|---|--|
| 3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang) | <p>Het binnenoor is verantwoordelijk voor het gehoor en het evenwicht. Van een binnenooraandoening kun je ernstig gehandicapt raken door bijvoorbeeld waarnemingsgehoorverlies, tinnitus (piep in het oor) en vertigo (draaiduizeligheid). Deze complexe aandoeningen komen vaak tegelijkertijd voor en hebben zowel genetische, omgevings- als ouderdomsoorzaken.</p> <p>Helaas zijn farmacologische behandelmogelijkheden voor veel van deze aandoeningen grotendeels beperkt tot symptoombestrijding en experimentele behandelingen. Dit komt vooral door gebrek aan kennis over het functioneren van het binnenoor. Zo worden voor de ziekte van Ménière (een oorzaak van draaiduizeligheid), vooral medicijnen tegen duizeligheid en overgeven voorgeschreven en voor tinnitus antidepressiva. Gehoorapparaten en</p> |
|---|--|

cochleaire implantaten kunnen waarnemingsgehoorverlies redelijk herstellen maar voorkomen geen verder gehoorverlies en herstellen beschadigingen in het binnenoor niet. Dit geeft duidelijk de noodzaak weer voor het ontdekken van farmacologische medicijnen die het binnenoor genezen, herstellen, of schade voorkomen.

Dit onderzoek heeft een stapsgewijze opbouw van laboratorium- en dierexperimenten om een set van samenhangende testen op te zetten voor het identificeren van nieuwe medicijnen tegen binnenooraandoeningen.

De resultaten van dit onderzoek dragen bij aan wetenschappelijk begrip van de fysiologie en de pathologie van het binnenoor en zijn essentieel voor het ontwikkelen van effectieve en betrouwbare farmaceutische behandelmethoden voor binnenooraandoeningen.

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

Er worden drie doelen nageleefd in dit onderzoek gericht op het ontdekken van potentieel nieuwe medicijnen:

- Het identificeren van nieuwe moleculen die de functie van het binnenoor reguleren.
- De functie van deze moleculen bij binnenooraandoeningen onderzoeken
- Medicijnen die de functie van deze moleculen beïnvloeden testen in een preklinische set laboratorium- en dierexperimenten.

Het nastreven van deze doelen zal leiden tot zowel korte als lange termijn voordelen voor zowel de wetenschap als de maatschappij. Ter illustratie, dit project:

- Levert wetenschappelijke inzichten in het functioneren van het binnenoor.
- Identificeert nieuwe moleculen die gebruikt kunnen worden om medicijnen voor te ontwikkelen.
- Test hoe mogelijke nieuwe medicijnen deze nieuwe moleculen kunnen beïnvloeden op een preklinische wijze.
- Op de lange termijn draagt dit onderzoek bij aan het openen van een markt voor medicijnen voor een onvervulde zorgbehoefte. Ondanks de hoge prevalentie van binnenooraandoeningen zijn er nauwelijks medicijnen ter behandeling.
- Uiteindelijk zullen medicijnen voor binnenooraandoeningen bijdragen aan een verbeterde kwaliteit van leven voor patiënten met binnenooraandoeningen en sociaaleconomische lasten als gevolg van binnenooraandoeningen verminderen.

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

Muizen (7.120), ratten (812), gerbils (812)

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

Herstel van narcose kan licht ongerief veroorzaken. Herhaald gebruik van narcose kan mild gewichtsverlies veroorzaken. Veroudering kan leiden tot leeftijdsgebonden morbiditeit waaronder gewichtsverlies, verlies van het vermogen om goed te kunnen lopen, rectale prolaps en een verhoogde vatbaarheid voor ziekte. Ototoxische stoffen en drugs kunnen onverwachte nadelige effecten hebben. Al deze mogelijke negatieve effecten kunnen variëren tussen genetisch gemodificeerde muislijnen, muisstammen, en knaagdiersoorten.

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

Licht (ongeveer 40%) tot matig (ongeveer 60%)

3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?

Afhankelijk van de experimenten kunnen de dieren blijven leven voor hergebruik of worden de dieren geëuthanaseerd voor weefselonderzoek.

4 Drie V's

4.1 **Vervanging**

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

Mogelijkheden voor vervanging zijn uitvoerig onderzocht, maar bleken niet mogelijk door de complexe aard van de onderzoeksvraag. Om de onderzoeksvraag te beantwoorden is de complexiteit van een heel organisme nodig.

- Gebruik van gekweekt menselijk of dierlijk weefsel is niet mogelijk. Er zijn grote anatomische en fysiologische verschillen zijn tussen cellen die een kweek zijn gegroeid en cellen die zich in een levend dier ontwikkelen.
- Daarnaast is het niet mogelijk om zonder levende dieren experimenten uit te voeren die gebruik maken van het hele auditieve systeem.

4.2 **Vermindering**

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

- Nauwkeurige selectie van de diermodellen. Waar mogelijk worden inteeltlijnen gebruikt om biologische variatie van de resultaten te verminderen.
- Nauwkeurig ontwerp van de experimenten. Waar mogelijk worden statistische analyses (power analyses) gebruikt om een nauwkeurige berekening van de steekproefgrootte in te schatten. Daarnaast worden dieren zoveel mogelijk voor meerdere experimenten gebruikt.
- Regelmatig literatuuronderzoek. Een systematisch onderzoek van nieuwe literatuur verzekert dat dierexperimenten niet onnodig worden uitgevoerd.

4.3 **Verfijning**

Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diermodel(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.

Knaagdieren (muizen, ratten en gerbils) zijn ideale diermodellen voor deze experimenten.

- De anatomie en fysiologie zijn vergelijkbaar met die van mensen.
- Het auditieve systeem van knaagdieren (en in het bijzonder ratten, muizen en gerbils) wordt al jaren bestudeerd. Er zijn goed omschreven standaardexperimenten en technieken beschikbaar voor deze dieren.
- Met kleine knaagdieren zijn grootschalige studies mogelijk.
- Veel aspecten van gehooraandoeningen, inclusief onderliggende oorzaken (genetisch, omgeving- en leeftijdsafhankelijk) die van invloed zijn bij mensen, komen ook voor bij knaagdieren.

Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen

De onderzoeker heeft meer dan 15 jaar ervaring met onderzoek naar het auditieve systeem in knaagdieren en is bekend met de meest verfijnde manier om technieken uit te voeren.

voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.

Indien nodig worden anesthetica en pijnbestrijders gebruikt, het welzijn wordt nauwkeurig bijgehouden.

Hoewel nadelige effecten niet verwacht worden, worden humane eindpunten aangehouden.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen



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

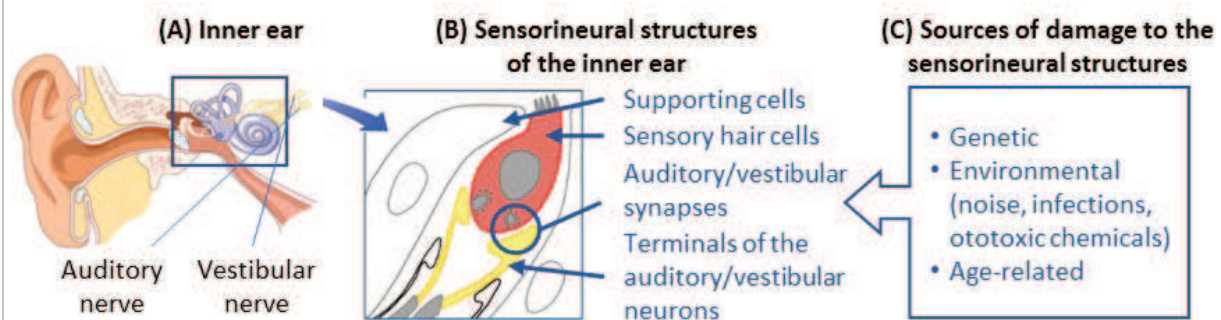
3.1 Background

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.

Both the auditory and vestibular portions of the inner ear rely on common structural and functional components to encode sound and head position. Although auditory and vestibular perception remain largely unrecognized by healthy individuals, its importance is revealed by the profound disability that

results when hearing and balance are lost. The most common and also least treatable forms of hearing and balance disorders involve dysfunction of the inner ear and include sensorineural hearing loss, tinnitus (ringing in the ears), and vertigo¹ (see figure below). These disorders are complex, heterogeneous, and often co-presenting. They involve genetic, environmental and age-related factors; however, in many cases the etiology is unknown¹.



Inner ear disorders involve damage to the sensorineural structures of the inner ear. Sound and head position are encoded into neuronal signals in the inner ear and transmitted to the brain via the auditory and vestibular nerves (A). This process relies on similar sensorineural structures (B). Recent research indicates that the auditory and vestibular synapses are the sensorineural structures particularly vulnerable to damage. Sources of damage include genetic, age-related and environmental factors that likely lead to pathophysiology of the auditory and vestibular synapses via common molecular pathways^{1,10} (C).

Current treatment options for inner ear disorders are limited. Although hearing aids and cochlear implants have greatly improved treatment of hearing loss, hearing aids require functioning sensory hair cells and auditory nerve and cochlear implants require a functioning auditory nerve. Unfortunately, sensorineural hearing loss, the most common form of hearing loss (accounting for an estimated 90% of all hearing loss), involves (by definition) the loss of function of these structures. Moreover, hearing with hearing aids and/or cochlear implants is still challenging in complex listening environments (like family gatherings). Finally, neither hearing aids nor cochlear implants prevent further hearing loss or reverse hearing loss.

There are currently no reliably effective treatments for other inner ear disorders, including tinnitus or vestibular disorders¹. Medications used to treat these disorders are limited to symptom management and/or medications used in off-label manners. For example, tinnitus is most commonly treated with anti-depressants and anti-anxiety medications². However, in some cases these medications worsen tinnitus, and there is growing concern that these medications may ultimately make it more difficult for patients to habituate to tinnitus over time. Meniere's disease³, the most common vestibular disorder, is thought to result from abnormal amounts of fluid (endolymph) in the inner ear. However, this cause has yet to be validated or specifically treated by targeted medications. Instead, Meniere's disease is most commonly treated with medications to manage dizziness and vomiting. As a salvage (rescue or last resort) treatment, steroid injections can be administered, but recovery is not complete and efficacy is not reliable.

Research over the past few decades shows that almost all inner ear disorders arise from the (physical and/or functional) loss of these sensory structures in the inner ear¹. Both the auditory and vestibular portions of the inner ear rely on common structural and functional components to encode sound and head position. These include 1) the sensory structures (the sensory hair cells), 2) the neural structures (the auditory and vestibular nerves) and 3) the neighboring supporting cells that maintain the fluid compositions necessary for proper development, function, and maintenance of the sensory structures. Understanding the normal physiology and pathophysiology of these structures is essential to developing effective and reliable drug-based treatments for inner ear disorders.

Indeed, the search for drug-based treatments for a variety of inner ear disorders is a rapidly growing area of research^{4,5}. This shift reflects a growing appreciation that inner ear disorders, like other complex diseases (such as cardiovascular diseases, diabetes, and depression) can and should be treated pharmacologically. In fact, several major biopharmaceutical firms have prioritized the development of drugs to treat inner ear disorders, and a number of drugs are in various phases of clinical trials. Nonetheless, no drugs are yet approved to treat inner ear disorders and the drug target discovery rate is slow. Advances in drug-based treatments for inner ear disorders have been thwarted by the relatively small size and inaccessibility of the inner ear. Three main obstacles continue to prevent more rapid pre-clinical development of drug-based treatments for inner ear disorders:

1. The molecules regulating the physiology of the sensory and supporting cells of the inner ear are still largely unknown. The identification of these molecular mechanisms is essential to identify promising new drug targets.
2. The underlying etiology of many inner ear disorders is still unknown. Although there are suspected molecular mechanisms, few of these mechanisms have been validated in animal or patient models. The validation of these molecular mechanisms in the pathophysiology of inner ear disorders is essential to prioritize new drug targets for pre-clinical screening.
3. Finally, targeting drugs to the inner ear and screening their effectiveness to treat inner ear disorders requires diverse methodology, from molecular physiology to audiometric assessments in preclinical models. This interdisciplinary toolkit is essential to screen new drug targets pre-clinically.

This project aims to overcome these obstacles by integrating a range of expertise and techniques to examine the structure and function of the inner ear using both bottom-up (*in vitro*) and top-down (*in vivo*) approaches in rodents. Because these approaches together serve to relate the molecular and cellular health of the sensory and supporting structures to *in vivo* function of the inner ear, experimental techniques are often combined in the same rodents, minimizing the number of animals required while also maximizing research impact. The three specific objectives of this proposal are:

1. Identify the molecules and mechanisms that regulate the sensory and supporting structures in the inner ear.
2. Validate the involvement of these molecules and mechanisms in function and dysfunction of the inner ear.
3. Screen modulators of these molecules and mechanisms to reduce, reverse and/or prevent inner ear disorders.

Because of the heterogeneity of inner ear disorders, a variety of drug-based treatments and therefore drug targets will be required to treat inner ear disorders. This research focuses specifically on identifying, prioritizing and screening drug targets that regulate the neural connections (synapses) between the sensory cells and the brain. This emphasis is based on recent research that indicates that these sensorineural structures are the most vulnerable to damage (from both genetic, environmental and age-related factors), causing inner ear “neuropathy.” Molecules of special interest are, therefore, synaptic proteins, especially ion channels and transporters⁶, because they 1) regulate excitability of the sensory structures^{6,7}, 2) mediate generation of the ionic composition by the supporting structures^{6,7} and 3) are highly “druggable”^{8,9}. Importantly, the research laboratory has developed the essential interdisciplinary methodology for examining the structure and function of these neural connections using both bottom-up (*in vitro*) and top-down (*in vivo*) approaches in preclinical models. Ion channels belong to a growing list of drug targets for the treatment of inner ear disorders. However, the vast number of ion channels in the inner ear have yet to be identified. The research strategy of this proposal aims to accelerate the discovery rate of those ion channels that are likely to effectively and reliably treat inner ear disorders.

¹Ciuman RR. Inner ear symptoms and disease: pathophysiological understanding and therapeutic options. *Med Sci Monit.* 2013. 19:1195-210.

²Beebe Palumbo D et al. The Management and Outcomes of Pharmacological Treatments for Tinnitus. 2015. *Curr Neuropharmacol.* 13:692-700. Review.

³Espinosa-Sanchez JM and Lopez-Escamez JA. Meniere's disease. 2016. *Handb Clin Neurol.* 137:257-77.

⁴El Kechai N et al. Recent advances in local drug delivery to the inner ear. *Int J Pharm.* 2015. 494:83-101.

⁵Chabbert C. Principles of vestibular pharmacotherapy. 2016. *Handb Clin Neurol.* 137:207-18.

⁶Mittal R et al. Indispensable Role of Ion Channels and Transporters in the Auditory System. *J Cell Physiol.* 2017. 232:743-758.

⁸Imming P et al. Drugs, their targets and the nature and number of drug targets. *Nat Rev Drug Discov.* 2006. 5:821-834.

⁹von Eichborn J et al. SynSysNet: integration of experimental data on synaptic protein-protein interactions with drug-target relations. *Nucleic Acids Res.* 2013. 41:D834-40. *Curr Neuropharmacol.* 2015;13(5):692-700.

¹⁰Yang CH et al. Age-related hearing impairment and the triad of acquired hearing loss. 2015. *Front Cell Neurosci.* 9:276.

3.2 Purpose

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

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

The research objectives listed in 3.1 serve to achieve the *immediate goal* of this project: to establish a hypothesis-driven and rapid-throughput pre-clinical assay to identify, prioritize and screen drug targets to treat and prevent inner ear disorders. These objectives are essential to achieve the *ultimate goal* of this project: to develop effective and reliable pharmaceutical treatments for inner ear disorders.

To achieve these goals, this project takes advantage of three established animal models (mice, rats and gerbils) used for decades in auditory and vestibular research. These animal models are well-suited for this project because of their genetic and pharmacological tractability and also amenability to a variety of *in vitro* techniques and *in vivo* audiovestibulometric and behavioral assessments of inner ear function. Very importantly, these animals have well-established strain and species-specific differences in their susceptibility to inner ear disorders in response to genetic, environmental and age-related factors. These differences are exploited to identify the molecules (especially ion channels, ion transporters and synaptic proteins) and mechanisms contributing to the pathology of inner ear disorders.

Although ambitious, the immediate goal of this project is feasible and the research strategy appropriately 1) combines the necessary expertise and infrastructure and 2) adheres to the 3Rs. Specifically, this project utilizes:

- Extensive expertise developed in the responsible researcher's laboratory using *in vitro* techniques to examine molecular, cellular, and synaptic physiology and *in vivo* techniques to assess inner ear function in preclinical models.
- Unique network of academic, clinical, and industrial collaborators that provide additional essential expertise.
- Exceptionally equipped animal facilities with expertly trained management and technical staff.

Completion of the proposal's objectives will:

- Define the molecules that are present in the inner ear and specifically positioned to regulate the the sensory and supporting structures.
- Determine the mechanisms by which these molecules regulate the sensory and supporting structures.
- Identify the contributions of these molecules to inner ear function and dysfunction.
- Test if modulation of these molecules reduces and/or prevents inner ear dysfunction.

3.3 Relevance

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

Scientific relevance

Treatments for inner ear disorders have not improved substantially since the introduction of modern hearing aids over fifty years ago. Unfortunately, hearing aids are often fraught with compliance issues¹ and, like cochlear implants, do not restore normal hearing and do not prevent further hearing loss. Worse yet, no effective and reliable treatments are indicated for tinnitus or vestibular disorders². Pharmaceutical treatments lag so far behind for inner ear disorders compared to other diseases because the molecular bases of cellular, circuit and systems biology of the inner ear is still very poorly understood. Building this scientific knowledge is absolutely essential to understand the molecular mechanisms underlying sensory encoding and inner ear function and to identify drugs to treat and prevent inner ear disorders.

To highlight the scientific relevance, this research project

- tackles basic science questions (to understand the molecular mechanisms underlying sensory encoding and inner ear function) using a translationally relevant strategy (to identify drugs to treat and prevent inner ear disorders).
- complements existing strategies to treat and restore inner ear function. Both hair cell regeneration and gene therapy rely on identification of genes (such as those encoding ion channels) that define the differentiated sensory hair cells and/or are targets for gene therapy.

Societal relevance

Hearing (auditory) and balance (vestibular) disorders are major public health issues with significant societal and economic consequences. 3% of all school age children, 60% of the workforce, and 1 out of 3 adults over the age of 65 have a hearing impairment³. Vestibular dysfunction affects an estimated one-third of the population over age 40, 65% of people over age 60 and 85% of people aged 80 and older⁴. Hearing impairment costs Europe an estimated €213 billion per year⁵ and reduces the GDP by an estimated 1.4% through lost workforce productivity and increased financial costs incurred by healthcare systems and educational and support services⁶. A recent multi-country investigation of patients with balance disorders² found that only half were employed. Of the working patient population, 69.8% had reduced their workload, 63.3% had lost working days, 4.6% had changed jobs, and 5.7% had quit jobs at one point due to vertigo symptoms⁷. Use of healthcare services among patients with vertigo was also high⁷.

Finally, loss of hearing and/or sense of balance can be extremely debilitating, greatly reducing education and employment opportunities and overall well-being. Recent research also makes quite clear that inner ear disorders are more than worrying lifestyle issues and that adults with inner ear disorders are at increased risk of cardiovascular diseases, Alzheimer's and dementia, diabetes, kidney diseases, falls, and depression⁸. Currently, it is not known whether a common underlying cause increases susceptibility to inner ear disorders and other diseases in parallel or whether loss of inner ear function, in fact, increases susceptibility to a variety of other disorders. In fact, a combination of both mechanisms may be involved. Regardless, treating inner ear disorders is an essential component of comprehensive healthcare to reduce

morbidity and mortality.

With increasing life expectancies, the numbers of individuals suffering from inner ear disorders will only increase. Meeting the global challenge of healthy aging urgently requires effective and reliable treatments for inner ear disorders. This research, which aims to relate function of the inner ear function at the cellular and molecular level to function *in vivo* (and vice versa), is positioned to have the greatest impact on the development of pharmaceutical interventions to treat hearing and balance disorders. This research relies on animal models to investigate function of the inner ear in ways that would be otherwise impossible. Considering the high potential benefit to society and the low suffering to animals, the experiments proposed in this project are ethically justified.

¹Chien et al. Prevalence of hearing aid use among older adults in the United States. Arch Intern Med. 2012. 172:292-293.

²Ciunan RR. Inner ear symptoms and disease: pathophysiological understanding and therapeutic options. Med Sci Monit. 2013. 19:1195-210.

³See: <http://www.who.int/pbd/deafness/news/Millionslivewithhearingloss.pdf>

⁴Agrawal Y et al. Disorders of balance and vestibular function in US adults: data from the National Health and Nutrition Examination Survey, 2001-2004. Arch Intern Med. 2009. 169:938-944.

⁵See: http://www.hear-it.org/sites/default/files/multimedia/documents/Hear_It_Report_October_2006.pdf

⁶See: <http://audiology.asn.au/public/1/files/Publications/ListenHearFinal.pdf>

⁷Benecke H et al. The Burden and Impact of Vertigo: Findings from the REVERT Patient Registry. Front Neurol. 2013. 4: 136

⁸See: <http://www.hearinghealthusa.com/hearing-loss-connected-health-conditions/>

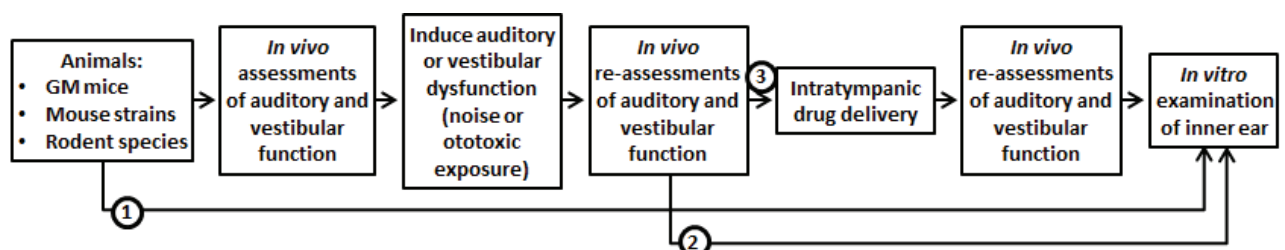
3.4 Research strategy

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

The research strategy of this project utilizes a step-wise progression of *in vitro* and *in vivo* animal experiments to achieve the immediate goal of this research: to establish a hypothesis-driven and rapid-throughput pre-clinical assay to identify drugs to treat and prevent inner ear disorders. The three main immediate objectives are to:

1. Identify the molecules and mechanisms by which genetic, environmental and age-related factors regulate the sensory and supporting structures in the inner ear.
2. Validate the involvement of these molecules and mechanisms in function and dysfunction of the inner ear.
3. Screen modulators of these molecules and mechanisms to reduce, reverse and/or prevent inner ear disorders.

This progression is illustrated in the figure below.



Ion channels and transporters and synaptic proteins are molecules of special interest. Genomic and transcriptomic approaches, especially utilizing rodents with varying susceptibility to inner ear disorders, are used to identify molecules specifically regulating susceptibility. These molecules and their relevant molecular mechanisms are considered promising drug targets with a likelihood of clinical efficacy to treat and prevent inner ear disorders and motivate further characterization via objectives 1-3.

To achieve objective 1 (①) *in vitro* examination of the inner ear is performed to identify molecules that

regulate the sensory and supporting structures. To achieve objective 2 (②), a combination of *in vitro* and *in vivo* assessments of inner ear function are used to validate the involvement of these molecules in the function and dysfunction of the inner ear. Finally, to achieve objective 3 (③), this pipeline of *in vitro* and *in vivo* assessments is used to screen modulators of these molecules applied intratympanically to reduce, reverse and/or prevent inner ear disorders.

This research is expected to characterize:

1. The molecular identities and subcellular localizations of ion channels (and other synaptic proteins) in the inner ear sensorineural structures using a combination of *in vitro* approaches (e.g. molecular biology, electrophysiology, and immunofluorescence) (①).
2. The biophysical properties of these ion channels (and other synaptic proteins) and the molecular pathways by which these ion channels regulate the structure and function of the inner ear sensorineural structures using a combination of *in vitro* approaches (①).
3. The contributions of these ion channels (and other synaptic proteins) to normal inner ear function and also inner ear disorders using a combination of *in vitro* and *in vivo* approaches (e.g. audiometry, behavioral assessments, and pharmacology) (②).
4. Whether modulation of these ion channels or their relevant molecular pathways prevents, slows, or reverses inner ear disorders using a combination of *in vitro* and *in vivo* approaches (③).

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 basic outline and rationale of experiments is explained below.

Objective 1 (①): Identify the molecules and mechanisms by which genetic, environmental and age-related factors regulate the sensory and supporting structures in the inner ear.

To identify molecules that regulate the sensory and supporting structures in the inner ear, these structures are isolated from the inner ear and analyzed using a variety of *in vitro* assessments of the inner ear. Often the inner ear can be removed without previous fixation, but cardiac perfusion before removal of the inner ear is necessary for some experiments that require better preservation of the inner ear vasculature.

Following removal of the inner ear, the responsible researcher's laboratory has developed experimental techniques to isolate the intact auditory and vestibular sensory epithelia and also supporting cells so that they are amenable to subsequent genomic and transcriptomic approaches as well as immunofluorescence and single cell (patch clamp) electrophysiology. The health status of the sensory and supporting structures can also be examined histologically. This combination of molecular techniques allows identification, subcellular localization, and functional *in vitro* examination of the molecules regulating inner ear function and pathology.

Objective 2 (②): Validate the involvement of these molecules and mechanisms in function and dysfunction of the inner ear.

To validate the involvement of these molecules and mechanisms in inner ear disorders, the *in vitro* assessments described in ① are coupled with a variety of *in vivo* assessments of inner ear function. These *in vivo* assessments are often performed before and after damage to the inner ear induced by genetic, age-related or environmental factors. This proposal does not *per se* examine the interaction of these factors but rather uses particular sources of damage to validate the involvement of molecules and molecular pathways (and, thus, potential drug targets) in the pathophysiology of particular inner ear disorders. These sources of damage are chosen because they are ecologically relevant, "dosable," and well characterized experimentally.

In vivo assessments of hearing function include These include auditory brainstem response (ABR) measurements, vestibular evoked potential (VsEP) measurements and otoacoustic emission (OAE) measurements. ABR measurements quantify hearing thresholds and health of the sensory (inner) hair cells and neuronal connections. A related technique, VsEP measurements quantify vestibular thresholds health of the sensory vestibular hair cells and neuronal connections. OAE measurements assess health of the sensory (outer) hair cells. These assessments are performed under anesthesia, are minimally invasive and not terminal. Therefore, they can be re-assessed as necessary to monitor inner ear function over time (with aging) or in response to experimental treatments (like noise or ototoxic exposure). As described in the figure, these procedures are coupled with *in vitro* assessments, serving to relate *in vivo* and *in vitro* function of the inner ear in the same animals and, thereby, minimize the number of animals required.

To assess more finely the *in vivo* function of the sensory structures of the inner ear, the cochlear potentials will be measured with round window recordings in some experiments. These recordings specifically measure the sensory hair cell receptor potentials and the neuronal compound action potentials. These experiments will be performed when ABR measurements do not clearly assign inner ear defects to dysfunction of the hair cells or neurons (and this information is essential to understand the underlying physiology or pathophysiology). To measure the endocochlear potential (EP) generated by the supporting cells of the inner ear and necessary for normal function of the inner ear, EP measurements will be performed when defects in the EP are suspected. Both of these procedures are performed under anesthesia and expected to cause minimal discomfort. These procedures are terminal and coupled to *in vivo* and *in vitro* assessments whenever possible.

To measure the susceptibility to environmental factors that cause inner ear disorders, some animals will undergo noise or ototoxic exposure to induce carefully titrated hearing loss, tinnitus or vestibular dysfunction. Noise and ototoxic exposure are extremely clinically relevant environmental sources of hearing loss and provide reliable, replicable and graded (“dosable”) animal models of auditory dysfunction. These procedures have minimal systemic side-effects, are expected to cause minimum discomfort, and are coupled with *in vivo* and *in vitro* assessments of behavior and inner ear function.

To assess the perception of tinnitus, a behavioral assessment of tinnitus perception will be performed in some experiments. To assess the integrity of the vestibular system *in vivo*, behavioral assessments of vestibular function will be performed in some experiments. These techniques are non-invasive, not terminal, and again coupled with *in vivo* and *in vitro* assessments.

Objective 3 (③): Screen modulators of these molecules and mechanisms to reduce, reverse and/or prevent inner ear disorders.

To screen modulators of molecules identified in ① and ②, the assay is expanded to include intratympanic administration of molecular modulators (drugs) to test the ability of these modulators to reduce, reverse and/or prevent inner ear disorders. Intratympanic drug administration is a robust and replicable inner ear drug delivery system that avoids possible complications of systemic administration^{1,2}. Intratympanic administration of drugs is already used as an outpatient procedure, establishing its safety and clinical relevance as an administration route. In patients, intratympanic injections cause only minor discomfort and are done while patients are awake and in some cases without local anesthesia. In both patient and animal models, side effects are minimal and infrequent. In these procedures (③), drug efficacy and reliability is quantified in experimental versus control groups using a combination of the *in vivo* and *in vitro* assessments.

¹El Kechai N et al. Recent advances in local drug delivery to the inner ear. Int J Pharm. 2015. 494:83-101.

²Salt AN, Plontke SK. Principles of local drug delivery to the inner ear. *Audiol Neurotol.* 2009. 14:350-60.

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.

This project utilizes a step-wise progression of *in vitro* and *in vivo* animal experiments to establish a pre-clinical assay to identify drugs to treat and prevent inner ear disorders. These experiments are coherently combined into three objectives that represent discrete milestones and go/no go points. This full repertoire of assessments is essential to establish an assay that moves swiftly from identification to validation and screening.

To provide a single example of the workflow, *in vitro* techniques described in ① were used by the responsible researcher to identify a potassium channel encoded by the *kcnma1* gene expressed in the sensory hair cells. Subsequent *in vivo* techniques described in ② verified the contribution of this channel to protection from noise-induced hearing loss, making use of *kcnma1*^{-/-} mice. These results now motivate additional *in vivo* techniques described in ③ to test if application of an agonist of this potassium channel (in wildtype mice) prevents noise-induced hearing loss (one of the most common forms of acquired hearing loss). This ion channel has numerous drug agonists and antagonists, indicating its “druggability.” For these reasons, this ion channel is a viable drug target to prioritize for screening to treat acquired hearing loss. Furthermore, the identification of this ion channel illustrates the success of the research strategy (identify → validate → screen) to identify new drug targets. Finally, this drug target joins a growing list of ion channels being targeted for the treatment of inner ear disorders. However, the vast number of ion channels in the inner ear have yet to be identified. The research strategy of this application aims to accelerate the discovery rate.

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 | Hearing loss and tinnitus: molecular characterization, induction and assessment, and treatment |
| 2 | Vestibular dysfunction: molecular characterization, induction and assessment, and treatment |
| 3 | |
| 4 | |
| 5 | |
| 6 | |
| 7 | |
| 8 | |
| 9 | |
| 10 | |



Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website (www.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 |
|---------------|--|
| 1 | Hearing loss and tinnitus: molecular characterization, induction and assessment, and treatment |
- 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

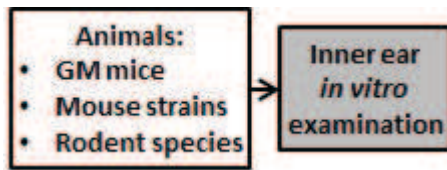
Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

These animal procedures are designed to achieve objectives 1-3 and specifically 1) identify the molecules and mechanisms that contribute to susceptibility to induced and/or age-related hearing loss and tinnitus and 2) test the efficacy of drugs to reduce, reverse and/or prevent induced and age-related hearing loss and tinnitus. These procedures utilize genetically modified mice lines, different mouse strains, and three rodent species to identify the molecular bases of differences in the comparative susceptibility to hearing loss and tinnitus observed in these animal models. These procedures combine various assessments to relate *in vivo* and *in vitro* function and dysfunction of the inner ear in the same animals and, thereby, minimize the number of animals required.

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

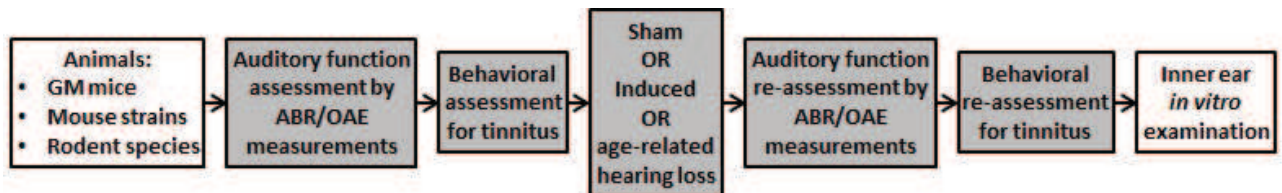
Procedures are separated into four streams of experiments that provide go/no go points for subsequent investigation.

Stream 1:



The first stream of experiments designed to achieve objective 1 (identify the molecular mechanisms that regulate the sensory and supporting structures in the inner ear). The inner ear is isolated for subsequent *in vitro* examination. This procedure takes less than 10 minutes is terminal, performed under anesthesia, and expected to cause minimum discomfort. In some cases, cardiac perfusion of tissue fixative will be performed before removal of the inner ear. The procedure then lasts about 30 minutes.

Stream 2:



The second stream of experiments is designed to achieve objective 2 (validate the involvement of these molecular mechanisms in function and dysfunction of the inner ear). In this stream, animals undergo quantitative assessment of auditory function by auditory brainstem response (ABR) and otoacoustic emission (OAE) measurements to measure baseline differences in auditory function between control and experimental groups. These procedures require approximately 30 to 60 minutes, are minimally invasive, and are performed under anesthesia.

Following recovery, animals are trained to complete a behavioral assessment to test for the perception of tinnitus. The perception of tinnitus by an animal is measured by differences in the animal's ability to detect and respond appropriately to sound gaps. The use of sound gaps to detect tinnitus is common in the field. The expectation is that the perception of tinnitus masks the sound gap so that errors in response to sound gaps increases with the perception of tinnitus. In these procedures, animals are required to move from one compartment to another upon detection of a sound gap. The initial training requires approximately 2 hours per day for 10 to 15 days. Testing requires approximately 1 hour. The procedure is non-invasive.

Animals then undergo either noise- or ototoxic-induced hearing loss and sham exposure or are allowed to age (for a total of three treatment regimens/groups). Calibrated noise (typically at a level of 90-120 dB SPL and frequency between 8-16 kHz) exposure typically lasts one to two hours. Ototoxic induction typically requires minimally invasive i.p. injections once daily over 1 to 3 days. Animals are allowed to age between 6 months and up to two years. Because many animal models that are either congenitally deaf or acquire deafness later in life show no changes in overall well-being or reproductive fitness, hearing loss in these procedures is not expected to reduce animal wellbeing.

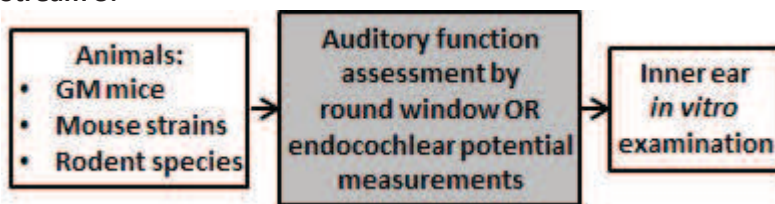
Animals then undergo quantitative re-assessment of auditory function by ABR/OAE measurements to measure differences in auditory function (and susceptibility to hearing loss) between control and experimental groups. These procedures require approximately 30 to 60 minutes, are minimally invasive, and are performed under anesthesia.

Following recovery, animals are re-tested for the perception of tinnitus. (Re-training may be implemented in some cases). The failure to move correctly between compartments indicates the failure to detect sound

gaps presumably due to the perception of tinnitus. Testing requires approximately 1 hour. The procedure is non-invasive.

At the conclusion of these assessments, the inner ear is isolated for subsequent *in vitro* examination. This procedure takes less than 10 minutes is terminal, performed under anesthesia, and expected to cause minimum discomfort. In some cases, cardiac perfusion of tissue fixative will be performed before removal of the inner ear. The procedure then lasts about 30 minutes.

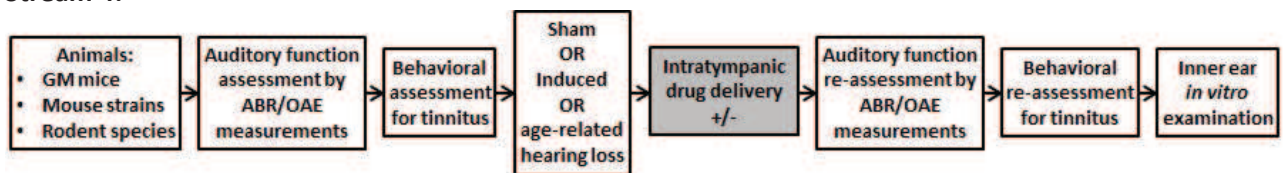
Stream 3:



The third stream of experiments is designed to achieve objective 2 (validate the involvement of these molecular mechanisms in function and dysfunction of the inner ear). In this stream, the molecular mechanisms that contribute to susceptibility to induced and/or age-related hearing loss and tinnitus are further characterized. In these procedures, animals undergo terminal assessments of auditory function. These assessments include round window recordings and measurements of the endocochlear potential and are performed under anesthesia.

At the conclusion of these assessments, the inner ear is isolated for subsequent *in vitro* examination. This procedure takes less than 10 minutes is terminal, performed under anesthesia, and expected to cause minimum discomfort. In some cases, cardiac perfusion of tissue fixative will be performed before removal of the inner ear. The procedure then lasts about 30 minutes.

Stream 4:



The fourth stream of experiments is designed to achieve objective 3 (screen modulators of these molecular mechanisms to reduce, reverse and/or prevent inner ear disorders). This stream largely parallels procedures described in stream 2 with the exception that drugs modulating molecular mechanisms identified to contribute to the susceptibility to induced- and/or age-related hearing loss and/or tinnitus are applied intratympanically in anesthetized animals. Administration requires approximately 30 minutes and is minimally invasive. Some animals undergo sham delivery with the drug vehicle only. Subsequent assessments of auditory function, perception of tinnitus, and *in vitro* examination will quantify and characterize protection from hearing loss and tinnitus by drug administration.

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

To minimize the number of animals, procedures are staged in four “streams” of investigation that provide go/no go points for subsequent investigation. (For example, if there is no phenotypic difference observed after stream 2, then streams 3 and 4 will not be performed.) Many aspects of hearing function and dysfunction are examined in the same cohorts of animals. Power analyses (using effect sizes and standard

deviations predicted from previous research) are used to refine the minimum number of animals required to achieve statistical significance for specific molecular mechanisms under investigation. To further minimize the number of animals required, pilot experiments are performed to determine dosing regimens and training in procedures is provided.

B. The animals

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

These experiments will utilize mice, rats and gerbils obtained from licensed vendors and our own breeding. Animals will be examined at various life stages, from birth—to assess the maturation of hearing and susceptibility to hearing loss— to old age (between 15–18 months for mice and rats and at approximately 32 months for gerbils)—to examine age-related hearing loss.

Mice, rats and (Mongolian) gerbils are well-suited for this project because of their genetic and pharmacological tractability and also amenability to a variety of *in vitro* techniques and *in vivo* audiometric and behavioral assessments of inner ear function. Very importantly, these animals have well-established strain and species-specific differences in their susceptibility to inner ear disorders in response to genetic, environmental and age-related factors. These differences are exploited to identify the molecules (especially ion channels, ion transporters and synaptic proteins) and mechanisms contributing to the pathology of inner ear disorders.

Rodents (mice, rats, and gerbils) are, in general, ideal animal models for these experiments for many reasons:

- The anatomy and physiology of the auditory system is similar between rodents and humans.
- The auditory system of rodents (and especially rats, mice, and gerbil) has been studied for decades. As a result, there are a variety of established tools and techniques and refined procedures developed using these animals.
- Rodents are small, facilitating large scale/high throughput studies.
- Rodents provide an excellent *in vivo* disease model: many aspects of hearing disorders, including their underlying causes (genetic environmental, and age-related), seen in humans are recapitulated in rodent models.
- Rodent models are a requisite part of testing before drugs can be tested in humans.

In these procedures we request rats and (Mongolian) gerbils in addition to mice because of specific experimental advantages afforded by these animals. Rats are larger in size than mice and therefore allow more sophisticated surgical manipulations (such as intratympanic injections). Rats have greater cognitive capacity and therefore are more amenable for behavioral assessments (such as those used to assess the perception of tinnitus). Finally, rats compared to mice have metabolic physiology more similar to humans and are therefore more suited for pharmacological and toxicological studies. Mongolian gerbils live longer than mice and are, like humans, susceptible to age-related hearing loss through pathways distinct from those observed in mice. Unlike mice, gerbils have sensitive hearing in the frequency range important for human communication. Importantly, both rats and gerbils have a long history of use as animal models to examine the peripheral auditory system, providing an excellent comparative background. Finally, while genetic homogeneity is a key advantage of mouse models, it is also a distinct disadvantage because it does not recapitulate the genetic variation seen in humans. Thus, mice do not recapitulate the complex interactions of genetics and environmental factors that contribute to the variations in susceptibility to inner ear disorders seen in people. In this sense, a comparative approach is absolutely essential for any medically relevant research. Thus, the three species requested, mice, rats and gerbils, will be used to identify the essential molecules and molecular pathways underlying inner ear disorders utilizing a comparative approach, optimize procedures and experimental outcomes, and validate preclinical

effectiveness of treatments for inner ear disorders.

The estimated number of animals required for these procedures is based on consideration of the number of genetically modified mouse lines, mouse strains, and species investigated as part of these streams, and the number of animals required for training to refine procedural techniques.

There are currently 5 genetically modified (GM) mouse lines available for characterization. These GM mouse lines show or are hypothesized to show differences in their susceptibility to induced and/or age-related hearing loss and tinnitus. (Examples of mouse lines under investigation and/or targeted for investigation include mice genetically engineered to lack genes encoding ion channels and transporters: for example, the potassium channels such as those encoded by the *kcnma1*, *kcnt1*, and *kcnt2* genes). Because this project exploits emerging research, an additional 2 GM mouse lines are anticipated for characterization each year. Thus, this proposal estimates characterizing a total of 10 GM mouse lines over the next five years.

There are currently, 5 mouse strains available for characterization. These mouse strains show differences in their susceptibility to noise and/or age-related hearing loss. Thus, this proposal estimates characterizing a total of 5 mouse strains over the next five years.

There are currently 2 additional species available for characterization—gerbils and rats—that show differences in their susceptibility to noise and/or age-related hearing loss compared to mice. Thus, this proposal estimates characterizing a total of 2 additional species over the next five years.

For stream 1, we anticipate requiring approximately 80 (40 control and 40 experimental) animals for in vitro assessment of the inner ear, which can include “omics” analysis of alterations in expression, electrophysiological characterization of molecular function, and immunofluorescent examination of sensory and supporting cell structure. Based on previous experiments we expect that we will need approximately 40 animals total for each control and experimental group: 10 animals for “omics” analyses, 20 animals for electrophysiological recordings examining whole cell currents and/or synaptic transmission in the specific sensory and supporting structures of the inner ear, and 10 animals for immunofluorescent examination (localization of molecular targets and/or examination of morphological changes). Stream 1 will, therefore, require a total of $80 \times (10+5)$ or 1,200 mice, 80 gerbils and 80 rats.

As stated above, for “omics” analyses, an estimated 10 animals are required. For these procedures, the most sensitive techniques available are used. Current protocols optimized as part of this research (see Braude et al., 2015) require a minimum of 8 animals to obtain sufficient quantities of high quality RNA and biological replicates. Given an estimated failure rate of 2 animals (20%), then a total of 10 animals is required. These calculations are the same for mouse, rat and gerbil.

As stated above, for electrophysiological recordings an estimated 20 animals are required. Electrophysiological recordings can examine a number of processes in the inner ear, including 1) whole cell hair cell currents and 2) properties of synaptic transmission [REDACTED]. Predicting the effect sizes of experimental manipulations on these two processes is difficult to predict. However, past research indicates that approximately 6 animals are required to observe statistically significant differences in hair cell currents (for example, [REDACTED]) and approximately 6 animals are required to observe statistically significant differences in properties of synaptic transmission (for example, Ye et al., 2017). Due to the technical difficulty of these experiments, failure rate is typically 40%. Thus an extra 8 animals are required. In total, these experiments will require 20 animals. These calculations are the same for mouse, rat and gerbil.

As stated above, for immunofluorescence an estimated 10 animals are required. This number is based on the minimum number of animals required to follow best practices when using immunofluorescence to identify protein localization. Following methodology outlined in Rhodes and Trimmer (2006), two distinct antibodies (raised against distinct, non-overlapping epitopes on the same target protein), replicated in 3 individuals, will be utilized to detect novel targets of interest. Ideally co-labeling with these two antibodies will be performed to reduce the number of animals required to 3. An additional 5 animals are required to characterize basic morphology of the sensory structures (e.g., hair cells, synapses, supporting cells) of the inner ear using an already well characterized set of antibodies (for example, McLean et al., 2007, Braude et al 2015). Given an estimated failure rate of 2 animals (20%), these experiments will require 10 animals per experimental/control group. These calculations are the same for mouse, rat and gerbil.

For stream 2, we anticipate requiring approximately 72 animals (2 experimental groups*3 induction regimens—sham, induced hearing loss/tinnitus, age-related hearing loss/tinnitus*12 individuals) to examine the contribution of specific molecular mechanisms to susceptibility to induced and age-related hearing loss and tinnitus. Sham controls are important controls necessary to examine that hearing loss/tinnitus (especially in the experimental group) is not caused by incidental effects. Stream 2 will also require pilot experiments with approximately 10 control animals to determine ototoxic dosing regimens (which can vary between mouse lines and strains and species). Stream 2 will, therefore, require a total of $82*(10+5)$ or 1,230 mice, 82 gerbils and 82 rats.

As stated above, stream 2 will require an estimated 12 animals. The effect size of specific molecular mechanisms to the increased susceptibility to induced and age-related hearing loss and tinnitus is difficult to predict. However, in these experiments, susceptibility to hearing loss/tinnitus will be considered increased if auditory thresholds are increased minimally by 20 dB SPL in the experimental compared to control groups. This value is based on clinical assessments of hearing loss in patients in which ≥ 10 dB SPL shifts in threshold are considered indicative of hearing loss. Therefore, the number of animals required is predicted assuming an effect size of 20 dB SPL. The SD of ABR measurements is 15 dB SPL (Braude et al., 2015). Assuming a power of 80% and alpha of 0.05, then 9 animals are required. Assuming a failure rate of 20%, then an additional 3 animals are required. Thus, a total of 12 animals is required. These calculations are the same for mouse, rat and gerbil.

For stream 3, we anticipate requiring approximately 60 animals (15 control and 15 experimental animals for round window recordings and an additional 15 control and 15 experimental animals for endocochlear potential recordings). We anticipate that only half of the GM lines investigated will be characterized using these assessments. Stream 3 will, therefore, require a total of $60*(5+5)$ or 600 mice, 60 gerbils and 60 rats.

As stated above, stream 3 will require an estimated 15 animals. For these procedures, predicting the effect sizes of experimental manipulations on either the cochlear potentials (measured with round window recordings) or the endocochlear potential (measured with intracochlear EP measurements) is difficult. Therefore, the number of animals required is based on the number of animals required in previous similar experiments to observe statistically significant differences (Cheatam et al., 2004, 2011 and Potter et al., 2016). In these experiments, 12 animals were required. Assuming a failure rate of 20%, then an additional 3 animals are required. Thus, a total of 15 animals is required. These calculations are the same for mouse, rat and gerbil.

For stream 4, we anticipate requiring approximately 144 animals (2 experimental groups*3 induction regimens—sham, induced hearing loss/tinnitus, age-related hearing loss/tinnitus*12 individuals*2 treatment regimens—+/- drug) to examine protection from induced and age-related hearing loss and tinnitus. The inclusion of multiple controls (experimental/control animals, sham induction, +/- drug) is necessary to validate the specificity and safety of the drug. Stream 4 will also require pilot experiments

with approximately 10 control animals to determine dosing regimens. Based on our current discovery rates, we anticipate that approximately one-third of the GM lines and strains investigated will progress to stream 4. Stream 4 will, therefore, require a total of 154*(5) or 770 mice, 154 gerbils and 154 rats.

As stated above, stream 4 will require an estimated 12 animals. The actual effect size of individual drugs acting on discrete targets to treat inner ear disorders is difficult to predict. However, in these experiments, drugs will be considered “effective” if they minimally reduce the loss of auditory thresholds caused by experimental manipulation by 20 dB SPL. Therefore, the number of animals required is predicted assuming an effect size of 20 dB SPL. The SD of ABR measurements is 15 dB SPL (Braude et al., 2015). Assuming a power of 80% and alpha of 0.05, then 9 animals are required. Assuming a failure rate of 20%, then an additional 3 animals are required. Thus, a total of 12 animals are required. These calculations are the same for mouse, rat and gerbil.

Finally, we anticipate requiring an additional 75 mice, 75 gerbils and 75 rats over the next five years for training of procedural techniques (approximately 15 animals each for training to refine 1) inner ear isolation, 2) ABR/OAE measurements, 3) round window recordings, 4) endocochlear potential measurements, and 5) intratympanic drug administration). Differences in size and subtle differences in the inner ear anatomy and approach require training in each of these species.

For all streams, experiments will use male and female animals in equal numbers. Unless otherwise required, animals will be housed in groups in conventional cages with ad libitum food and water with provided cage enrichment.

Therefore, these procedures require a total of 3,875 mice, 451 gerbils, and 451 rats.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Every effort has been made to investigate replacement approaches. However, absolute or relative replacement of animals is impossible given the complexity of the whole organism research questions. The limitations of replacement strategies are summarized below.

- *In silico* investigation of inner ear function is not possible since such models require a complete and presently unavailable description of the anatomy and physiology of the inner ear and auditory system.
- The use of isolated animal or human tissues is not possible. In vitro cell culturing methods are currently limited to the use of organotypic cultures of acutely dissected inner ear sensory epithelia from juvenile animals. Therefore, cultured tissues do not replace the need for animals and, moreover, are not an experimentally acceptable alternative because of anatomical and physiological differences

from tissues that have matured *in vivo*. Moreover, the use of tissues does not allow investigation of *in vivo* function.

- Finally, the use of invertebrate animals (or less sentient vertebrates) is precluded because of key anatomical and physiological differences in the inner ear compared to invertebrates and even other non-mammalian vertebrates. These differences include sensory cell type and organization, patterns of innervation between the sensory cells and brain, and hearing range and sensitivity.

A variety of strategies are employed to reduce the number of animals used. These include:

- Careful animal model selection: Purpose-bred and (whenever possible) inbred animal lines are used to reduce biological variability in experimental measurements and, therefore, minimize the number of animals required to achieve statistical significance. Whenever possible, GM animals are maintained as knockouts to minimize animals required for breeding.
- Careful experimental design: Consultation with statisticians and animal welfare officers is done in advance to identify the best design and sample size. As much as possible, multiple experiments are done in the same animals; reducing the number of animal used and allowing paired statistical analyses.
- Re-use and shared data/tissues: Whenever possible animals are re-used for other experiments. Collections of data/tissues is coordinated among researchers to minimize the amount of animals required.
- Regular literature reviews: Systematic and regular literature reviews ensure that animal experiments are not unnecessarily duplicated.

A variety of strategies are employed to refine animal husbandry and/or experimental procedures to enhance the welfare of animals throughout their lifetime. These include:

- The responsible researcher has over 15 years of experience investigating the auditory system using animal (rodent) models and is familiar with the most refined experimental procedures.
- The research facility is able to properly house and care for the selected animals and ensure proper and regular welfare assessments.
- GM animals are maintained as heterozygote breeders if homozygote animals experience unacceptable morbidity, mortality or chronic disease
- Additional researchers are properly trained in experimental procedures. Proper handling is used to minimize animal stress. The appropriate anesthetics and analgesics (when required) are used to minimize pain and suffering. Animal welfare is carefully monitored following non-terminal procedures. Appropriate recovery time is provided between procedures.

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

To minimize the possible adverse effects on animal welfare, all researchers involved in this project are properly trained in the experimental procedures. Proper handling is used to minimize animal stress and fear. Ample time is given between recovery procedures involving anesthesia to provide allow animals sufficient time to recover and recuperate and thereby prevent weight loss. Animal welfare is carefully monitored during and after procedures. Pilot projects are performed to optimize dosing. These procedures pose no adverse effects on the environment.

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.

Systematic and regular literature reviews ensure that animal experiments are not unnecessarily duplicated.

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.

Methods to minimize suffering and improve welfare include the appropriate use of anesthetics, properly trained animal researchers, ample recovery time between procedures, regular animal monitoring and appropriate animal housing.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Recovery from procedures requiring anaesthesia may cause mild discomfort. Repeated procedures requiring anaesthesia may cause mild weight loss. Aging may result in age-related morbidities including weight loss, loss of the ability to ambulate properly, rectal prolapse and increased disease susceptibility. Ototoxic compounds and drugs can have unexpected adverse effects. All of these potential adverse effects can vary between GM mouse lines, mouse strains, and rodent species.

Explain why these effects may emerge.

Some procedures utilized are mildly invasive and may result in some post-procedural soreness. Recovery

from anaesthesia may result in temporarily diminished appetite. Aging can result in the various age-related morbidities described above.

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

To minimize the occurrence or severity of these adverse effects, ample recovery is provided between procedures and animals are regularly monitored during and between procedures. The animal facility already houses aging mice and is extremely adept at their caretaking. Pilot projects are performed to optimize dosing. Intratympanic drug delivery avoids side effects of systemic administration.

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.

Although these experiments are not expected to cause more than mild discomfort, observations of animals will be performed to monitor their wellbeing. Humane endpoints that might result from procedures and/or aging include weight loss (estimated to be 10% or more of body weight), open wounds that do not heal, labored respiration, and/or the loss of ability to ambulate.

Indicate the likely incidence.

Less than 10%.

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').

46% = Mild (stream 1 and 3 procedures); 54% = Moderate (stream 2 and 4 procedures)

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.

These se procedures ultimately require collection of inner ear tissues which is a terminal procedure.

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

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

Yes



Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|---|
| 2 | Vestibular dysfunction: molecular characterization, induction and assessment, and treatment |
- 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.

These animal procedures are designed to achieve objectives 1-3 and specifically 1) identify the molecules and mechanisms that contribute to susceptibility to induced and/or age-related loss of vestibular function and 2) test the efficacy of drugs to reduce, reverse and/or prevent induced and age-related loss of vestibular function. These procedures utilize genetically modified mice lines, different mouse strains, and three rodent species to identify the molecular bases of differences in the comparative susceptibility to hearing loss and tinnitus observed in these animal models. These procedures combine various assessments to relate *in vivo* and *in vitro* function and dysfunction of the inner ear in the same animals and, thereby, minimize the number of animals required.

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

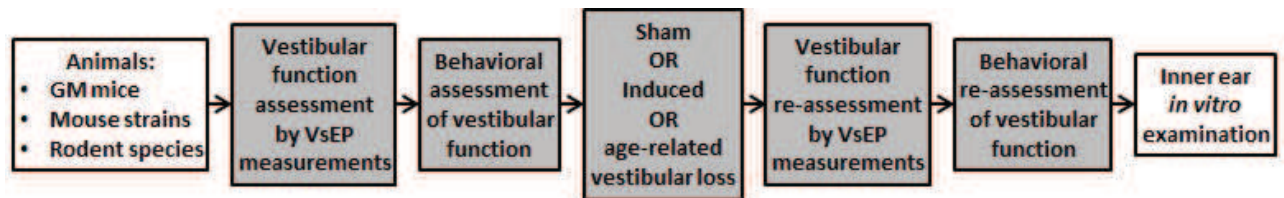
Procedures are separated into three streams of experiments that provide go/no go points for subsequent investigation.

Stream 1:



The first stream of experiments designed to achieve objective 1 (identify the molecular mechanisms that regulate the sensory and supporting structures in the inner ear). The inner ear is isolated for subsequent *in vitro* examination. This procedure takes less than 10 minutes is terminal, performed under anesthesia, and expected to cause minimum discomfort. In some cases, cardiac perfusion of tissue fixative will be performed before removal of the inner ear. The procedure then lasts about 30 minutes.

Stream 2:



The second stream of experiments is designed to achieve objective 2 (validate the involvement of these molecular mechanisms in function and dysfunction of the inner ear). In this stream, animals undergo quantitative assessment of vestibular function by measurement of vestibular evoked potentials (VsEPs) to measure baseline differences in vestibular function between control and experimental groups. These procedures require approximately 30 to 60 minutes, are minimally invasive, and are performed under anesthesia.

Following recovery, animals undergo behavioral assessments of vestibular function (balance and righting ability). These assessments are non-invasive and require approximately 20 minutes to complete.

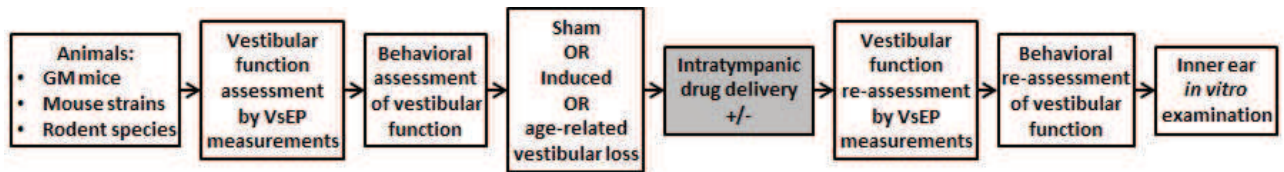
Animals then undergo either sham or ototoxic-exposure to induce vestibular dysfunction or are allowed to age (for a total of three treatment regimens/groups). Ototoxic compounds are delivered in the drinking water for a period of days to weeks. Animals are allowed to age between 6 months and up to two years.

Animals then undergo quantitative re-assessment of by VsEP measurements to measure differences in vestibular function (and susceptibility to vestibular dysfunction) between control and experimental groups. These procedures require approximately 30 to 60 minutes, are minimally invasive, and are performed under anesthesia.

Following recovery, animals , animals again undergo behavioral assessments of vestibular function (balance and righting ability). These assessments are non-invasive and require approximately 20 minutes to complete.

At the conclusion of these assessments, the inner ear is isolated for subsequent *in vitro* examination. This procedure takes less than 10 minutes is terminal, performed under anesthesia, and expected to cause minimum discomfort. In some cases, cardiac perfusion of tissue fixative will be performed before removal of the inner ear. The procedure then lasts about 30 minutes.

Stream 3:



The third stream of experiments is designed to achieve objective 3 (screen modulators of these molecular mechanisms to reduce, reverse and/or prevent inner ear disorders). This stream largely parallels procedures described in stream 2 with the exception that drugs modulating molecular mechanisms identified to contribute to the susceptibility to induced- and/or age-related vestibular dysfunction are applied intratympanically in anesthetized animals. Administration requires approximately 30 minutes and is minimally invasive. Some animals undergo sham delivery with the drug vehicle only. Subsequent assessments of vestibular function by VsEP measurements and behavioral assessments as well as *in vitro* examination will quantify and characterize protection from vestibular dysfunction by drug administration.

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

To minimize the number of animals, procedures are staged in three “streams” of investigation that provide go/no go points for subsequent investigation. (For example, if there is no phenotypic difference observed after stream 2, then stream 3 will not be performed.) Many aspects of vestibular function and dysfunction are examined in the same cohorts of animals. Power analyses (using effect sizes and standard deviations predicted from previous research) are used to refine the minimum number of animals required to achieve statistical significance for specific molecular mechanisms under investigation. To further minimize the number of animals required, pilot experiments are performed to determine dosing regimens and training in procedures is provided.

B. The animals

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

These experiments will utilize mice, rats and gerbils obtained from licensed vendors and our own breeding. Animals will be examined at various life stages, from birth—to assess the maturation of hearing and susceptibility to hearing loss—to old age (between 15–18 months for mice and rats and at approximately 32 months for gerbils)—to examine age-related hearing loss.

Mice, rats and gerbils are well-suited for this project because of their genetic and pharmacological tractability and also amenability to a variety of *in vitro* techniques and *in vivo* audiovestibulometric and behavioral assessments of inner ear function. Very importantly, these animals have well-established strain and species-specific differences in their susceptibility to inner ear disorders in response to genetic, environmental and age-related factors. These differences are exploited to identify the molecules (especially ion channels, ion transporters and synaptic proteins) and mechanisms contributing to the pathology of inner ear disorders.

Rodents (mice, rats, and gerbils) are, in general, ideal animal models for these experiments for many reasons:

- The anatomy and physiology of the auditory system is similar between rodents and humans.
- The auditory system of rodents (and especially rats, mice, and gerbil) has been studied for decades. As a result, there are a variety of established tools and techniques and refined procedures developed using these animals.
- Rodents are small, facilitating large scale/high throughput studies.
- Rodents provide an excellent *in vivo* disease model: many aspects of hearing disorders, including their

underlying causes (genetic environmental, and age-related), seen in humans are recapitulated in rodent models.

- Rodent models are a requisite part of testing before drugs can be tested in humans.

In these procedures we request rats and (Mongolian) gerbils in addition to mice because of specific experimental advantages afforded by these animals. Rats are larger in size than mice and therefore allow more sophisticated surgical manipulations (such as intratympanic injections) and also better assessment of postural and righting deficits caused by vestibular dysfunction. Furthermore, rats compared to mice have metabolic physiology more similar to humans and are, therefore, more suited for pharmacological and toxicological studies. Mongolian gerbils live longer than mice and are, like humans, susceptible to age-related hearing loss. Gerbils are, therefore, a potentially valuable (although still understudied) model of ageing of the vestibular periphery. Importantly, both rats and gerbils have been used previously to examine the peripheral vestibular system, providing an excellent comparative background. Finally, while genetic homogeneity is a key advantage of mouse models, it is also a distinct disadvantage because it does not recapitulate the genetic variation seen in humans. Thus, mice do not recapitulate the complex interactions of genetics and environmental factors that contribute to the variations in susceptibility to inner ear disorders seen in people. In this sense, a comparative approach is absolutely essential for any medically relevant research. Finally, even among rodents, differences in the organization of the peripheral vestibular sensory structures have been documented. A comparative approach will be essential to understand the physiological significance of these differences to normal and abnormal function of the vestibular periphery. Thus, the three species requested, mice, rats and gerbils, will be used to identify the essential molecules and molecular pathways underlying inner ear disorders utilizing a comparative approach, optimize procedures and experimental outcomes, and validate preclinical effectiveness of treatments for inner ear disorders.

The estimated number of animals required for these procedures is based on consideration of the number of genetically modified mouse lines, mouse strains, and species investigated as part of these streams, and the number of animals required for training to refine procedural techniques.

There are currently 5 genetically modified (GM) mouse lines available for characterization. These GM mouse lines show or are hypothesized to show differences in their susceptibility to induced and/or age-related vestibular dysfunction. (Examples of mouse lines under investigation and/or targeted for investigation include mice genetically engineered to lack genes encoding ion channels and transporters: for example, the potassium channels such as those encoded by the *kcnma1*, *kcnt1*, and *kcnt2* genes). Because this project exploits emerging research, an additional 2 GM mouse lines are anticipated for characterization each year. Thus, this proposal estimates characterizing a total of 10 GM mouse lines over the next five years.

There are currently, 5 mouse strains available for characterization. These mouse strains show differences in their susceptibility to vestibular dysfunction. Thus, this proposal estimates characterizing a total of 5 mouse strains over the next five years.

There are currently 2 additional species available for characterization—gerbils and rats—that show differences in their susceptibility to vestibular dysfunction compared to mice. Thus, this proposal estimates characterizing a total of 2 additional species over the next five years.

For stream 1, we anticipate requiring approximately 80 (40 control and 40 experimental) animals for in vitro assessment of the inner ear, which can include “omics” analysis of alterations in expression, electrophysiological characterization of molecular function, and immunofluorescent examination of sensory and supporting cell structure. Based on previous experiments we expect that we will need

approximately 40 animals total for each control and experimental group: 10 animals for “omics” analyses, 20 animals for electrophysiological recordings examining whole cell currents and/or synaptic transmission in the specific sensory and supporting structures of the inner ear, and 10 animals for immunofluorescent examination (localization of molecular targets and/or examination of morphological changes). Stream 1 will, therefore, require a total of $80 \times (10+5)$ or 1,200 mice, 80 gerbils and 80 rats.

As stated above, for “omics” analyses, an estimated 10 animals are required. For these procedures, the most sensitive techniques available are used. Current protocols optimized as part of this research (see Braude et al., 2015) require a minimum of 8 animals to obtain sufficient quantities of high quality RNA and biological replicates. Given an estimated failure rate of 2 animals (20%), then a total of 10 animals is required. These calculations are the same for mouse, rat and gerbil.

As stated above, for electrophysiological recordings an estimated 20 animals are required. Electrophysiological recordings can examine a number of processes in the inner ear, including 1) whole cell hair cell currents and 2) properties of synaptic transmission. Predicting the effect sizes of experimental manipulations on these two processes is difficult to predict. However, past research indicates that approximately 6 animals are required to observe statistically significant differences in hair cell currents (for example, [REDACTED] and approximately 6 animals are required to observe statistically significant differences in properties of synaptic transmission (for example, Ye et al., 2017). Due to the technical difficulty of these experiments, failure rate is typically 40%. Thus an extra 8 animals are required. In total, these experiments will require 20 animals. These calculations are the same for mouse, rat and gerbil.

As stated above, for immunofluorescence an estimated 10 animals are required. This number is based on the minimum number of animals required to follow best practices when using immunofluorescence to identify protein localization. Following methodology outlined in Rhodes and Trimmer (2006), two distinct antibodies (raised against distinct, non-overlapping epitopes on the same target protein), replicated in 3 individuals, will be utilized to detect novel targets of interest. Ideally co-labeling with these two antibodies will be performed to reduce the number of animals required to 3. An additional 5 animals are required to characterize basic morphology of the sensory structures (e.g., hair cells, synapses, supporting cells) of the inner ear using an already well characterized set of antibodies (for example, McLean et al., 2007, Braude et al 2015). Given an estimated failure rate of 2 animals (20%), these experiments will require 10 animals per experimental/control group. These calculations are the same for mouse, rat and gerbil.

For stream 2, we anticipate requiring approximately 72 animals (2 experimental groups*3 induction regimens—sham, induced vestibular dysfunction, age-related vestibular dysfunction *12 individuals) to examine the contribution of specific molecular mechanisms to susceptibility to induced and age-related vestibular dysfunction. Sham controls are important controls necessary to examine that vestibular dysfunction (especially in the experimental group) is not caused by incidental effects. Stream 2 will also require pilot experiments with approximately 10 control animals to determine ototoxic dosing regimens (which can vary between mouse lines and strains and species). Stream 2 will, therefore, require a total of $82 \times (10+5)$ or 1,230 mice, 82 gerbils and 82 rats.

As stated above, stream 2 will require an estimated 12 animals. The effect size of specific molecular mechanisms to the increased susceptibility to vestibular dysfunction is difficult to predict. Moreover, measurements of vestibular evoked potentials (VsEPs) show large variability (means and SDs) across mouse strains (Jones and Jones, 2014). Therefore, a survey of the literature examining the number of animals required to detect statistically significant differences in strain, genetic, and age-related differences in vestibular function was performed and indicated that an average of 9 animals is required. (Search terms "vestibular evoked potentials" AND “mouse” were used to identify relevant literature). Assuming a failure

rate of 20%, then an additional 3 animals are required. Thus, a total of 12 animals are required. These calculations are the same for mouse, rat and gerbil.

For stream 3, we anticipate requiring approximately 144 animals (2 experimental groups*3 induction regimens—sham, induced vestibular dysfunction, age-related vestibular dysfunction *12 individuals*2 treatment regimens—+/- drug) to examine protection from induced and age-related vestibular dysfunction. The inclusion of multiple controls (experimental/control animals, sham induction, +/- drug) is necessary to validate the specificity and safety of the drug. Stream 3 will also require pilot experiments with approximately 10 control animals to determine dosing regimens. Based on our current discovery rates, we anticipate that approximately one-third of the GM lines and strains investigated will progress to stream 3. Stream 3 will, therefore, require a total of 154*(5) or 770 mice, 154 gerbils and 154 rats.

As stated above, stream 3 will require an estimated 12 animals. The actual effect size of individual drugs acting on discrete targets to treat inner ear disorders is difficult to predict. As described for stream 2, a survey of the literature examining the number of animals required to detect statistically significant differences in strain, genetic, and age-related differences in vestibular function was performed and indicated that an average of 9 animals is required. Assuming a failure rate of 20%, then an additional 3 animals are required. Thus, a total of 12 animals are required. These calculations are the same for mouse, rat and gerbil.

Finally, we anticipate requiring an additional 45 mice, 45 gerbils and 45 rats over the next five years for training of procedural techniques (approximately 15 animals each for training to refine 1) inner ear isolation, 2) VsEP measurements, and 3) intratympanic drug administration). Differences in size and subtle differences in the inner ear anatomy and approach require training in each of these species.

For all streams, both male and female animals will be used. Unless otherwise required, animals will be housed in groups in conventional cages with ad libitum food and water with provided cage enrichment.

Therefore, these procedures require a total of 3,245 mice, 361 gerbils, and 361 rats.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Every effort has been made to investigate replacement approaches. However, absolute or relative replacement of animals is impossible given the complexity of the whole organism research questions. The limitations of replacement strategies are summarized below.

- *In silico* investigation of inner ear function is not possible since such models require a complete and

presently unavailable description of the anatomy and physiology of the inner ear and auditory system.

- The use of isolated animal or human tissues is not possible. In vitro cell culturing methods are currently limited to the use of organotypic cultures of acutely dissected inner ear sensory epithelia from juvenile animals. Therefore, cultured tissues do not replace the need for animals and, moreover, are not an experimentally acceptable alternative because of anatomical and physiological differences from tissues that have matured *in vivo*. Moreover, the use of tissues does not allow investigation of *in vivo* function.
- Finally, the use of invertebrate animals (or less sentient vertebrates) is precluded because of key anatomical and physiological differences in the inner ear compared to invertebrates and even other non-mammalian vertebrates. These differences include sensory cell type and organization, patterns of innervation between the sensory cells and brain, and hearing range and sensitivity.

A variety of strategies are employed to reduce the number of animals used. These include:

- Careful animal model selection: Purpose-bred and (whenever possible) inbred animal lines are used to reduce biological variability in experimental measurements and, therefore, minimize the number of animals required to achieve statistical significance. Whenever possible, GM animals are maintained as knockouts to minimize animals required for breeding.
- Careful experimental design: Consultation with statisticians and animal welfare officers is done in advance to identify the best design and sample size. As much as possible, multiple experiments are done in the same animals; reducing the number of animal used and allowing paired statistical analyses.
- Re-use and shared data/tissues: Whenever possible animals are re-used for other experiments. Collections of data/tissues is coordinated among researchers to minimize the amount of animals required.
- Regular literature reviews: Systematic and regular literature reviews ensure that animal experiments are not unnecessarily duplicated.

A variety of strategies are employed to refine animal husbandry and/or experimental procedures to enhance the welfare of animals throughout their lifetime. These include:

- The responsible researcher has over 15 years of experience investigating the auditory system using animal (rodent) models and is familiar with the most refined experimental procedures.
- The research facility is able to properly house and care for the selected animals and ensure proper and regular welfare assessments.
- GM animals are maintained as heterozygote breeders if homozygote animals experience unacceptable morbidity, mortality or chronic disease
- Additional researchers are properly trained in experimental procedures. Proper handling is used to minimize animal stress. The appropriate anesthetics and analgesics (when required) are used to minimize pain and suffering. Animal welfare is carefully monitored following non-terminal procedures. Appropriate recovery time is provided between procedures.

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

To minimize the possible adverse effects on animal welfare, all researchers involved in this project are properly trained in the experimental procedures. Proper handling is used to minimize animal stress and fear. Ample time is given between recovery procedures involving anesthesia to provide allow animals sufficient time to recover and recuperate and thereby prevent weight loss. Animal welfare is carefully monitored during and after procedures. These procedures pose no adverse effects on the environment.

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.

Systematic and regular literature reviews ensure that animal experiments are not unnecessarily duplicated.

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.

Methods to minimize suffering and improve welfare include the appropriate use of anesthetics, properly trained animal researchers, ample recovery time between procedures, regular animal monitoring and appropriate animal housing.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Recovery from procedures requiring anaesthesia may cause mild discomfort. Repeated procedures requiring anaesthesia may cause mild weight loss. Aging may result in age-related morbidities including weight loss, loss of the ability to ambulate properly, rectal prolapse, and increased disease susceptibility. Ototoxic compounds and drugs can have unexpected adverse effects. All of these potential adverse effects

can vary between GM mouse lines, mouse strains, and rodent species.

Explain why these effects may emerge.

Some procedures utilized are mildly invasive and may result in some post-procedural soreness. Recovery from anaesthesia may result in temporarily diminished appetite. Aging can result in the various age-related morbidities described above.

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

To minimize the occurrence or severity of these adverse effects, ample recovery is provided between procedures and animals are regularly monitored during and between procedures. The animal facility already houses aging mice and is extremely adept at their caretaking. Pilot projects are performed to optimize dosing. Intratympanic drug delivery avoids side effects of systemic administration.

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.

Although these experiments are not expected to cause more than mild discomfort, observations of animals will be performed to monitor their wellbeing. Humane endpoints that might result from procedures and/or aging include weight loss (estimated to be 10% or more of body weight), open wounds that do not heal, labored respiration, and/or the loss of ability to ambulate.

Indicate the likely incidence.

Less than 10%.

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').

35% = Mild (stream 1 procedures); 65% = Moderate (stream2 procedures)

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.

These se procedures ultimately require collection of inner ear tissues which is a terminal procedure.

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

Rijksuniversiteit Groningen

A. Deusinglaan 1

9713 AV GRONINGEN



**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
AVD1050020171324

Bijlagen

2

Datum 7 april 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED],

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 6 april 2017. Het gaat om uw project "The development of inner ear disease and treatment models". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1050020171324. 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:

7 april 2017

Aanvraagnummer:

AVD1050020171324

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
7 april 2017
Aanvraagnummer:
AVD1050020171324

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10500
Naam instelling of organisatie: Rijksuniversiteit Groningen
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 1179037
Straat en huisnummer: A. Deusinglaan 1
Postcode en plaats: 9713 AV GRONINGEN
IBAN: NL45ABNA0474567206
Tenaamstelling van het rekeningnummer: Rijksuniversiteit Groningen

Gegevens 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

Datum:

7 april 2017

Aanvraagnummer:

18050020171324

Over uw project

Geplande startdatum: 1 april 2017
Geplande einddatum: 31 maart 2022
Titel project: The development of inner ear disease and treatment models
Titel niet-technische samenvatting: De ontwikkeling van modellen van binnenoor ziekte en behandeling
Naam DEC: DEC-RUG
Postadres DEC: A. Deusinglaan 1, [REDACTED]
E-mailadres DEC: secrdec.umcg@umcg.nl

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1.287,-
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: Groningen
Datum: 6 april 2017



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

[REDACTED]
A. Deusinglaan 1
9713 AV GRONINGEN
[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
AVD1050020171324

Bijlagen

2

Datum 7 april 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 7 april 2017
Vervaldatum: 7 mei 2017
Factuurnummer: 171324

| Omschrijving | Bedrag |
|---|------------|
| Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD1050020171324 | € 1.287,00 |

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.

Format DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: Interne RUG code **8086**
2. Titel van het project: **The development of inner ear disease and treatment models**
3. Titel van de NTS: **De ontwikkeling van modellen van binnenoor ziekte en behandeling**
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: **07-02-2017**
 - aanvraag compleet: **07-02-2017**
 - in vergadering besproken: **16-02-2017**
 - anderszins behandeld: **15-03-2017, 03-04-2017**
 - termijnonderbreking(en) van / tot: **20-02-2017 tot 10-03-2017, 15-03-2017 tot 28-03-2017**
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen **n.v.t.**
 - aanpassing aanvraag: **10-03-2017, 28-03-2017**
 - advies aan CCD: **06-04-2017**
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.
8. Eventueel horen van aanvrager **n.v.t.**
 - Datum
 - Plaats
 - Aantal aanwezige DEC-leden
 - Aanwezige (namens) aanvrager
 - Gestelde vraag / vragen
 - Verstrek(e) antwoord(en)
 - Het horen van de aanvrager heeft wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag
9. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum: **20-02-2017, 15-03-2017**
 - Gestelde vraag/vragen:
 - 1/ Het project oogt overspannen voor zijn claims en zet een toon die niet juist is. Dit zinnetje mag bijvoorbeeld weg: "These limited treatment options are in stark contrast to other complex diseases (such as cardiovascular diseases, diabetes, and depression), which are aggressively treated with an arsenal of drugs." Ook dit statement doet wat onrecht aan het geheel en maakt het wat te gemakkelijk: "Treatments for inner ear disorders have not improved substantially since the introduction of modern hearing aids over fifty years ago. Unfortunately, hearing aids are often fraught with compliance issues¹ and, like cochlear implants, do not restore normal hearing and do not prevent further hearing loss." Er wordt gesproken over arbeidspotentieel wat verloren gaat en wat dit onderzoek gaat oplossen, maar dit vindt de DEC wat overspannen aan doen.

Bijvoorbeeld, het dragen van gehoorbescherming bij arbeid met een hoge geluidsbelasting zal veel meer bijdragen dan wat dan ook (is nu verplicht, dus op termijn zal er een verandering komen als geluidsbelasting een groot probleem is).

- 2/ De terminologie moet helder zijn: vertigo is iets anders dan duizeligheid (dizziness) begrijpt de DEC. Met vertigo wordt draaiduizeligheid bedoeld wat met het evenwichtsorgaan te maken heeft. In de NTS moet dat helder zijn; ook in het project moet dit helder zijn.
- 3/ Binnenoorproblemen leiden tot gehoorproblemen en draaiduizeligheid, maar niet alle gevallen van gehoorproblemen en (draai)duizeligheid zijn het gevolg van binnenoorproblemen, zoals hier geschetst. Het lijkt hier als containerbegrippen te worden gebruikt. Bijvoorbeeld vertigo kan ook als gevolg van infecties ontstaan, wat behandelbaar is (begrijpt de DEC). Verder, de ziekte van Meniere die gepaard gaat met oorsuizen, draaiduizeligheid en doofheid ontstaat als gevolg van een toename van endolymfe in het vestibulocochleaire apparaat (endolymfatische hydrops) wat weer meer oorzaken kan hebben. Kortom, wat is nu de bijdrage van dit project aan het geheel van problemen. Wat kunnen we op dit moment niet, wat we straks wel kunnen? Er wordt wel verwezen naar behandelingen op dit moment, maar niet aangegeven hoe we die nu moeten plaatsen (effectiviteit; er zijn verschillende behandelingen op dit moment inclusief intratympanic injecties; graag een gewogen verhaal). De DEC denkt dat hier nog een keer goed naar moet worden gekeken: wat is nu de 'state of art' en de 'niche' van dit project? En hoe realistisch zijn de claims? Tot slot, een plaatje van het binnenoor met een idee van verstoringen, targets etc. zou kunnen helpen.
- 4/ Het project geeft wel aan wat de lijn van experimenten is, maar niet hoe die eruit gaan zien. Nu hoeft dat niet in detail, maar iets zou wel prettig zijn (referentie zou handig zijn); nu is het niet in te schatten wat ze betekenen.
- 5/ Het project heeft het over genetica, omgeving en leeftijd, maar de DEC ziet niet in waar de interacties zitten. Wordt er gekeken naar interacties: gen-geluidsbelasting-veroudering? Maakt het uit in wat voor omgeving je opgroeit voor de problemen later? Het lijkt de DEC dat dit belangrijk kan zijn. Of gaat het primair alleen om middelen te vinden?
- 6/ Er wordt aangegeven dat er al wat resultaat is met een ion-kanaal: wat betekent dit nu? Is dit nu een levensvatbare lead of niet? Ook hier geldt dat het niet duidelijk is wat nu de 'state of art' is. Er wordt namelijk al wel het een en ander gedaan
- 7/ De relatie met andere ziektebeelden wordt aangehaald, maar hoe is dit nu te duiden? Is dit oorzakelijk of is dit 'en-en' als gevolg van leefwijze? Of is het zo, dat mensen die doof worden, depressief worden als gevolg van een verstoorde relatie met de omgeving en minder sociaal contact? Dit wordt niet duidelijk. Of is het zo, dat mensen duizelig worden, of evenwichtsproblemen hebben als gevolg van stoornissen in de motoriek, wat niet hetzelfde is als vertigo?
- 8/ Het is de DEC niet duidelijk waarom er ratten (stammen?) en gerbils (stammen?) worden gebruikt naast muizen. Wat is de toegevoegde waarde? Er wordt wel iets gezegd over andere gevoeligheden maar hoe, wat en waar? Iets meer duidelijkheid mag hier gevraagd worden. Wat hopen de onderzoekers te vinden met deze soorten wat ze niet vinden in muizen?
- 9/ De dieren worden doof gemaakt. Maar wat is het effect daarvan op het welzijn van dieren? Immers muizen, ratten en gerbils communiceren met ultrasonische geluiden. Wat voor geluidsbelasting wordt er gebruikt? Wat is het ongerief daarvan? Er staat te weinig om te kunnen beoordelen
- 10/ Het is de DEC niet duidelijk hoe tinnitus gemeten wordt bij de dieren.
- 11/ Hoe worden dieren gehuisvest?
- 12/ Welk geslacht wordt gebruikt? alleen mannetjes/vrouwetjes, beide? Bij gebruik van 1 geslacht zou dit goed onderbouwd moeten worden.
- 13/ De aantallen dieren (per groep) zijn niet duidelijk. Dit zou goed onderbouwd moeten worden.
- 14/ Er worden lijnen gebruikt, maar een idee van welke is wel zo prettig.
- 15/ Is de toedieningsmethode van de stoffen ook degene die straks bij mensen standaard wordt beoogd? Dit vraagt nogal wat. Wat is het ongerief voor de dieren?
- 16/ In de NTS staat licht ongerief, in de dierproefbeschrijvingen: 'mild to moderate'. Dit strookt niet met elkaar. Waarom zijn de percentages van ongerief anders voor de beide beschrijvingen? Is het doof maken van dieren alleen 'moderate'? Bij de behandelingen staan alleen risico's genoemd, maar een beetje meer toelichting en inschatting zou prettig zijn.
- 17/ De NTS is net als het project te veel van het mooie: een realistische kijk graag.

Vervolgvragen

1/ Naar oordeel van de DEC zijn de aantallen onvoldoende gemotiveerd. Als uit eerder onderzoek bekend is welke aantallen dieren nodig is voor welke experimenten dan zou de DEC daar graag een onderbouwing van willen zien (verwijzing naar literatuur minimaal, maar het liefst een relevant rekenvoorbeeld). Als het aannemelijk is dat de aanvrager uitval krijgt tijdens de verouderingsstudie dan moet daar rekening mee worden gehouden in de sample size berekening. Of dat het geval is, is voor de DEC lastig in te schatten. De DEC vermoedt dat dit wel het geval kan zijn. Het is aan de onderzoeker te bepalen of dat in dit experiment ook het geval zal zijn. De DEC vraagt daarom een betere onderbouwing van de aantallen en eventuele uitval bij de verouderingsstudie.

2/ Bij proposal, onder wetenschappelijk belang, staat beschreven:

- *provides molecular insight into other complex diseases that involve neuronal dysfunction and loss as an underlying mechanism. These diseases include stroke, brain injury and spinal cord injury, and various neurodegenerative diseases like multiple sclerosis, Alzheimer's, Parkinson's and Huntington's.*
- *develops resources and expertise available to the scientific community.*
- *provides state-of-the-art, interdisciplinary training to the next generation of researchers.'*

Deze opmerkingen zijn niet juist/overspannen (de eerste) of overbodig/niet relevant/niet uitgewerkt (de laatste twee).

3/ Bij beide appendices wordt genoemd: "*For all streams, both male and female animals will be used. Sexes will be carefully noted and any sex-based differences will be investigated further as warranted.*" Worden dieren dan netjes verdeeld volgens half-half per groep? En is dat genoeg om eventuele verschillen op te pakken als die er zijn; worden er verschillen verwacht?

4/ Bij beide appendices (bij gehoor) staat: "*Ototoxic induction typically requires minimally invasive i.p. injections once daily over 1 to 3 days.; bij evenwicht: Ototoxic compounds are delivered in the drinking water for a period of days to weeks.*" Is dit verschil gerelateerd aan de mate van beschadiging die wordt beoogd? Hoe invasief is het laatste?

5/ Er wordt bij het gehoor deel netjes beargumenteerd waarom ratten en gerbils nodig zijn. Bij het evenwicht staat nagenoeg dezelfde tekst (verwijzend naar gehoor). Is het zo dat voor het evenwicht hetzelfde geldt als voor gehoor? De toegevoegde waarde is daar niet helder.

6/ Stream 1 is voor beide experimenten gelijk: kan dit niet in dezelfde dieren?

7/ In de NTS moeten de percentages van ongerief staan die in de appendices worden genoemd.

8/ NTS: 'Waarnemingsgehoorverlies' --> 'waarnemingsgehoorverlies'

9/ In de NTS staat bij vermindering:

- *Nauwkeurig ontwerp van de experimenten. Een statisticus draagt zorg voor een correcte statistische benadering en een nauwkeurige berekening van de steekproefgrootte. Daarnaast worden dieren zoveel mogelijk voor meerdere experimenten gebruikt.*

- *Hergebruik van data en weefsels. Waar mogelijk wordt gebruik gemaakt van restweefsels van andere onderzoekers.'*

Eerste punt: waar komen we dat tegen in de appendices? Tweede punt: waar concreet?

- Datum antwoord: **10-03-2017, 28-03-2017**

- Verstrekt(e) antwoord(en):

- 1/ I appreciate the helpful feedback and revisions have been made to the Project Proposal and also NTS in order to address the concerns raised. Specifically:
 - Statements that might be perceived as overstated are removed.
 - The state of the field and the current trajectory of research in the field is better articulated.
 - The particular niche filled by my research as part of this trajectory is more clearly explained.
 - The current roadblocks and the proposal's strategy to overcoming these roadblocks is more clearly defined.
 - The specific and achievable goals of this research are more carefully distinguished from the long term objectives of this research for science and societyThe Project Proposal (3.1 Background) has been largely rewritten.
- 2/ Duizeligheid (dizziness) changed to draaiduizeligheid (vertigo) in all instances: NTS 1.3, 3.1 and 3.2
- 3/ In the revised version of the Project Proposal (Section 3.1 Background), I have better outlined the current state of treatments available for various inner ear disorders.
- 4/ In the Project Proposal (3.4.1 Research strategy), the outcome of each aim with specific examples is provided. The following text has now been added: "This research is expected to characterize:
 - The molecular identities and subcellular localizations of ion channels (and other synaptic proteins) in the inner ear sensorineural structures using a combination of *in vitro* approaches (e.g. molecular biology, electrophysiology, and immunofluorescence) (①).
 - The biophysical properties of these ion channels (and other synaptic proteins) and the molecular pathways by which these ion channels regulate the structure and function of the inner ear sensorineural structures using a combination of *in vitro* approaches (①).
 - The contributions of these ion channels (and other synaptic proteins) to normal inner ear function and also inner ear disorders using a combination of *in vitro* and *in vivo* approaches (e.g. audiometry, behavioral assessments, and pharmacology) (②).
 - Whether modulation of these ion channels or their relevant molecular pathways prevents, slows, or reverses inner ear disorders using a combination of *in vitro* and *in vivo* approaches (③)."
- 5/ Sources of damage to the inner ear include genetic, age-related and environmental factors that likely lead to pathophysiology of the auditory and vestibular synapses via common molecular pathways. This proposal does not *per se* examine the interaction of these factors but rather uses various sources of damage to validate the involvement of molecules and molecular pathways (and, thus, potential drug targets) in the pathophysiology of particular inner ear disorders. These sources of damage are chosen because they are ecologically relevant, "dosable," and well characterized experimentally. To clarify, the following text has been added to the Project Proposal (Section 3.4.2, Objective 2): "These *in vivo* assessments are often performed before and after damage to the inner ear induced by genetic, age-related or environmental factors. This proposal does not *per se* examine the interaction of these factors but rather uses particular sources of damage to validate the involvement of molecules and molecular pathways (and, thus, potential drug targets) in the pathophysiology of particular inner ear disorders. These sources of damage are chosen because they are ecologically relevant, "dosable," and well characterized experimentally."
- 6/ In addition to revisions made to the Project Proposal (3.1 Background), revisions have also been made to clarify the value of the current findings and also better relate these findings to the current state of the field.
- 7/ Excellent question! The connection between hearing loss and wellbeing and hearing loss and other diseases has only very recently been identified and only slowly becoming appreciated. It is not known whether a common underlying cause increases susceptibility to inner ear disorders and other diseases in parallel or whether loss of inner ear function, in fact, reduces wellbeing in a way that increases susceptibility to a variety of other disorders. In fact, a combination of both mechanisms may be involved. Understanding the relationship between inner ear disorders and other diseases is an active and very interdisciplinary area of research that will identify strategies to improve healthy aging. By identifying the molecular basis of inner ear disorders and identifying novel molecular strategies to treat these disorders, this research contributes to both understanding the (molecular) link between inner ear disorders and other diseases as well as contributing to improving healthy aging. To clarify this connection, the text in the Project Proposal (3.3. Relevance) was revised.
- 8/ To better justify the comparative approach utilized in this proposal, the following text has been added to Appendix 1 and 2 (Section B: The animals): "In these procedures we request rats and (Mongolian) gerbils in addition to mice because of ----- and validate preclinical effectiveness of treatments for inner ear disorders."
- 9/ In these procedures the minimum noise exposure required to elicit hearing loss is administered. The sound levels and frequencies are carefully calibrated (usually at a level of 90-120 dB SPL and frequency between 8-16 kHz). In the field, these experiments are generally performed in awake animals. After noise exposure, mice show normal behavior, including grooming, eating, sleeping and interactions with other co-housed animals. In fact, a recent study found that vocalization features are similar in hearing and deafened animals and conclude that mice do not need auditory experience during development to

produce normal ultrasonic vocalizations in adulthood, including vocalizations required for courtship (Mahrt EJ et al. 2013. *J Neurosci.* 33: 5573–5583). This finding is consistent with decades of research showing that many mouse lines/strains as well as other animal models that are congenitally deaf or acquire deafness later in life show no changes in overall well-being or reproductive fitness. Together these findings indicate that noise exposure and hearing loss do not per se reduce animal well-being. Thus, we expect that in these experiments loss of hearing will cause no to minimal (light) discomfort/suffering. The methodology and also suffering expected by hearing loss is explained further by changes to Appendix 1 (Section A. Experimental approach and primary outcome parameters).

- 10/ The following text (in Appendix 1, Section A. Experimental approach and primary outcome parameters) has been revised to clarify how the perception of tinnitus is detected in these procedures.
- 11/ As described in Appendix 1 and 2 (Section F: Accommodation and care), animals will be housed in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU. To provide more details, the following text has been added to Appendix 1 and 2 (Section B: The animals): “Unless otherwise required, animals will be housed in groups in conventional cages with ad libitum food and water with provided cage enrichment.”
- 12/ The following text has been added to Appendix 1 and 2 (Section B: The animals) to clarify the use of male and female animals in these procedures: “For all streams, both male and female animals will be used. Sexes will be carefully noted and any sex-based differences will be investigated further as warranted.”
- 13/ The text in Appendix 1 and 2 (Section B: The animals) has been revised to better justify the number of animals requested where it was not previously clear.
- 14/ As the revised research strategy indicates, this proposal emphasizes discovery of ion channels and transporters as drug targets. Examples of mouse lines under investigation and/or targeted for investigation include mice genetically engineered to lack genes encoding ion channels and transporters (for example the potassium channels such as those encoded by the *kcnma1*, *kcnt1*, and *kcnt2* genes). This information was added to the text (Appendix 1 and 2, Section 2B).
- 15/ The intratympanic method of administration used in the animal procedures is the same as used clinically in patients, validating its clinical relevance. In patients, this procedure is performed as an outpatient procedure while patients are awake and in some cases without local anesthesia. Thus, in patients there is a very low level of discomfort. In animals intratympanic injection is done under anesthesia to minimize animal movement. In both patient and animal models, side effects are minimal and infrequent. Because of the light discomfort in patients, the additional use of anesthesia in animals, and the documented recovery and lack of side effects in both patients and animals, we expect the discomfort of intratympanic injections to be light. Additional text is now included (Project Proposal, Research Strategy 3.4, Objective 3) to clarify that the intratympanic method of administration used in the animal procedures is the same as used clinically in patients and that intratympanic injections cause only mild discomfort with minimal side effects.
- 16/ “Licht ongerief” in the NTS (3.5) should read “licht tot matig” and match across descriptions. This has been corrected. A better explanation of the possible negative effects on animal welfare has been added to the NTS (3.4).
- 17/ The NTS has been completely revised to provide a more realistic outlook. The previous version is also attached for reference.
- **Antwoorden vervolgvragen**
- 1/ First, regarding procedures with aged animals, we will follow the age guidelines established by Mock et al. (2016) when considering the age of mice for auditory and vestibular research: “young (3–6 months), mid (10–12 months), old (15–18 months), and very-old (22–24 months) age groups.” Following these guidelines, the examination of age-related hearing and balance loss in this research will be performed in “old” mice (15–18 months). The mean life-span of mice (C57BL) is approximately 800 days in males and 750 days in females according to Rowlatt *et al.* (1976). Therefore, we expect negligible loss of mice from aging in these experiments. Rats have a similar mean life-span as mice (Sass et al., 1975) and thus “old” rats will be examined between 15–18 months of age. Therefore, we expect negligible loss of rats from aging in these experiments. Gerbils have a longer mean life-span (typically up to 4 years in captivity) and are routinely examined beginning at 32 months of age for examination of age-related changes in inner ear function (see review by Fetoni et al., 2011). Thus, “old” gerbils will be examined at approximately 32 months of age. We expect negligible loss of gerbils from aging in these experiments. To clarify, the text previously read: “approximately two years”. The text now reads “between 15–18 months for mice and rats and at approximately 32 months for gerbils).
Second, the motivation for the number of animals required for experiments has been better detailed with references and example calculations.
- 2/ These last three points have been removed from the project proposal.
- 3/ Indeed the experimental design is improved by examining equal numbers of males and females in each set of experiments. The text in the appendices has been modified. The text previously read: “For all streams, both male and female animals will be used. Sexes will be carefully noted and any sex-based differences will be investigated further as warranted.” The text now reads: “For all streams, experiments will use male and female animals in equal numbers.”
To date my laboratory has not observed sex-based differences in results using experiments similar to those proposed in this project. Furthermore, the literature in general either fails to report the sex of animals used in studies or restricts experiments to males. Therefore, it is impossible to predict the effect size of sex on these experiments and, therefore, what n would be required to identify sex-based differences in the proposed experiments. Nevertheless, previous experiments in my laboratory would suggest that the effect sizes of sex are smaller than the effect sizes of other experimental alterations.
- 4/ The route of administration (i.e., i.p. or oral) depends on the pharmacology of the ototoxic compound being delivered. For example, salicylate is the most commonly used ototoxic agent to cause hearing loss and tinnitus. Delivery i.p. causes highly consistent and “dosable” induction of hearing loss (Stolzberg et al., 2012). Discomfort due to injections is minimized by administering drugs in vehicles that are non-irritating and at physiological temperature. Nitriles, are a commonly used ototoxic agent to cause vestibular dysfunction and is administered orally in drinking water for maximum efficiency (Sedó-Cabezón et al., 2014). No discomfort is expected from the administration *per se*.
- 5/ Modifications of the text have been made to clarify that a comparative approach is equally valuable to the examination of the vestibular system.

- 6/ The small size of the inner ear and (consequently) almost overlapping position of the auditory and vestibular structures means that, in most dissections, isolation of the auditory structures damages the vestibular structures and vice versa. Therefore, it is (unfortunately) not feasible to perform these experiments in the same animals.
 - 7/ Text in the NTS now reads: "Licht (ongeveer 40%) tot matig (ongeveer 60%)."
 - 8/ Corrected.
 - 9/ The first point has been revised. The text previously read: "Nauwkeurig ontwerp van de experimenten. Een statisticus draagt zorg voor een correcte statistische benadering en een nauwkeurige berekening van de steekproefgrootte. Daarnaast worden dieren zoveel mogelijk voor meerdere experimenten gebruikt." The text now reads: "Nauwkeurig ontwerp van de experimenten. Waar mogelijk worden statistische analyses (power analyses) gebruikt om een nauwkeurige berekening van de steekproefgrootte in te schatten. Daarnaast worden dieren zoveel mogelijk voor meerdere experimenten gebruikt." The second point has been removed.
- **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)? 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.

JA

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 hoofddoelstelling alsmede concrete subdoelstellingen en kan getypeerd worden als een project. Het is helder welke handelingen en ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft helder criteria beschreven op basis waarvan zal worden besloten het project wel of niet te continueren. 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. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

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 Wet Natuurbescherming).

Voor zover de DEC de mogelijke tegenstrijdigheid kan beoordelen is er geen aanleiding om deze strijdigheid met andere relevante wettelijke bepalingen aanwezig te achten. De DEC wil wel stellen dat deze signaleringsfunctie niet tot de wettelijke taken van de DEC behoort. Mochten de DEC-RuG signalen bereiken aangaande mogelijke tegenstrijdigheid met wettelijke bepalingen dan zal zij onverwijld de vergunninghouder daarvan op de hoogte stellen.

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 doelcategorieën sluiten 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 om een hypothese-gedreven en snelle high-throughput preklinische assay te ontwikkelen voor het identificeren, prioriteren en screenen van drug targets voor preventie en behandeling van ziektebeelden als gevolg van stoornissen aan het binnenoor. Het uiteindelijke doel is om effectieve en betrouwbare farmacologische behandelingen mogelijk te maken voor ziektebeelden als gevolg van stoornissen aan het binnenoor. Het project betreft fundamenteel onderzoek m.b.t. het directe doel en translationeel onderzoek m.b.t. het uiteindelijke doel; het uiteindelijke doel zal binnen de looptijd van het project waarschijnlijk niet gehaald worden. De aanvrager heeft duidelijk gemaakt wat dit project kan bijdragen aan het onderzoeksveld en 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 fundamentele/translationele project zijn de proefdieren, en op langere termijn mensen met ziektebeelden als gevolg van stoornissen aan het binnenoor.

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 mensen bevorderd kunnen worden: een beter begrip en een betere behandeling van ziektebeelden als gevolg van stoornissen aan

het binnenoor. Hierdoor kan de kwaliteit van leven verbeterd worden van patiënten en van hun naasten.

6. Is er aanleiding voor de DEC om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken?

Voor zover de DEC de beschreven effecten op het milieu kan beoordelen is er geen aanleiding om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu te betrekken. De DEC wil wel stellen dat deze signaleringsfunctie niet tot de wettelijke taken van de DEC behoort. Mochten de DEC-RUG signalen bereiken aangaande mogelijke effecten op het milieu dan zal zij onverwijld de vergunninghouder daarvan op de hoogte stellen.

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*). **NVT**
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 huisvesting en verzorging volgens de richtlijn gebeuren. Dit op basis van de daartoe strekkende verklaring van zowel de vertegenwoordiger van de vergunninghouder als de aanvrager onder respectievelijk punt 6 van de ondertekening van de aanvraag en punt F van de bijlage.

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*).

Dit lijkt realistisch ingeschat. 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 het dier is/wordt aangetast door genetische modificatie (gebruik van genetisch gemodificeerde muizen) en het toedienen van stoffen. Aan het einde van de proef zullen de dieren opgeofferd worden.

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 zorgvuldig beschreven en is de inschatting van het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken eveneens zorgvuldig aangegeven in de projectaanvraag

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. Het bestuderen van de effecten van binnenooraandoeningen kan op dit moment niet in vitro worden gedaan.

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. Bijvoorbeeld, het gebruik van heterozygote muizen wanneer het ongerief voor homozygote dieren te groot is, en verder verdoving/pijnbestrijding alsmede voldoende hersteltijd daar waar dat op zijn plaats is.

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.

Het betreft geen wettelijk vereist onderzoek. 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 de onderhavige projectaanvraag worden mannelijke en vrouwelijke dieren gebruikt. De onderzoekers hebben goed aangegeven wat hun ervaringen (tot nu toe) met beide geslachten zijn. 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: dieren worden gedood voor analyses van het binnenoer.

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.

NVT

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

Rechtvaardigen de doelstellingen van het project **"The development of inner ear disease and treatment models"** dat gericht is op fundamenteel en translationeel onderzoek naar het behandelen van ziektebeelden gerelateerd aan binnenoorstoornissen het lichte-matige ongerief, dat de muizen, ratten en gerbils wordt aangedaan in het onderhavige project?

Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: **licht-matig nadeel.**

Waarden die voor de doelgroep bevorderd worden: **potentieel groot voordeel.**

Algemeen: **vergroting van biomedische wetenschappelijke kennis met betrekking tot het binnenoor.**

De DEC-RUG is van mening dat de belangen van de wetenschap in het algemeen en op termijn de samenleving binnen het project **"The development of inner ear disease and treatment models"** zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de proefdieren. Voor de betrokken proefdieren leiden deze proeven, na licht-matig ongerief, tot de dood. Zij worden door de experimenten in hun welzijn geschaad. Ten gevolge van de proeven zullen de dieren stress ondervinden. De integriteit van de dieren zal worden aangetast door onder meer genetische modificatie en het toedienen van stoffen. Deze kunnen repercussies hebben op het natuurlijke gedrag.

Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit project leiden tot een relevante uitbreiding van biomedisch-wetenschappelijke kennis over het binnenoor en mogelijke behandelingen voor stoornissen van het binnenoor. Voor patiënten lijdend aan ziektebeelden als gevolg van binnenoorstoornissen is verbetering van hun welzijn en mogelijk uitzicht op nieuwere vormen van therapie van belang. Vandaar dat de DEC-RUG het onderhavige onderzoek, zowel vanuit wetenschappelijk als vanuit maatschappelijk oogpunt van substantieel belang acht. Het is aannemelijk dat de doelstellingen behaald zullen worden. De onderzoekers zullen zoveel mogelijk trachten het welzijn van de dieren te bevorderen, waardoor het werkelijke ongerief van de dieren beperkt blijft in relatie tot het te behalen voordeel.

Daarom beantwoordt de DEC-RUG de centrale morele vraag: Rechtvaardigt de doelstelling van het project **"The development of inner ear disease and treatment models"** dat gericht is op fundamenteel en translationeel onderzoek naar binnenoorstoornissen en behandeling ervan het licht-matige ongerief dat de muizen, ratten en gerbils wordt aangedaan in het voorliggende project bevestigend.

Hoewel de DEC-RUG de intrinsieke waarde van het dier onderschrijft en oog heeft voor het te ondergaan 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 onnodige duplicatie.

In de gekozen strategie wordt op bevredigende wijze tegemoet gekomen 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 "**The development of inner ear disease and treatment models**" 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 kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt in de DEC. Indien gebaseerd op een meerderheidsstandpunt, specificieer 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.



Van: Info-zbo
Verzonden: vrijdag 14 april 2017 17:07
Aan: [Redacted]
CC: [Redacted]
Onderwerp: aanvullende informatie aanvraag AVD1050020171324

Geachte [Redacted],

Op 6 april 2017 hebben we uw projectaanvraag ontvangen met titel 'The development of inner ear disease and treatment models' en nummer AVD1050020171324. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden.

U schrijft in de bijlages dierproeven onder punt B. The animals 'Unless otherwise required, animals will be housed in groups'. Het is voor ons niet duidelijk onder welke omstandigheden dit zou gebeuren. Zou u kunnen aangegeven in welke situatie individuele huisvesting nodig zal zijn, waarom, hoe vaak wordt dit verwacht en hoe wordt het welzijn van de dieren geborgd?

In uw Niet-technische samenvatting is niet beschreven wat er met de dieren gebeurt, wat voor handelingen ze ondergaan. Graag dit ook in grote lijnen benoemen. Woorden als 'ototoxisch' niet bekend zijn voor het brede publiek. Graag uitleggen of vervangen.

Daarnaast staat onder punt 3.6 in de NTS dat enkele dieren niet worden gedood, maar dat ze voor hergebruik worden gehouden. Dit is niet terug te vinden in de aanvraag zelf. Daarin staat dat alle dieren worden gedood. Graag dit punt verhelderen en in de aanvraag aanpassen.

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. Om uw aanvraag in de eerstvolgende vergadering van de CCD te kunnen bespreken ontvangen we graag uw reactie **uiterlijk donderdag 20 april 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

Geachte [REDACTED],

Graag zou ik u willen bedanken voor uw feedback betreffende de projectaanvraag met de titel 'The development of inner ear disease and treatment models' en nummer AVD1050020171324. Hieronder vindt u de wijzigingen naar aanleiding van uw opmerkingen. Mocht u nog verdere vragen hebben dan hoor ik die graag.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

Groningen, The Netherlands

U schrijft in de bijlages dierproeven onder punt B. The animals 'Unless otherwise required, animals will be housed in groups'. Het is voor ons niet duidelijk onder welke omstandigheden dit zou gebeuren. Zou u kunnen aangegeven in welke situatie individuele huisvesting nodig zal zijn, waarom, en hoe wordt het welzijn van de dieren geborgd?

Het is niet wenselijk om de dieren (muis, rat of gerbil) langdurig geïsoleerd te laten. Het isoleren van dieren gebeurt daarom ook altijd in overleg met de diervverzorgers. Hoewel er niet verwacht wordt dat de dieren niet in groepen gehuisvest kunnen worden kan dit incidenteel voorkomen als dit nodig is voor het welzijn van de dieren. Ter verduidelijking werd de tekst aangepast. De tekst leest nu: "Animals will be housed in groups in conventional cages with ad libitum food and water with provided cage enrichment. Although not expected, individual housing may be necessary (for example, in cases of aggression or illness) and will be limited to the minimum period necessary."

In uw Niet-technische samenvatting is niet beschreven wat er met de dieren gebeurt, wat voor handelingen ze ondergaan. Graag dit ook in grote lijnen benoemen.

Ter verduidelijking van wat er met de dieren is gebeurd, is nu de volgende tekst toegevoegd aan sectie 3.1 NTS:

"Deze samenhangende testen bestaan uit:

1. Niet-terminale testen van het functioneren van het binnenoor onder narcose.
2. Niet-terminale inductie van binnenoorschade door geluid of toediening van medicijnen.
3. Gedragstesten voor binnenooraandoeningen.
4. Terminale testen van het functioneren van het binnenoor onder narcose.
5. Terminale verzameling van binnenoor weefsels onder narcose."

Woorden als 'ototoxisch' niet bekend zijn voor het brede publiek. Graag uitleggen of vervangen.

De tekst is nu aangepast ter verduidelijking. De tekst was: "Ototoxische stoffen en drugs kunnen onverwachte nadelige effecten hebben." De tekst leest nu: "Stoffen en drugs die schadelijk voor het binnenoor zijn (ototoxisch), kunnen onverwachte nadelige effecten hebben."

Daarnaast staat onder punt 3.6 in de NTS dat enkele dieren niet worden gedood, maar dat ze voor hergebruik worden gehouden. Dit is niet terug te vinden in de aanvraag zelf. Daarin staat dat alle dieren worden gedood. Graag dit punt verhelderen en in de aanvraag aanpassen.

De tekst is nu verwijderd. De tekst was: "Afhankelijk van de experimenten kunnen de dieren blijven leven voor hergebruik of worden de dieren geëuthanaseerd voor weefselonderzoek". De tekst leest nu: "Na de experimenten worden de dieren geëuthanaseerd voor weefselonderzoek."



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

████████████████████
A. Deusinglaan 1 ██████████
9713 AV GRONINGEN
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

**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
AVD1050020171324
Bijlagen
1

Datum 25 april 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte ██████████,

Op 6 april 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "The development of inner ear disease and treatment models" met aanvraagnummer AVD1050020171324. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 20 april 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. De vraag van de CCD over de huisvesting is beantwoord en de aanvraag is 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 10a1, lid 2, zijn er algemene voorwaarden gesteld.

U kunt met uw project "The development of inner ear disease and treatment models" starten. De vergunning wordt afgegeven van 25 april 2017 tot en met 31 maart 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 6 april 2017. 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:
25 april 2017
Aanvraagnummer:
AVD1050020171324

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:



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: Rijksuniversiteit Groningen

Adres: A. Deusinglaan 1

Postcode en plaats: 9713 AV GRONINGEN

Deelnemersnummer: 10500

deze projectvergunning voor het tijdvak 25 april 2017 tot en met 31 maart 2022, voor het project "The development of inner ear disease and treatment models" met aanvraagnummer AVD1050020171324, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-RUG. 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 6 april 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 20 april 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 20 april 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 6 april 2017, ontvangen op 6 april 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 20 april 2017

Aanvraagnummer:
 AVD1050020171324

| Naam proef | Diersoort/ Stam | Aantal dieren | Ernst | Opmerkingen |
|---|--|---------------|------------------------------|-------------|
| 3.4.4.1 Hearing loss and tinnitus: molecular characterization, induction and assessment, and treatment | | | | |
| | Muizen (<i>Mus musculus</i>) / transgene lijnen | 3.875 | 54% Matig 46% Licht | |
| | Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) / | 451 | 54% Matig 46% Licht | |
| | Mongoolse gerbils (<i>Meriones unguiculatus</i>) / | 451 | 54% Matig 46% Licht | |
| 3.4.4.2 Vestibular dysfunction: molecular characterization, induction and assessment, and treatment | | | | |
| | Muizen (<i>Mus musculus</i>) / transgene lijnen | 3.245 | 65% Matig 35% Licht | |
| | Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) / | 361 | 65% Matig 35% Licht | |

Aanvraagnummer:
AVD1050020171324

| | | | | |
|--|---|-----|------------------------------|--|
| | Mongoolse gerbils (Meriones unguiculatus) / | 361 | 65% Matig 35% 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 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:
AVD1050020171324

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:
AVD1050020171324

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.