



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag



Centrale Commissie Dierproeven

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


T 0900 2800028 (10 ct/min)
wob-ccd@rvo.nl

Onze referentie
W17-12

Uw referentie
juli2017

Briefkenmerk
CCD-2018-110

Datum **24 MEI 2018**
Betreft Wob-besluit W17-12

Geachte mevrouw 

In uw e-mail van 11 augustus 2017 heeft u met een beroep op de Wet openbaarheid van bestuur (hierna: Wob) bij de Centrale Commissie Dierproeven (hierna: CCD) om informatie verzocht met betrekking tot de projectvergunningen die de CCD in de maand juli 2017 heeft afgegeven (uw kenmerk: juli2017).

Dit verzoek is door de CCD behandeld onder het kenmerk W17-12. In deze brief vindt u een overzicht van de gevolgde procedure en het besluit op het verzoek. In de overwegingen vindt u een toelichting op de inhoudelijke afwegingen over de openbaarmaking.

1. Besluit

De CCD besluit om de door u gevraagde informatie gedeeltelijk te openbaren. De algemene overwegingen die de CCD maakt over weigeringsgronden die zijn ingeroepen door derde belanghebbenden staan onder de 'Overwegingen' in dit besluit. Onder 'Beoordeling per vergunning' leest u de specifieke overwegingen per vergunning.

2. Procedure

- De ontvangst van uw verzoek (met ons kenmerk W17-12) is op 14 augustus 2017 per brief (verzonden per e-mail) aan u bevestigd;
- Met de brief van 4 september 2017 (op deze datum per e-mail aan u verzonden) heeft de CCD u laten weten dat de beslistermijn met vier weken is opgeschort – gerekend vanaf 4 september 2017 – vanwege het vragen van zienswijzen aan derde belanghebbenden;
- Vervolgens is met de brief van 2 oktober 2017 (per e-mail aan u verzonden) aangegeven dat de beslistermijn met vier weken is verdaagd;
- Met de brief van 30 oktober 2017 (verzonden per e-mail) heeft de CCD u nader geïnformeerd over de voortgang van uw verzoek. In de brief is vermeld dat drie derde belanghebbenden om uitstel hebben verzocht;
- De CCD heeft de derde belanghebbenden een nadere termijn verleend tot 10 november 2017;

- De laatste zienswijze is op 6 november 2017 ontvangen. Hierdoor is de uiterste beslistermijn verschoven naar 4 december 2017.

3. Wettelijk kader

Uw verzoek valt (deels) onder de reikwijdte van de Wob.

4. Inventarisatie documenten

Onder uw verzoek vallen 34 projectvergunningen. Het betreft de vergunningen met de nummers van de Niet Technische Samenvatting (hierna: NTS):

- | | | | |
|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 1. NTS2016705 | 11. NTS20171646 | 21. NTS20172104 | 31. NTS20172364 |
| 2. NTS2017812 | 12. NTS20171668 | 22. NTS20172144 | 32. NTS20172465 |
| 3. NTS2017849 | 13. NTS20171924 | 23. NTS20172205 | 33. NTS20172485 |
| 4. NTS2017858 | 14. NTS20171926 | 24. NTS20172207 | 34. NTS20172506 |
| 5. NTS2017887 | 15. NTS20171944 | 25. NTS20172225 | |
| 6. NTS2017893 | 16. NTS20171964 | 26. NTS20172226 | |
| 7. NTS20171067 | 17. NTS20171984 | 27. NTS20172245 | |
| 8. NTS20171505 | 18. NTS20172004 | 28. NTS20172265 | |
| 9. NTS20171544 | 19. NTS20172044 | 29. NTS20172284 | |
| 10. NTS20171630 | 20. NTS20172064 | 30. NTS20172349 | |

Per vergunning is een afzonderlijke inventarislijst opgesteld. Deze lijst bevat een tabel met een genummerde opsomming van alle aanwezige documenten.

5. Zienswijzen

Bij de openbaarmaking van de documenten zijn derde belanghebbenden betrokken, te weten de betreffende vergunninghouders en dierexperimentencommissies (hierna: DEC's). Zij zijn in de gelegenheid gesteld om over de eventuele openbaarmaking van de documenten een zienswijze te geven. De ingediende zienswijzen zijn betrokken bij de beoordeling van het verzoek tot openbaarmaking.

6. Reeds openbare documenten

Van iedere verleende vergunning wordt een NTS op de website van de CCD (www.centralecommissiedierproeven.nl) gepubliceerd. Deze informatie is daarmee reeds openbaar. Per projectvergunning staat per inventarislijst aangegeven welk document de NTS betreft.

7. Overwegingen

Op grond van artikel 3, vijfde lid, van de Wob wordt een verzoek om informatie ingewilligd met inachtneming van hetgeen is bepaald in de artikelen 10 en 11 van de Wob. Hierna licht de CCD eerst in algemene zin toe welke kaders de Wob geeft voor openbaarmaking. Vervolgens wordt per weigeringsgrond, ingeroepen door derde belanghebbenden bij dit Wob-verzoek en/of bij eerdere Wob-verzoeken, ingegaan op de algemene overwegingen die de CCD maakt en wat dit betekent voor het al dan niet openbaar maken van (delen van) de betreffende vergunningen.

Het recht op openbaarmaking op grond van de Wob dient uitsluitend het publieke belang van een goede en democratische bestuursvoering. Het komt iedere burger in gelijke mate toe. Daarom kan ten aanzien van de openbaarheid geen



onderscheid worden gemaakt naar gelang de persoon of de bedoeling of belangen van de verzoeker. De te verrichten belangenafweging betreft dan ook het algemene belang van openbaarmaking van de gevraagde informatie en de door de weigeringsgronden te beschermen belangen, maar niet het specifieke belang van de verzoeker.

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

7.1. Misbruik van recht

Belanghebbenden stellen dat het Wob-verzoek buiten behandeling moet worden gelaten, omdat er sprake zou zijn van misbruik van recht. Betoogd wordt dat het er bij de Wob-verzoeker vooral om gaat om vergunninghouders te identificeren en zoveel mogelijk van hun activiteiten te achterhalen. Gezien de grote hoeveelheid vergunningen die reeds geopenbaard is, valt immers niet in te zien dat de Wob-verzoeker er redelijkerwijs belang bij heeft om van nog meer vergunningen en documenten openbaar te maken.

De redenen die tot op heden zijn aangedragen ter onderbouwing van het argument dat er misbruik zou zijn van recht vinden wij te algemeen. De CCD is dan ook van oordeel dat het indienen van veel Wob-verzoeken op dit moment en onder de huidige omstandigheden onvoldoende reden is om de Wob-verzoeker misbruik van recht te verwijten. Het Wob-verzoek wordt om deze reden inhoudelijk behandeld.

7.2. Wob vs Wod en Europese regelgeving

Belanghebbenden verzoeken om de openbaarmaking van alle documenten geheel te weigeren. Hierbij wordt verwezen naar artikel 43 van de Europese richtlijn 2010/63/EU (hierna: richtlijn) om aan te geven dat openbaarmaking van meer informatie dan de NTS-en in conflict is met deze richtlijn. Tevens wordt verwezen naar artikel 39 van het Europees verdrag inzake de handelsaspecten van intellectueel eigendom (TRIPs), naar artikel 8 van het Europees Verdrag voor de Rechten van de Mens (EVRM), artikel 7 van het Handvest voor de Grondrechten van de EU (Handvest) en naar artikel 4, derde lid, van het Verdrag betreffende de Europese Unie (VEU).

Richtlijn

Er wordt gesteld dat op grond van de richtlijn slechts de NTS openbaar gemaakt mag worden. Op grond van artikel 4, derde lid, van de Dierproevenregeling 2014 dient de aanvrager ervoor te zorgen dat de NTS anoniem is en geen namen en adressen van de gebruiker en zijn personeel bevat. De richtlijn schrijft voor welke gegevens de NTS bevat en welke niet (artikel 43, eerste lid, van de richtlijn). Deze bepaling is vrijwel letterlijk geïmplementeerd in de Wet op de dierproeven (hierna: Wod) en het Dierproevenbesluit.

Uit de parlementaire geschiedenis van de Wod¹ volgt dat de Wod *geen* bijzondere openbaarmakingsregeling is. Dit is bevestigd in de uitspraak van de rechtbank Gelderland van 21 april 2016 (kenmerk: AWB 15/6463), zie ook ECLI:NL:RVS:2017:680). Uit de uitspraak van de rechtbank Utrecht van 3 december 2009 (ECLI:NL:RBUTR:2009:BK8206) volgt onder meer dat indien de wetgever uitdrukkelijk voor ogen heeft gestaan de Wob niet van toepassing te verklaren op de Wod dit dient te blijken uit de Memorie van Toelichting of uit de totstandkomingsgeschiedenis van de Wod. Uit de Memorie van Toelichting van de Wod en uit de totstandkomingsgeschiedenis van de Wod blijkt echter in het geheel niet dat de Wob buiten beschouwing gelaten dient te worden. Dit betekent dat de Wob volledig van toepassing op de behandeling van het voorliggende Wob-verzoek.

TRIPs

Er wordt betoogd dat artikel 39 van het TRIPs-verdrag directe werking heeft ofwel voorgaat op de Wob. Hierover wil de CCD het volgende aangeven.

Nederland is verdragspartij bij het TRIPs-verdrag en dit verdrag is door de EU goedgekeurd. Het TRIPs-verdrag voorziet expliciet in de bescherming van bedrijfsgeheimen en andere niet openbaar gemaakte informatie. Artikel 39, derde lid, van het TRIPs-verdrag schrijft voor dat leden de gegevens tegen oneerlijke concurrentie beschermen. Het TRIPs-verdrag maakt onderdeel uit van het Wereldhandelsverdrag. Het Hof van Justitie heeft vanaf 1999 consequent bepaald dat het Wereldhandelsverdrag geen rechtstreekse werking heeft². Dit betekent dat de lidstaten het verdrag dienen te implementeren op basis van Europese of nationale regelingen en dat een rechtstreeks beroep op het TRIPs-verdrag niet kan slagen.

De bescherming van bedrijfsgeheimen is gewaarborgd in artikel 10, eerste lid, onderdeel c, van de Wob. Hiermee is de beoordeling conform de Wob niet in strijd met artikel 39, derde lid, van het TRIPs-verdrag. De vraag of de gegevens wel of niet mogen worden verstrekt, kan dus worden beantwoord na afweging van het bepaalde in de artikelen 10 en 11 van de Wob (en niet artikel 39 van het TRIPs-verdrag).

EVRM

Artikel 8 van het EVRM en artikel 7 van het Handvest gaan over de bescherming van persoonsgegevens. De bescherming van de persoonlijke levenssfeer wordt gewaarborgd door artikel 10, tweede lid, onderdeel e, van de Wob. Hiermee is de beoordeling conform de Wob niet in strijd met artikel 8 van het EVRM.

¹ Tweede Kamer vergaderjaar 2013-2014, 33692, 24, blz. 4, 13 en 20, Eerste Kamer vergaderjaar 2013-2014, 33 692, D, blz. 8 Tweede Kamer vergaderjaar 2012-2013, 33 692, nr. 3, blz. 12, 14 en 17, Tweede Kamer vergaderjaar 1986-1987, 19859, nr. 2, blz. 19 en 23

² HvJ EG 23 november 1999, C-149/96, Portugal/Raad, overweging 47; HvJ 14 april 2011, gevoegde zaken C-288/09 en C-289/09, ECLI:EU:C:2011:248, r.o. 83 (ITA), ECLI:EU:C:2012:745, r.o. 39 (ITA).



In het hierna volgende zal dan ook nader ingegaan worden op de afweging om openbaarmaking van (delen) van documenten al dan niet te weigeren op grond van artikel 10 en 11 van de Wob.

7.3. Bedrijfs- en fabricagegegevens

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

Volgens vaste jurisprudentie dient artikel 10, eerste lid, aanhef en onder c, van de Wob naar zijn aard restrictief te worden uitgelegd. Om te kunnen spreken van bedrijfs- en fabricagegegevens dient inzichtelijk te zijn dat de informatie in de betreffende onderdelen van de documenten, afzonderlijk en in onderlinge samenhang beschouwd, zijn aan te merken als concurrentiegevoelige bedrijfsinformatie, waarvan openbaarmaking leidt tot wetenswaardigheden met betrekking tot de technische bedrijfsvoering of het productieproces, dan wel met betrekking tot de afzet van de producten of de kring van afnemers en leveranciers. Ook gegevens die uitsluitend de financiële bedrijfsvoering betreffen, kunnen onder omstandigheden als bedrijfsgegevens worden aangemerkt. Daarbij zal de actualiteit van de gegevens moeten worden betrokken. De CCD verwijst in dit kader naar de uitspraak van de Afdeling van 23 december 2015 (ECLI:NL:RVS:2015:3976). In deze uitspraak zijn de namen van leveranciers aangemerkt als bedrijfsgegevens. Details over de onderzoeksopzet kunnen eveneens worden aangemerkt als bedrijfsgegevens. De CCD verwijst in dit kader naar de uitspraak van de rechtbank Noord-Nederland van 16 oktober 2015 (ECLI:NL:RBNNE:2015:4811).

Het slechts verwijzen naar het gegeven dat de informatie vertrouwelijk aan de overheid zou zijn verstrekt is onvoldoende voor een beroep op deze weigeringsgrond. Het slechts vermelden dat openbaarmaking van informatie een inzicht zou geven in de bedrijfsvoering van het bedrijf is evenmin voldoende om te oordelen dat het om vertrouwelijke bedrijfs- en fabricagegegevens gaat. Voor het bovenstaande wordt verwezen naar de uitspraak van de Afdeling bestuursrechtspraak van de Raad van State (hierna: de Afdeling) van 23 december 2015 (ECLI:NL:RVS:2015:3976) en de uitspraak van 17 juli 2013 (ECLI:NL:RVS:2013:288). Een voorbeeld van een uitspraak waarin informatie terecht is aangemerkt als bedrijfs- en fabricagegegevens is de uitspraak van de rechtbank Noord-Nederland van 16 oktober 2015 (ECLI:NL:RBNNE:2015:4811). Het betrof hier de beoogde onderzoeksopzet.

Instellingsgegevens

Er wordt betoogd dat algemene instellingsgegevens, zoals de naam van de instelling, het deelnemernummer bij de NVWA, het KvK-nummer en het IBAN-rekeningnummer, onder de bedrijfsgegevens vallen waarvan openbaarmaking op grond van artikel 10, eerste lid, aanhef en onder c, van de Wob geweigerd zou moeten worden.

De CCD is van oordeel dat met betrekking tot deze instellingsgegevens van vergunninghouders en DEC's niet gesproken kan worden van bedrijfsgegevens. Hierbij verwijst de CCD naar de uitspraak van de rechtbank Gelderland 12 juni

2014 (ECLI:NL:RBGEL:2014:3654). In deze uitspraak geeft de rechtbank aan dat het deelnemernummer of de naam dan wel aanduiding van een organisatorische werkeenheid van vergunninghouder niet valt aan te merken als bedrijfs- of fabricagegegevens. Openbaarmaking van algemene instellingsgegevens wordt niet op deze weigeringsgrond geweigerd.

7.4. Persoonsgegevens

Conform artikel 10, eerste lid, aanhef en onder d, van de Wob blijft het verstrekken van informatie achterwege voor zover het persoonsgegevens betreft als bedoeld in paragraaf 2 van hoofdstuk 2 van de Wet bescherming persoonsgegevens, tenzij de verstrekking kennelijk geen inbreuk op de persoonlijke levenssfeer maakt.

Diverse belanghebbenden verwijzen in hun zienswijze naar deze weigeringsgrond. Deze weigeringsgrond is niet van toepassing op dit Wob-verzoek. Hoofdstuk 2 van de Wet bescherming persoonsgegevens heeft namelijk betrekking op persoonsgegevens over iemands godsdienst of levensovertuiging, ras, politieke gezindheid, gezondheid, seksuele leven, iemands lidmaatschap van een vakvereniging of strafrechtelijke persoonsgegevens. In de stukken waarop dit Wob-verzoek betrekking heeft is er geen sprake van dergelijke gegevens.

7.5. Economische of financiële belangen

Op grond van artikel 10, tweede lid, aanhef en onder b, van de Wob blijft verstrekking van informatie achterwege voor zover het belang daarvan niet opweegt tegen de economische of financiële belangen van de Staat, de andere publiekrechtelijke lichamen of de in artikel 1a, eerste lid, onderdelen c en d, van de Wob bedoelde bestuursorganen.

Een belanghebbende verwijst in haar zienswijze naar deze weigeringsgrond. Om te bepalen of een belanghebbende deze grond kan invoeren moet worden gezien of zij als onderdeel van de Staat kan worden gezien. Daarvoor dient zij te zijn ingesteld bij wet, en een publiekrechtelijke rechtsvorm hebben.

Uit onder andere de uitspraak van de Afdeling van 3 december 2014 (ECLI:NL:RVS:2014:4354) volgt dat, om een succesvol beroep op deze uitzonderingsgrond te doen, het dient te gaan om informatie waaruit de onderhandelingsstrategie en/of de onderhandelingspositie volgt, als gevolg waarvan de economische of financiële belangen worden geschaad jegens derden.

7.6. Inspectie, controle en toezicht

Conform artikel 10, tweede lid, aanhef en onder d, van de Wob blijft het verstrekken van informatie achterwege voor zover het belang daarvan niet opweegt tegen het belang van inspectie, controle en toezicht door bestuursorganen.

Een belanghebbende verwijst in haar zienswijze naar deze weigeringsgrond. Gesteld wordt dat ten behoeve van een goed werkende inspectie, controle en toezicht, het van belang is dat er vertrouwen is dat de gegevens die worden verschaft vertrouwelijk worden behandeld. Daarbij verwijst zij naar de uitspraak van de rechtbank Amsterdam van 12 juni 2014 (ECLI:NL:RBAMS:2014:3303).



Deze weigeringsgrond is niet van toepassing op dit Wob-verzoek. De opgevraagde documenten hebben immers slechts betrekking op de verlening van vergunningen. Om deze reden is er geen sprake van inspectie, controle en toezicht zoals opgenomen in artikel 10, tweede lid, onderdeel d, van de Wob.

7.7. Eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer

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

Voor alle vergunningen waarop dit Wob-verzoek betrekking heeft, wordt de openbaarmaking geweigerd van de gegevens die direct te herleiden zijn naar personen:

- namen van natuurlijke personen, zoals onderzoekers en contactpersonen,
- directe telefoonnummers en directe e-mailadressen,
- de functies van natuurlijke personen, zoals onderzoekers en contactpersonen, tenzij het een algemene functiebenaming betreft die niet naar een persoon herleidbaar is,
- handtekeningen en eventueel faxadressen en rekeningnummers indien deze direct herleidbaar zijn tot personen,
- literatuurverwijzingen naar de eigen onderzoeksgroep,
- kamernummers en namen van afdelingen, met name als de afdelingen zo klein zijn dat betrokkenen eenvoudig te herleiden zijn in combinatie met de naam van de vergunninghouder.

Deze gegevens staan vermeld in de aanvraagformulieren, de ontvangen en verzonden brieven, ontvangen en verzonden e-mails en de vergunningen en beschikkingen. De aard van bovenstaande geweigerde gegevens is direct af te leiden uit de opbouw en de context van de documenten.

De CCD is van oordeel dat ten aanzien van deze gegevens, voor alle vergunningen het belang dat de persoonlijke levenssfeer wordt geëerbiedigd zwaarder moet wegen dan het belang van openbaarheid. Daarbij is van belang dat met het openbaar maken van persoonsnamen en tot personen herleidbare gegevens, deze gegevens voor een ieder openbaar zijn en ook openbaar blijven. De CCD licht dit als volgt toe. Uit de Memorie van Toelichting bij de Wob (Kamerstukken II 2012/13, 33 692, nr. 3) volgt dat de belangen van de bescherming van de gegevens die herleidbaar zijn naar personen in afweging tot openbaar maken van deze gegevens zwaar moet wegen. Betrokkenen moeten vrijelijk en anoniem hun werk kunnen doen. Daarbij speelt een rol dat personen die betrokken zijn bij het verrichten van dierproeven een maatschappelijke taak uitoefenen en het risico lopen slachtoffer te worden van dierenrechtenactivisme.

In dit kader zoekt de CCD ook aansluiting bij een uitspraak van de Afdeling van 31 januari 2018 (ECLI:NL:RVS:2018:321). Hieruit volgt dat het belang van eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer zich verzet tegen openbaarmaking van namen van medewerkers die niet wegens hun functie in de openbaarheid treden, tenzij de indiener van het Wob-verzoek aannemelijk heeft gemaakt dat het belang van de openbaarheid in een concreet geval zwaarder weegt.

Uit de uitspraak van de Afdeling van 12 juni 2013 (ECLI:NL:RVS:CA2883) volgt dat ambtenaren met een publieke functie en de in de openbaarheid tredende ambtenaren die besluiten krachtens mandaat hebben ondertekend in beginsel wel

moeten aanvaarden dat hun namen met de ondertekening van de besluiten naar buiten komen. De naam van de secretaris van de CCD wordt dan ook openbaar gemaakt.

Dreiging dierenrechtenactivisme

De Nationaal Coördinator Terrorismebestrijding en Veiligheid (NCTV) publiceert vier maal per jaar een trendrapportage *Dreigingsbeeld Terrorisme Nederland (hierna: DTN)*, waarin de voornaamste dreigingsontwikkelingen op hoofdlijnen worden geschetst. Deze rapportage is gebaseerd op informatie van de inlichtingen- en veiligheidsdiensten en van de politie, open bronneninformatie, informatie van buitenlandse partners en analyses van ambassadepersoneel en geeft daarmee een waarheidsgetrouw beeld van de dreigingsontwikkelingen in Nederland.

Wanneer men de publicaties van het DTN van de afgelopen tien jaren bekijkt, is te zien dat er een golfbeweging is met betrekking tot de mate van acties van dierenrechtenactivisten, waarbij niet valt uit te sluiten dat het dierenrechtenactivisme weer opkomt. Dit is afhankelijk van allerlei factoren, die zich vooraf niet laten voorspellen. Hierdoor is niet in te schatten welke vergunning een dreiging van dierenrechtenactivisme met zich meebrengt. Het gegeven dat in het recente DTN (nummer 46) geen dreigingsbeeld van dierenrechtenactivisten is opgenomen, betekent niet dat (de vrees voor) bedreigingen en intimidatie van het dierenrechtenextremisme niet meer actueel is. Het dreigingsbeeld toont immers de afgelopen tien jaren een afwisselend beeld met een hoger en minder hoog dreigingsbeeld. Acties van dierenrechtenactivisme hebben een langjarig karakter met wisselende 'targets' en volgens een onvoorspelbaar patroon, waarbij dezelfde sleutelfiguren een doorlopende betrokkenheid tonen.

Dat er nog steeds een actuele en reële dreiging van radicaal dierenrechtenactivisme uitgaat, blijkt ook uit de recente uitspraken van de Afdeling van 15 maart 2017 (ECLI:NL:RVS:2017:680), 5 april 2017 (ECLI:NL:RVS:2017:952), 7 juni 2017 (ECLI:NL:RVS:2017:1498), 14 februari 2018 (ECLI:NL:RVS:2018:492), 18 april 2018 (ECLI:NL:RVS:2018:1282) en de uitspraak van de rechtbank Den Haag van 20 februari 2018 (ECLI:NL:RBDHA:2018:1766).

Mede gezien deze dreiging voor dierenrechtenactivisme is de CCD met betrekking tot gegevens die direct te herleiden zijn naar personen van oordeel dat de bescherming van de persoonlijke levenssfeer zwaarder weegt dan het belang van de openbaarmaking.

7.8. Het voorkomen van onevenredige bevoordeling of benadeling

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

Herleidbaarheid

Belanghebbenden hebben verzocht om weigering van een deel van de documenten aangezien hierin informatie is opgenomen die op zeer eenvoudige



wijze te herleiden is naar de betrokken personen. Dit betekent een onevenredige benadeling van betrokken personen, die niet opweegt tegen de belangen van openbaarmaking. Voor de toelichting verwijst de CCD naar hetgeen is uiteengezet onder 'eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer'.

Als gevolg hiervan zullen, naast de gegevens die reeds zijn vermeld onder 'eerbiediging van persoonlijke levenssfeer' eveneens de volgende algemene instellingsgegevens uit de documenten worden verwijderd – indien die herleidbaar zijn naar personen of er sprake is van bijzondere omstandigheden:

- naam van de instelling of organisatie (vergunninghouder of DEC),
- gegevens over proefdierlocaties en sub-locaties, zoals straatnaam, postcode, plaats, maar ook het organisatieonderdeel,
- Kvk-nummer,
- IBAN-rekeningnummer.

Tenzij deze gegevens door de betreffende organisatie reeds zijn geopenbaard, door bijvoorbeeld een vermelding op een website.

In specifieke gevallen kan de openbaarmaking van bovenstaande algemene instellingsgegevens herleidbaar zijn naar individuele personen. Bijvoorbeeld in combinatie met een kenmerkend project, of door het feit dat het project op een kleine afdeling wordt uitgevoerd met een zeer beperkte groep onderzoekers. Bij het verzoek om dergelijke gegevens te weigeren overweegt de CCD of een dergelijke herleidbaarheid is aangetoond, dan wel of er sprake is van bijzondere omstandigheden. Deze omstandigheden kunnen aanleiding zijn om algemene instellingsgegevens niet te openbaren. In onderstaande paragraaf wordt separaat ingegaan op de bijzondere omstandigheden.

De naam van de instelling of organisatie, het Kvk-nummer en het IBAN-rekeningnummer worden, tenzij er sprake is van bijzondere omstandigheden, geopenbaard. Dit geldt ook voor de hoofdlocaties van de verschillende instellingen, mede gezien het feit dat deze over het algemeen reeds openbaar zijn. Een herleidbaarheid naar personen wordt bij openbaarmaking van voornoemde gegevens in beginsel niet aangenomen.

Gegevens over proefdierlocaties en sub-locaties worden niet geopenbaard. Het is aannemelijk dat door openbaarmaking van deze locaties achterhaald kan worden welke personen betrokken zijn bij het verrichten van dierproeven. Op de proefdierlocatie worden de proefdieren gehouden en worden de dierproeven uitgevoerd. Deze informatie kan dierenrechtenextremisten aanleiding geven tot bedreiging en intimidaties. Hiervoor kan aansluiting worden gezocht bij de uitspraak van de rechtbank Gelderland van 21 april 2016 (AWB 15/6463). Voor wat betreft de specifieke dierproeflocaties kan tevens aangesloten worden bij de uitspraak van de rechtbank Gelderland van 22 juli 2014 (ECLI:NL:RBGEL:2014:4543) en de Memorie van Toelichting bij de Wod (Kamerstukken II 2012/13, 33 692, nr. 3, blz. 14). In dit kader wordt eveneens verwezen naar de uitspraken van de Afdeling van 15 maart 2017 (ECLI:NL:RVS:2017:680), 5 april 2017 (ECLI:NL:RVS:2017:952), 7 juni 2017 (ECLI:NL:RVS:2017:1498), 14 februari 2018 (ECLI:NL:RVS:2018:492) en de uitspraak van de rechtbank Den Haag van 20 februari 2018 (ECLI:NL:RBDHA:2018:1766). De Afdeling en rechtbank stellen in genoemde uitspraken dat het betrokken bestuursorgaan zich in redelijkheid op het standpunt

heeft kunnen stellen dat het belang van betrokken derde belanghebbenden om tegen bedreigingen en intimidatie van dierenrechtenactivisten beschermd te blijven en daarmee het belang van het voorkomen van onevenredige benadeling als bedoeld in artikel 10, tweede lid, aanhef en onder g, van de Wob zwaarder dient te wegen dan het publieke belang bij openbaarmaking van de gevraagde gegevens. Uit de uitspraken volgt dat het belang van bescherming van werknemers van vergunninghouders, proefdierinstellingen en andere betrokkenen groot is en in de afweging van belangen zwaarder weegt dan het publieke belang van openbaarmaking van de gevraagde gegevens.

In verband met de rechtstreekse herleidbaarheid naar personen kan het ook voorkomen dat de naam geweigerd wordt van partners waarmee de vergunninghouder samenwerkt. In dit kader verwijst de CCD naar een uitspraak van de Afdeling van 7 april 2017 (ECLI:NL:RVS:2017:952).

Naar het oordeel van de CCD kan de conclusie van een afweging om informatie met betrekking tot openbaarmaking van algemene instellingsgegevens versus de openbaarmaking van persoonsnamen op basis van een vergelijkbaar feitencomplex van elkaar afwijken. De belangenafweging is van geheel ander aard en kent ook een ander gewicht.

Bijzondere omstandigheden

Bijzondere omstandigheden kunnen aanleiding geven om algemene instellingsgegevens, waarvan de herleidbaarheid naar personen niet vaststaat, toch niet te openbaren.

Van bijzondere omstandigheden kan bijvoorbeeld sprake zijn bij al dan niet radicale activistische acties met betrekking tot dierenrechten, aangetoond middels een overzicht met recentelijke acties. Zie hiervoor de uitspraak van de Afdeling van 14 februari 2018 (ECLI:NL:RVS:2018:492). Ook de onderzochte diersoort kan, al dan niet in combinatie met andere bijzondere omstandigheden, aanleiding geven om algemene instellingsgegevens niet te openbaren, bijvoorbeeld bij maatschappelijk beladen diersoorten of diersoorten met een hoge aaibaarheidsfactor. Zie hiervoor de uitspraak van de Afdeling van 5 april 2017 (ECLI:NL:RVS:2017:952). De onderzochte diersoort kan ook van belang zijn om de herleidbaarheid naar personen aan te tonen, bijvoorbeeld indien een onderzoeksgroep de enige groep in Nederland is die onderzoek doet naar de betreffende diersoort.

De context of aard van het onderzoek kan eveneens aanleiding geven om algemene instellingsgegevens niet te openbaren. De CCD vindt steun voor deze gedachte in de uitspraak van de rechtbank Gelderland van 21 april 2016 (kenmerk: AWB 15/6463). Het werken met besmettelijke ziekteverwekkers kan een verhoogde kans op dierenrechtenactivisme teweegbrengen. Dit geldt ook voor maatschappelijk beladen onderzoek waarvoor aandacht is (geweest) in de media. Openbaarmaking van naar de instelling herleidbare gegevens kan in deze omstandigheden onevenredig benadelend zijn.



Literatuurverwijzingen

Diverse vergunninghouders hebben verzocht om weigering van literatuurverwijzingen, of verwijzingen naar eerder onderzoek van de onderzoeksgroep, in verband met de herleidbaarheid naar personen.

De CCD is van oordeel dat het belang van openbaarmaking in dit geval niet opweegt tegen de onevenredige benadeling als gevolg van de herleidbaarheid naar de betrokken personen, dan wel de bescherming van de persoonlijke levenssfeer van de betrokken personen.

Indien de literatuurverwijzingen afkomstig zijn van bij deze onderzoeken betrokken personen, rechtstreeks verwijzen naar, of rechtstreeks zouden leiden naar betrokken personen, dan worden de literatuurverwijzingen geanonimiseerd. Dit geldt ook voor de verwijzingen naar eerdere onderzoeken van de betreffende onderzoeksgroep. Op basis van kernwoorden en de openbare gegevens van het onderzoek kan in diverse zoekmachines eenvoudig achterhaald worden welke onderzoekers bij het desbetreffende onderzoek betrokken zijn.

Voorkomen van fraude

Wanneer de CCD handtekeningen van betrokkenen openbaar maakt, zijn deze eenvoudig te kopiëren. Het is niet uitgesloten dat kwaadwillende personen deze handtekeningen gebruiken voor frauduleuze doeleinden. Het belang van het voorkomen van onevenredige benadeling weegt de CCD hier zwaarder dan het belang van openbaarmaking. Derhalve zijn in alle besluiten en overige brieven de handtekeningen geanonimiseerd.

Concurrentiegevoelige informatie

Een aantal belanghebbenden heeft verzocht om weigering van concurrentiegevoelige informatie waarvan de openbaarmaking niet opweegt tegen de onevenredige bevoordeling of benadeling. Dit betreft specifieke gegevens over de gebruikte materialen/stoffen/vaccins en technieken in de onderzoeken van vergunninghouders. Hiermee wordt in specifieke gevallen essentiële informatie gegeven over de onderzoeksdoelstelling, onderzoeksopzet, onderzoeksstrategie, de stappen van het onderzoek en/of de fase waarin het onderzoek zich bevindt. Deze informatie is in hoge mate concurrentiegevoelig, aangezien concurrerende onderzoekers de informatie kunnen gebruiken voor het eigen onderzoek. Als gevolg hiervan zorgt openbaarmaking voor een onevenredige benadeling van de betrokken onderzoekers. Met name in de beginfase van een onderzoek zou openbaarmaking tot onevenredige bevoordeling van de concurrerende onderzoeksgroepen leiden.

Openbaarmaking van specifieke niet gepubliceerde informatie kan ook een patentaanvraag in de weg staan. Bijvoorbeeld informatie over nieuwe technieken, de toepassing van een nieuw (genees)middel of details van een onderzoekshypothese. Indien een concurrent deze informatie in handen krijgt kan deze als eerste patent aanvragen, hetgeen de onderzoekers en instelling van de nieuwe vinding onevenredig zou benadelen.

Verder is het een algemeen geldende, ongeschreven regel van (academisch) onderzoek op het terrein van medische en biologische wetenschappen, dat een onderzoeksrapport waaruit al eerder gegevens, analyses of resultaten openbaar

zijn gemaakt, in beginsel niet meer voor acceptatie door een gerenommeerd wetenschappelijk tijdschrift in aanmerking komt. Daar waar gegevens herleidbaar zijn tot de onderzoeksstrategie kunnen andere onderzoekers deze overnemen. Met name in de beginfase van een onderzoek zou dit tot onevenredige bevoordeling van de concurrerende onderzoeksgroepen leiden. Openbaarmaking van specifieke informatie kan daarnaast publicatie in wetenschappelijke tijdschriften verhinderen. Het is een gegeven dat het van wezenlijk belang is voor wetenschappelijk onderzoekers om als eerste te kunnen publiceren in gerenommeerde tijdschriften. Als openbaarmaking van informatie toekomstige publicaties in de weg staat, zorgt dit voor een onevenredige benadeling van betrokken onderzoekers. Verwezen wordt naar onder meer twee uitspraken van de rechtbank Gelderland van 22 juli 2014 (ECLI:NL:RBGEL:2014:4555) en (ECLI:NL:RBGEL:2014:4543).

De onevenredige benadeling als gevolg van het vroegtijdig openbaar maken van specifieke informatie kan tevens zien op het financiële nadeel en de imagoschade die vergunninghouders lijden indien zij geen patent kunnen aanvragen, eerste publicatie mislopen en/of concurrerende onderzoekers de informatie gebruiken voor het eigen onderzoek.

Het voorgaande betekent dat indien voldoende inzichtelijk is dat openbaarmaking van concurrentiegevoelige (bedrijfs)informatie inderdaad zou leiden tot voordeel voor andere ondernemingen en/of onevenredige benadeling van de belanghebbende, openbaarmaking van de betreffende delen van de informatie op grond van deze weigeringsgrond wordt geweigerd. Indien een beroep wordt gedaan op concurrentiegevoeligheid voor gegevens die reeds in de NTS zijn vermeld, geldt dat deze gegevens reeds openbaar zijn en om deze reden wel openbaar worden gemaakt.

Naam onderzoekspartners, subsidieverstrekkers en leveranciers

In verband met de rechtstreekse herleidbaarheid naar personen kan het ook voorkomen dat de naam geweigerd wordt van ondernemingen die met de vergunninghouders samenwerken, zoals onderzoekspartners en leveranciers. Ook de namen van externe financiers kunnen geweigerd worden. In dit kader verwijst de CCD naar een uitspraak van de Afdeling van 7 april 2017 (ECLI:NL:RVS:2017:952). Indien er sprake is van een reëel risico van dierenrechtenactivisme bij openbaarmaking van de namen van deze ondernemingen dan is de CCD van oordeel dat het belang van openbaarmaking niet opweegt tegen de onevenredige benadeling die dit met zich mee zou brengen.

7.9. Persoonlijke beleidsopvattingen in een stuk bestemd voor intern beraad

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

Voor wat betreft documenten ten behoeve van intern beraad is het oogmerk waarmee het document is opgesteld daartoe bepalend. Uit de uitspraak van de Afdeling van 21 december 2016 (ECLI:NL:RVS:2016:3376) blijkt uit rechtsoverweging 2.2: "*Zoals eveneens volgt uit de geschiedenis van de totstandkoming van de Wob (Kamerstukken II 1986/87, 19 859, nr. 3, blz. 14 en 38) en zoals de Afdeling evenzeer eerder heeft overwogen (onder meer in de*



uitspraak van 18 augustus 2010, ECLI:NL:RVS:2010:BN4268), beoogt artikel 11, eerste lid, van de Wob ter bescherming van de vrije meningsvorming te verzekeren dat de bij ontwikkeling van beleid van een bestuursorgaan betrokken personen in alle vrijheid en in een vertrouwelijke sfeer hun gedachten en opvattingen kunnen uiten zonder vrees voor gezichtsverlies.”

Aangaande het advies van het secretariaat van de CCD aan het bestuur van de CCD kan worden aangegeven dat dit is opgesteld ten behoeve van overleg en meningsvorming over een bestuurlijke aangelegenheid, zodat het is opgesteld ten behoeve van intern beraad. Bovendien bevat het advies meningen, voorstellen en inschattingen van de opsteller met betrekking tot een bestuurlijke aangelegenheid. Derhalve bevat het advies persoonlijke beleidsopvattingen. De feiten die in het document zijn opgenomen, zijn zozeer met de persoonlijke beleidsopvattingen verweven, dat het niet mogelijk is om deze daarin te scheiden. Hiervoor kan eveneens aansluiting worden gezocht bij genoemde uitspraak van de Afdeling van 21 december 2016 en de uitspraak van de Afdeling van 24 juni 2015 (ECLI:NL:RVS:2015:1942).

Tenslotte volgt uit deze uitspraak dat artikel 11, eerste lid, van de Wob bestuursorganen gebiedt om geen informatie over persoonlijke beleidsopvattingen openbaar te maken uit documenten die ten behoeve van intern beraad zijn opgesteld en dit artikel laat geen ruimte voor een belangenafweging.

Uit de uitspraak van de Afdeling van 28 december 2016 (ECLI:NL:RVS:2016:3478) volgt voorts dat het bestuursorgaan dat verantwoordelijk is voor de betrokken bestuursvoering bevoegd is om, los van de bereidheid van betrokkenen om in te stemmen met openbaarmaking, de informatie niet te verschaffen (Kamerstukken II 1986/87, 19 859, nr. 3, blz. 38). Zoals de Afdeling eerder heeft overwogen (in de uitspraak van 3 juni 2009 (ECLI:NL:RVS:2009:BI6049)) kan de kring van betrokkenen een rol spelen bij de beantwoording van de vraag of een geanonimiseerde versie van de persoonlijke beleidsopvattingen kan worden verstrekt.

Aan de adviezen over de vergunningen die onder dit verzoek vallen, heeft een beperkte en aanwijsbare groep ambtenaren gewerkt. De CCD acht het niet van belang voor een goede en democratische bestuursvoering indien standpunten en adviezen van ambtenaren zelfstandig worden betrokken in de publieke discussie. De CCD ziet dan ook geen aanleiding om met toepassing van artikel 11, tweede lid, van de Wob in niet tot personen herleidbare vorm informatie te verstrekken over deze persoonlijke beleidsopvattingen.

Uitzonderingen op het bovenstaande vormen de data van de vergaderingen van de CCD die in de ambtelijke adviezen zijn opgenomen. Deze data staan reeds in de verslagen van de vergaderingen van de CCD vermeld. U kunt deze verslagen (met gebruikmaking van de zoekfunctie) vinden op de website van de CCD. Hiermee is deze informatie reeds openbaar.

Het voorgaande betekent dat voor alle NTS-nummers de openbaarmaking wordt geweigerd van de adviezen van het secretariaat van de CCD aan het bestuur.

Een vergunninghouder heeft verzocht om eerdere versies van het projectvoorstel, bijlage dierproeven en niet-technische samenvatting te weigeren daar de informatie in deze vermeende concepten, waar deze afwijkt van de informatie in de uiteindelijke (definitieve) documenten, persoonlijke beleidsopvattingen zou bevatten. Zij verwijst hiervoor naar een uitspraak van de Afdeling van 5 december 2012 (ECLI:NL:RVS:2012:BY5117).

Naar het oordeel van de CCD bevat de informatie in voornoemde documenten geen persoonlijke beleidsopvattingen. Alle versies van deze documenten zijn ten behoeve van een aanvraag bij de CCD ingediend. De ingediende documenten zijn geen onderwerp meer van beraad voor vergunninghouder. Dat over een ingediende aanvraag nog vragen worden gesteld, maakt dat niet anders. De aanvraag zelf of mogelijk eerdere versies daarvan bevatten tot slot geen van de CCD afkomstige persoonlijke beleidsopvattingen. Overigens wijken de definitieve versies op slechts kleine (zins)onderdelen af van de eerdere versies, waarvan niet wordt aangevoerd dat deze persoonlijke beleidsopvattingen zou bevatten.

Het feit dat de definitieve versies slechts op kleine (zins)onderdelen afwijken van de eerdere versies geeft voor de CCD wel aanleiding om eerdere versies niet separaat te openbaren. De CCD zoekt hiervoor aansluiting bij artikel 7, tweede lid, onderdeel b, van de Wob. De verschillen tussen versies volgen reeds uit de correspondentie tussen de aanvrager en de CCD, en/of uit het advies van de DEC – meer specifiek onderdeel A van het advies. Uit dit onderdeel volgt welke vragen de DEC heeft gesteld aan de aanvrager, de antwoorden van de aanvrager, en tot welke aanpassingen van de aanvraag dit geleid heeft. Voor het overige komen de versies exact overeen, waarmee de verzochte informatie beschikbaar is.

8. Beoordeling per vergunning

Onder de 'Overwegingen' in dit besluit is per weigeringsgrond ingegaan op de algemene overwegingen die de CCD maakt en wat dit betekent voor het al dan niet openbaar maken van (delen van) de betreffende vergunningen. In aanvulling hierop leest u hieronder de specifieke overwegingen per vergunning.

Voor het overzicht is in bijgevoegde inventarislijsten met een kruisje aangegeven of het document geheel wordt geopenbaard, gedeeltelijk wordt geopenbaard of volledig wordt geweigerd. In kolommen is per document eveneens met een kruisje aangegeven welke wettelijke weigeringsgrond van toepassing is op de niet te openbaren informatie. Uit vaste jurisprudentie volgt dat met de gebruikte tabellen voldoende inzichtelijk is gemaakt op welke grond(en) informatie wordt geweigerd. Verwezen wordt naar onder meer de uitspraak van de rechtbank Amsterdam van 29 december 2016, ECLI:NL:RBAMS:2016:9336.

1. NTS2016705

De vergunninghouder beargumenteert dat specifiek benoemde informatie geweigerd dient te worden ter voorkoming van onevenredige benadeling en de eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer. Dit betreft informatie die rechtsreeks of op eenvoudige wijze zijn te herleiden tot de bij de dierenexperimenten betrokken instanties en/of personen. Zo verzoekt de vergunninghouder om de naam van een subsidieverstrekker te weigeren. Vanwege de in de documenten beschreven zeldzame onderzoekstechniek, is deze naam direct herleidbaar tot de



betrokken onderzoeker(s). Ook verzoekt de vergunninghouder om informatie over de oprichting van deze specifieke onderzoekstechniek te weigeren, vanwege de herleidbaarheid naar de betrokken onderzoeker(s).

De CCD volgt vergunninghouder in haar verzoek voornoemde specifieke informatie te weigeren. De vergunninghouder heeft aannemelijk gemaakt dat deze informatie, in combinatie met de in de documenten beschreven zeldzame onderzoekstechniek, herleidbaar is naar de betrokken onderzoeker(s). De CCD weigert deze beperkte hoeveelheid informatie ter voorkoming van onevenredige benadeling en de eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer.

Verder volgt de CCD de vergunninghouder in haar motivering om enkele literatuurverwijzingen niet openbaar te maken, omdat deze verwijzingen ook namen bevatten van betrokken onderzoekers.

2. NTS2017812

De vergunninghouder en DEC zijn van mening dat op grond van de Richtlijn slechts de NTS openbaar gemaakt mag worden. De CCD volgt belanghebbenden hierin niet. Voor de motivering wordt verwezen naar paragraaf 7.2.

Verder zijn de vergunninghouder en DEC van mening dat een deel van de documenten bedrijfs- en fabricagegegevens bevat. De vergunninghouder verzoekt op deze grond om weigering van openbaarmaking van algemene instellingsgegevens waaronder de instellingsnaam en het instellingsnummer bij de NVWA. De DEC geeft aan dat haar naam gezien dient te worden als een bedrijfsgegeven. De CCD is van oordeel dat onvoldoende is gemotiveerd dat er sprake is van bedrijfs- en fabricagegegevens. Het is niet inzichtelijk dat de informatie in de betreffende onderdelen van de documenten, afzonderlijk en in onderlinge samenhang beschouwd, zijn aan te merken als concurrentiegevoelige bedrijfsinformatie, waarvan openbaarmaking leidt tot wetenswaardigheden met betrekking tot de technische bedrijfsvoering of het productieproces, dan wel met betrekking tot de afzet van de producten of de kring van afnemers en leveranciers. Zie hiervoor ook de algemene overwegingen van de CCD in paragraaf 7.3.

Wel heeft zowel de vergunninghouder als de DEC inzichtelijk gemaakt dat het belang van openbaarmaking van de algemene instellingsgegevens niet opweegt tegen het belang van het voorkomen van onevenredige benadeling en het belang van de eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer. Dit is gelegen in het feit dat is aangetoond dat de vergunninghouder het doelwit is geweest van dierenrechtenactivisten en dat er een gegronde risico bestaat dat zij het doelwit is van dierenrechtenactivisme. Diverse personen bij de DEC hebben in het verleden te maken gehad met acties van dierenactivisten en de vrees blijft bestaan dat er opnieuw gerichte acties plaatsvinden. Gezien deze aantoonbare dreiging en de intimidatie in het verleden volgt de CCD de vergunninghouder en de DEC in haar motivering. Diverse algemene instellingsgegevens, waaronder de naam van zowel de vergunninghouder en DEC worden geweigerd.

Eveneens ter voorkoming van onevenredige benadeling heeft de vergunninghouder verder verzocht om de openbaarmaking van concurrentiegevoelige informatie te weigeren. De vergunninghouder geeft daarbij

aan dat het in de vergunningen op onderdelen om een nieuwe aanpak van een onderzoeksvraag gaat, waarbij niet eerder toegepaste technologieën worden gebruikt. Het onderzoek zou verder een nog niet eerder gebruikte unieke combinatie van tests en methoden bevatten. Door vroegtijdige openbaarmaking van deze informatie zou een concurrerend onderzoeksinstituut een vergelijkbaar onderzoek kunnen opzetten of innovatieve elementen in hun onderzoek kunnen implementeren nog voordat de bedenkers hebben kunnen publiceren. Ook zou door vroegtijdige openbaarmaking van deze informatie een eventuele patentaanvraag in het geding kunnen komen. Hoewel voornoemd betoog over de weigering van concurrentiegevoelige informatie voor de CCD aanleiding kan geven om deze informatie te weigeren - zie in dit kader ook de algemene overwegingen van de CCD over 'concurrentiegevoelige informatie' in paragraaf 7.8. - laat de vergunninghouder na om aan te geven welke specifieke concurrentiegevoelige informatie op deze grond geweigerd zou moeten worden. Er wordt derhalve geen informatie geweigerd om reden dat dit concurrentiegevoelige informatie zou betreffen.

Tot slot volgt de CCD de vergunninghouder niet in haar motivering om specifieke informatie te weigeren op grond van economische of financiële belangen van de Staat of andere publiekrechtelijke lichamen. De CCD is van oordeel dat, voor zover dergelijke informatie al in de documenten is opgenomen, deze informatie niet direct inzicht geeft in de economische positie, onderhandelingsstrategie en/of de onderhandelingspositie van de vergunninghouder.

3. NTS2017849

De vergunninghouder en DEC zijn van mening dat op grond van de Richtlijn slechts de NTS openbaar gemaakt mag worden. De CCD volgt belanghebbenden hierin niet. Voor de motivering wordt verwezen naar paragraaf 7.2.

Verder zijn de vergunninghouder en DEC van mening dat een deel van de documenten bedrijfs- en fabricagegegevens bevat. De vergunninghouder verzoekt op deze grond om weigering van openbaarmaking van algemene instellingsgegevens waaronder de instellingsnaam en het instellingsnummer bij de NVWA. De DEC geeft aan dat haar naam gezien dient te worden als een bedrijfsgegeven. De CCD is van oordeel dat onvoldoende is gemotiveerd dat er sprake is van bedrijfs- en fabricagegegevens. Het is niet inzichtelijk dat de informatie in de betreffende onderdelen van de documenten, afzonderlijk en in onderlinge samenhang beschouwd, zijn aan te merken als concurrentiegevoelige bedrijfsinformatie, waarvan openbaarmaking leidt tot wetenswaardigheden met betrekking tot de technische bedrijfsvoering of het productieproces, dan wel met betrekking tot de afzet van de producten of de kring van afnemers en leveranciers. Zie hiervoor ook de algemene overwegingen van de CCD in paragraaf 7.3.

Wel heeft zowel de vergunninghouder als de DEC inzichtelijk gemaakt dat het belang van openbaarmaking van de algemene instellingsgegevens niet opweegt tegen het belang van het voorkomen van onevenredige benadeling en het belang van de eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer. Dit is gelegen in het feit dat is aangetoond dat de vergunninghouder het doelwit is geweest van dierenrechtenactivisten en dat er een gegronde risico bestaat dat zij het doelwit is van dierenrechtenactivisme. Diverse personen bij de DEC hebben in het verleden



te maken gehad met acties van dierenactivisten en de vrees blijft bestaan dat er opnieuw gerichte acties plaatsvinden. Gezien deze aantoonbare dreiging en de intimidatie in het verleden volgt de CCD de vergunninghouder en de DEC in haar motivering. Diverse algemene instellingsgegevens, waaronder de naam van zowel de vergunninghouder en DEC worden geweigerd.

Eveneens ter voorkoming van onevenredige benadeling heeft de vergunninghouder verder verzocht om de openbaarmaking van concurrentiegevoelige informatie te weigeren. De vergunninghouder geeft daarbij aan dat het in de vergunningen op onderdelen om een nieuwe aanpak van een onderzoeksvraag gaat, waarbij niet eerder toegepaste technologieën worden gebruikt. Het onderzoek zou verder een nog niet eerder gebruikte unieke combinatie van tests en methoden bevatten. Door vroegtijdige openbaarmaking van deze informatie zou een concurrerend onderzoeksinstituut een vergelijkbaar onderzoek kunnen opzetten of innovatieve elementen in hun onderzoek kunnen implementeren nog voordat de bedenkers hebben kunnen publiceren. Ook zou door vroegtijdige openbaarmaking van deze informatie een eventuele patentaanvraag in het geding kunnen komen. Hoewel voornoemd betoog over de weigering van concurrentiegevoelige informatie voor de CCD aanleiding kan geven om deze informatie te weigeren - zie in dit kader ook de algemene overwegingen van de CCD over 'concurrentiegevoelige informatie' in paragraaf 7.8. - laat de vergunninghouder na om aan te geven welke specifieke concurrentiegevoelige informatie op deze grond geweigerd zou moeten worden. Er wordt derhalve geen informatie geweigerd om reden dat dit concurrentiegevoelige informatie zou betreffen.

Tot slot volgt de CCD de vergunninghouder niet in haar motivering om specifieke informatie te weigeren op grond van economische of financiële belangen van de Staat of andere publiekrechtelijke lichamen. De CCD is van oordeel dat, voor zover dergelijke informatie al in de documenten is opgenomen, deze informatie niet direct inzicht geeft in de economische positie, onderhandlungsstrategie en/of de onderhandlungspositie van de vergunninghouder.

4. NTS2017858

De vergunninghouder beargumenteert dat specifiek benoemde informatie geweigerd dient te worden ter voorkoming van onevenredige bevoordeling of benadeling en de eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer. De informatie die vergunninghouder geweigerd wil hebben bevat nieuwe ideeën, beschrijvingen van onderzoeksmethodes en beschrijvingen van nieuwe technieken, uniek voor het betreffende onderzoek. De vergunninghouder beargumenteert daarbij dat concurrerende instellingen deze informatie zullen benutten en op grond hiervan voordeel zullen kunnen halen, bijvoorbeeld door als eerste te kunnen publiceren of een patent aan te kunnen vragen. Verder bevat de informatie de naam van een subsidieverstrekker, die vanwege de zeldzame onderzoekstechniek herleidbaar is tot de onderzoekers.

De vergunninghouder heeft aannemelijk gemaakt dat openbaarmaking van voornoemde informatie leidt tot voordeel voor andere ondernemingen en onevenredige benadeling van de vergunninghouder. Het mislopen van patent(en) en eerste publicatie kan leiden tot financieel nadeel en imagoschade. Ook heeft zij aannemelijk gemaakt dat specifieke informatie te herleiden is tot de

onderzoekers. De openbaarmaking van voornoemde informatie wordt door de CCD geweigerd.

Verder volgt de CCD de vergunninghouder in haar motivering om enkele literatuurverwijzingen niet openbaar te maken, omdat deze verwijzingen ook namen bevatten van betrokken onderzoekers.

5. NTS2017887

De vergunninghouder beargumenteert dat specifiek benoemde informatie geweigerd dient te worden ter voorkoming van onevenredige benadeling en de eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer.

De vergunninghouder heeft aannemelijk gemaakt dat deze informatie herleidbaar is naar één of meerdere betrokken onderzoekers. Een beperkte hoeveelheid informatie wordt door de CCD geweigerd ter voorkoming van onevenredige benadeling en de eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer.

Verder volgt de CCD de vergunninghouder in haar motivering om enkele literatuurverwijzingen niet openbaar te maken, omdat deze verwijzingen ook namen bevatten van betrokken onderzoekers

6. NTS2017893

De vergunninghouder en DEC zijn van mening dat op grond van de Richtlijn slechts de NTS openbaar gemaakt mag worden. De CCD volgt belanghebbenden hierin niet. Voor de motivering wordt verwezen naar paragraaf 7.2.

Verder zijn de vergunninghouder en DEC van mening dat een deel van de documenten bedrijfs- en fabricagegegevens bevat. De vergunninghouder verzoekt op deze grond om weigering van openbaarmaking van algemene instellingsgegevens waaronder de instellingsnaam en het instellingsnummer bij de NVWA. De DEC geeft aan dat haar naam gezien dient te worden als een bedrijfsgegeven. De CCD is van oordeel dat onvoldoende is gemotiveerd dat er sprake is van bedrijfs- en fabricagegegevens. Het is niet inzichtelijk dat de informatie in de betreffende onderdelen van de documenten, afzonderlijk en in onderlinge samenhang beschouwd, zijn aan te merken als concurrentiegevoelige bedrijfsinformatie, waarvan openbaarmaking leidt tot wetenswaardigheden met betrekking tot de technische bedrijfsvoering of het productieproces, dan wel met betrekking tot de afzet van de producten of de kring van afnemers en leveranciers. Zie hiervoor ook de algemene overwegingen van de CCD in paragraaf 7.3.

Wel heeft zowel de vergunninghouder als de DEC inzichtelijk gemaakt dat het belang van openbaarmaking van de algemene instellingsgegevens niet opweegt tegen het belang van het voorkomen van onevenredige benadeling en het belang van de eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer. Dit is gelegen in het feit dat is aangetoond dat de vergunninghouder het doelwit is geweest van dierenrechtenactivisten en dat er een gegrond risico bestaat dat zij het doelwit is van dierenrechtenactivisme. Diverse personen bij de DEC hebben in het verleden te maken gehad met acties van dierenactivisten en de vrees blijft bestaan dat er opnieuw gerichte acties plaatsvinden. Gezien deze aantoonbare dreiging en de intimidatie in het verleden volgt de CCD de vergunninghouder en de DEC in haar



motivering. Diverse algemene instellingsgegevens, waaronder de naam van zowel de vergunninghouder en DEC worden geweigerd.

Eveneens ter voorkoming van onevenredige benadeling heeft de vergunninghouder verder verzocht om de openbaarmaking van concurrentiegevoelige informatie te weigeren. De vergunninghouder geeft daarbij aan dat het in de vergunningen op onderdelen om een nieuwe aanpak van een onderzoeksvraag gaat, waarbij niet eerder toegepaste technologieën worden gebruikt. Het onderzoek zou verder een nog niet eerder gebruikte unieke combinatie van tests en methoden bevatten. Door vroegtijdige openbaarmaking van deze informatie zou een concurrerend onderzoeksinstituut een vergelijkbaar onderzoek kunnen opzetten of innovatieve elementen in hun onderzoek kunnen implementeren nog voordat de bedenkers hebben kunnen publiceren. Ook zou door vroegtijdige openbaarmaking van deze informatie een eventuele patentaanvraag in het geding kunnen komen. Hoewel voornoemd betoog over de weigering van concurrentiegevoelige informatie voor de CCD aanleiding kan geven om deze informatie te weigeren - zie in dit kader ook de algemene overwegingen van de CCD over 'concurrentiegevoelige informatie' in paragraaf 7.8. - laat de vergunninghouder na om aan te geven welke specifieke concurrentiegevoelige informatie op deze grond geweigerd zou moeten worden. Er wordt derhalve geen informatie geweigerd om reden dat dit concurrentiegevoelige informatie zou betreffen.

Tot slot volgt de CCD de vergunninghouder niet in haar motivering om specifieke informatie te weigeren op grond van economische of financiële belangen van de Staat of andere publiekrechtelijke lichamen. De CCD is van oordeel dat, voor zover dergelijke informatie al in de documenten is opgenomen, deze informatie niet direct inzicht geeft in de economische positie, onderhandelingsstrategie en/of de onderhandelingspositie van de vergunninghouder.

7. NTS20171067

Naast de geweigerde persoonsgegevens en hiernaar herleidbare gegevens worden geen aanvullende gegevens geweigerd.

8. NTS20171505

De DEC is van mening dat op grond van de Richtlijn slechts de NTS openbaar gemaakt mag worden. De CCD volgt belanghebbende hierin niet. Voor de motivering wordt verwezen paragraaf 7.2.

De DEC is verder van mening dat haar naam geweigerd dient te worden met de motivering dat dit bedrijfs- en fabricagegegevens betreft. De CCD volgt de DEC hierin niet en verwijst voor motivering naar de algemene overwegingen in paragraaf 7.3.

Wel heeft de DEC inzichtelijk gemaakt dat het belang van openbaarmaking van haar naam niet opweegt tegen het belang van het voorkomen van onevenredige benadeling en het belang van de eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer. Dit is gelegen in het feit dat de diverse personen bij de DEC in het verleden te maken hebben gehad met acties van dierenactivisten en de vrees blijft bestaan dat er opnieuw gerichte acties plaatsvinden. Gezien deze intimidatie in het verleden en

de vrees voor acties in het heden volgt de CCD de DEC in haar motivering. De naam van de DEC wordt geweigerd.

9. NTS20171544

De vergunninghouder verzoekt om algemene instellingsgegevens, zoals de instellingsnaam, instellingsnummer bij de NVWA, KvK-nummer en adresgegevens niet te openbaren ter voorkoming van onevenredige benadeling en de eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer. Daarvoor voert zij aan dat uit deze gegevens, in samenhang met het project, de namen van individuele personen, die betrokken zijn bij het onderzoek, af te leiden zijn. De vergunninghouder heeft regelmatig te maken met acties van dierenrechtenactivisten. Daarbij zijn ook diverse medewerkers persoonlijk bedreigd. De vergunninghouder geeft in haar zienswijze een overzicht van acties die hebben plaatsgevonden. De vergunninghouder geeft aan dat gedetailleerde kennis omtrent de projecten kan leiden tot gerichte acties tegen medewerkers.

De CCD is van oordeel dat de vergunninghouder in voldoende mate inzichtelijk gemaakt heeft dat er sprake is van dermate bijzondere omstandigheden dat openbaarmaking van de algemene instellingsgegevens niet opweegt tegen het belang van het voorkomen van onevenredige benadeling en het belang van de eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer. Deze algemene instellingsgegevens, waaronder de instellingsnaam en adresgegevens, worden derhalve geweigerd. Ook worden de algemene gegevens van de DEC geweigerd, waaronder haar naam, omdat deze gegevens direct zijn te relateren aan de vergunninghouder.

Verder volgt de CCD de vergunninghouder in haar motivering om diverse literatuurverwijzingen niet openbaar te maken, omdat deze verwijzingen ook namen bevatten van betrokken onderzoekers.

Het verzoek van de vergunninghouder om het NTS-nummer te weigeren wordt niet gehonoreerd. Het (generieke) NTS-nummer is immers niet naar de vergunninghouder herleidbaar.

De vergunninghouder verwijst in haar zienswijze ook naar de weigeringsgrond zoals opgenomen in artikel 10, eerste lid, onderdeel d, van de Wob. Deze weigeringsgrond is echter niet van toepassing op dit Wob-verzoek. Voor de onderbouwing wordt verwezen naar paragraaf 7.4. van dit besluit.

10. NTS20171630

De vergunninghouder is van mening dat slechts de NTS openbaar gemaakt mag worden. De CCD volgt de vergunninghouder hierin niet. Voor de motivering wordt verwezen paragraaf 7.2.

Verder verzoekt de vergunninghouder om diverse algemene instellingsgegevens niet te openbaren. Het openbaar maken van deze gegevens in de context van de informatie over de dierproeven (hoeveel en welke dieren) kan volgens de vergunninghouder buitensporige reacties opleveren tegen de organisatie en haar medewerkers. Ter ondersteuning hiervan overlegt de vergunninghouder een lijstje met diverse activistische acties die recentelijk hebben plaatsgevonden.



Ook verzoekt de vergunninghouder om specifieke delen niet te openbaren waarin informatie wordt gegeven over de onderzoeksstrategie en onderzoeksmethoden. Volgens de vergunninghouder kan uit een combinatie van deze gegevens, of volgorde van genoemde species, aard en frequentie van afname biologisch materiaal, worden afgeleid welke pathogenen de vergunninghouder belangrijk acht, wat haar strategie is en met welk specifiek onderzoek zij zich bezighoudt. Bovendien zou uit de koppeling tussen de naam van de vergunninghouder en de inhoud van de documenten informatie kunnen worden afgeleid over welke onderzoeken de vergunninghouder voornemens is te verrichten. In combinatie met andere geopenbaarde documenten zou bovendien inzicht worden gekregen in concurrentiegevoelige bedrijfsprocessen.

De CCD is van oordeel dat de vergunninghouder, mede gezien het overlegde lijstje met de activistische acties die recentelijk hebben plaatsgevonden, in voldoende mate inzichtelijk gemaakt heeft dat het belang van openbaarmaking van de algemene instellingsgegevens niet opweegt tegen het belang van het voorkomen van onevenredige benadeling en het belang van de eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer. Diverse algemene instellingsgegevens, waaronder de naam en het adres van de vergunninghouder worden geweigerd. Verder volgt de CCD de vergunninghouder in haar motivering om specifieke concurrentiegevoelige informatie te weigeren. Het totaal aantal aangevraagde dieren wordt overigens wel middels de NTS geopenbaard.

11. NTS20171646

De vergunninghouder verzoekt om haar adresgegevens niet te openbaren ter voorkoming van onevenredige benadeling. Vanwege het feit dat de vergunninghouder werkt met dieren met een hoge aaibaarheidsfactor beargumenteert zij dat dit een hoger risico op dierenrechtenactivisme met zich mee brengt. Verder verzoekt de vergunninghouder om een zeer beperkte hoeveelheid concurrentiegevoelige informatie over de interne bedrijfsvoering niet te openbaren. Tot slot verzoekt de vergunninghouder de naam van een adviseur niet te openbaren om te voorkomen dat deze adviseur te maken krijgt met dierenrechtenactivisme.

De CCD volgt de vergunninghouder in haar motivering. Aannemelijk is dat de vergunninghouder wegens bijzondere omstandigheden, werken met dieren met een hoge aaibaarheidsfactor, een hoger risico heeft op dierenrechtenactivisme. Verder is de informatie over de interne bedrijfsvoering naar het oordeel van de CCD aan te merken als concurrentiegevoelig, waarvan openbaarmaking onevenredig benadelend zou zijn. Tot slot neemt de CCD het verzoek van de vergunninghouder over om de naam van een adviseur niet te openbaren. Openbaarmaking van deze naam zou kunnen leiden tot dierenrechtenactivisme jegens deze adviseur, hetgeen de CCD eveneens als onevenredig benadelend beschouwd. Openbaarmaking van deze specifieke informatie, dit betreft enkele zinsdelen, wordt op voornoemde grond geweigerd.

12. NTS20171668

De vergunninghouder beargumenteert dat de documenten concurrentiegevoelige informatie bevatten over de bedrijfsvoering, (onderzoeks)methoden en middelen, en verzoekt om deze informatie niet te openbaren omdat dit bedrijfs- en fabricagegegevens zou betreffen. Met openbaarmaking zou essentiële informatie

worden gegeven over de gebruikte opzet, werkwijze en methodologie van het onderzoek. Concurrenten kunnen deze informatie gebruiken voor een eigen onderzoeksstrategie. Openbaarmaking van deze informatie zou verder kunnen leiden tot contractbeëindiging door externe opdrachtgevers en daarmee beëindiging van het onderzoek. Ook zal nog patent worden aangevraagd op de ontwikkelde nieuwe technologie, hetgeen niet mogelijk zal zijn bij voortijdige openbaarmaking.

De CCD is van oordeel dat onvoldoende is gemotiveerd dat er sprake is van bedrijfs- en fabricagegegevens. Het is niet inzichtelijk dat de informatie in de betreffende onderdelen van de documenten, afzonderlijk en in onderlinge samenhang beschouwd, zijn aan te merken als concurrentiegevoelige bedrijfsinformatie, waarvan openbaarmaking leidt tot wetenswaardigheden met betrekking tot de technische bedrijfsvoering of het productieproces, dan wel met betrekking tot de afzet van de producten of de kring van afnemers en leveranciers. Zie hiervoor ook de algemene overwegingen van de CCD in paragraaf 7.3.

Wel heeft de vergunninghouder inzichtelijk gemaakt dat het belang van openbaarmaking van de concurrentiegevoelige informatie niet opweegt tegen het belang van het voorkomen van onevenredige benadeling. Openbaarmaking van voornoemde informatie wordt op laatstgenoemde grond geweigerd.

Verder volgt de CCD de vergunninghouder in haar motivering om enkele literatuurverwijzingen niet openbaar te maken, omdat deze verwijzingen ook namen bevatten van betrokken onderzoekers.

13. NTS20171924

Naast de geweigerde persoonsgegevens en hiernaar herleidbare gegevens worden geen aanvullende gegevens geweigerd.

14. NTS20171926

Naast de geweigerde persoonsgegevens en hiernaar herleidbare gegevens worden geen aanvullende gegevens geweigerd.

15. NTS20171944

De vergunninghouder beargumenteert dat specifiek benoemde informatie geweigerd dient te worden ter voorkoming van onevenredige bevoordeling of benadeling. Dit betreft concurrentiegevoelige informatie over de onderzoeksstrategieën. Ook staat openbaarmaking van deze informatie eventuele patentaanvragen en eerste publicatie in de weg. Verder geeft de vergunninghouder aan dat sommige concurrenten, bij vroegtijdige openbaarmaking van specifieke informatie, de technieken hebben om de vergunninghouder in te halen. Dit acht de vergunninghouder onevenredig benadelend.

De CCD volgt de vergunninghouder in haar motivering. De onderzoeksstrategie is in hoge mate concurrentiegevoelig, aangezien concurrerende onderzoekers de informatie kunnen gebruiken voor het eigen onderzoek. Vroegtijdige openbaarmaking van deze informatie is naar het oordeel van de CCD onevenredig benadelend. Dit geldt eveneens voor vroegtijdige openbaarmaking van informatie waardoor vergunninghouder niet meer als eerste zou kunnen publiceren over haar



onderzoek en patent zou kunnen aanvragen, met imagoschade en financiële schade tot gevolg. De openbaarmaking van voornoemde concurrentiegevoelige informatie wordt geweigerd.

16. NTS20171964

Naast de geweigerde persoonsgegevens en hiernaar herleidbare gegevens worden enkele literatuurverwijzingen niet openbaar gemaakt, omdat deze verwijzingen ook namen bevatten van betrokken onderzoekers.

17. NTS20171984

Naast de geweigerde persoonsgegevens en hiernaar herleidbare gegevens worden geen aanvullende gegevens geweigerd.

18. NTS20172004

De vergunninghouder beargumenteert dat specifiek benoemde informatie geweigerd dient te worden ter voorkoming van onevenredige bevoordeling of benadeling. Dit betreft informatie over specifieke onderzoekstechnieken, procedures en detailaspecten van onderzoeken. Hiermee wordt inzicht gegeven in de onderzoeksrichting, uitvoeringsmethoden en gemaakte (materiaal)keuzes. Met deze gegevens is het mogelijk het onderzoek te reproduceren en dit maakt de gegevens zeer concurrentiegevoelig. Ook staat openbaarmaking van deze informatie een patentaanvraag in de weg, en neemt dit de nieuws waarde weg van een eerste publicatie. De CCD volgt de vergunninghouder in haar motivering en is van oordeel dat er sprake is van concurrentiegevoelige informatie waarbij het belang van openbaarmaking van deze gegevens niet opweegt tegen de onevenredige bevoordeling of benadeling. Openbaarmaking van voornoemde informatie wordt op deze grond geweigerd.

Verder volgt de CCD de vergunninghouder in haar motivering om enkele literatuurverwijzingen niet openbaar te maken, omdat deze verwijzingen ook namen bevatten van betrokken onderzoekers.

19. NTS20172044

De vergunninghouder en DEC verzoeken op diverse weigeringsgronden om de openbaarmaking van specifieke informatie te weigeren. Zo motiveren zij onder andere dat er sprake zou zijn van bedrijfs- en fabricagegegevens, vanwege een unieke positie in de wereld voor het gebruik van een bepaalde therapie. De CCD is van oordeel dat onvoldoende is gemotiveerd dat er sprake is van bedrijfs- en fabricagegegevens. Het is niet inzichtelijk dat de informatie in de betreffende onderdelen van de documenten, afzonderlijk en in onderlinge samenhang beschouwd, zijn aan te merken als concurrentiegevoelige bedrijfsinformatie, waarvan openbaarmaking leidt tot wetenswaardigheden met betrekking tot de technische bedrijfsvoering of het productieproces, dan wel met betrekking tot de afzet van de producten of de kring van afnemers en leveranciers. Zie hiervoor ook de algemene overwegingen van de CCD in paragraaf 7.3.

De CCD volgt de vergunninghouder en DEC wel in haar redentatie dat openbaarmaking van deze gegevens geweigerd zou moeten worden vanwege de onevenredige benadeling die dit tot gevolg zou hebben. Het publiekelijk maken van deze informatie, voordat de betrokken onderzoekers de voorgestelde onderzoeken zelf hebben kunnen uitvoeren, kan ertoe leiden dat andere

onderzoeksgroepen en commerciële partijen de beschreven nieuwe techniek kunnen overnemen en/of patenteren. Dit zou daarnaast de eventuele waarde daarvan negatief kunnen beïnvloeden. De onevenredige benadeling ziet tevens op de herleidbaarheid naar de betrokken onderzoekers, hetgeen voorkomen moet worden. De afdelingen bij de vergunninghouder zijn betrekkelijk klein en binnen elke afdeling is maar een (zeer) kleine groep onderzoekers werkzaam. Hierdoor ligt herleidbaarheid naar betrokken natuurlijke personen voor de hand. Via zoekmachines zijn, door het invoeren van diverse trefwoorden die in de documenten zijn opgenomen, de betrokken onderzoekers te achterhalen. Voornoemde concurrentiegevoelige en tevens herleidbare informatie wordt geweigerd.

De vergunninghouder en DEC verzoeken ook om de openbaarmaking van algemene instellingsgegevens te weigeren, ter bescherming van de persoonlijke levenssfeer van de betrokkenen. Zoals in paragraaf 7.8. is beschreven weigert de CCD algemene instellingsgegevens indien deze herleiden naar betrokken personen of als er sprake is van bijzondere omstandigheden. Naar het oordeel van de CCD is de herleidbaarheid naar betrokken personen niet aangetoond. Ook is er geen sprake van bijzondere omstandigheden. De algemene instellingsgegevens worden geopenbaard.

De vergunninghouder en DEC verwijzen in de zienswijze ook naar de weigeringsgronden zoals opgenomen in artikel 10, lid 1, sub d en artikel 10, lid 2, sub d van de Wob. Deze weigeringsgronden zijn echter niet van toepassing op dit Wob-verzoek. Voor de onderbouwing wordt verwezen naar paragraaf 7.4. en paragraaf 7.6. van dit besluit.

20. NTS20172064

Naast de geweigerde persoonsgegevens en hiernaar herleidbare gegevens worden geen aanvullende gegevens geweigerd.

21. NTS20172104

De vergunninghouder verzoekt om naast persoonsgegevens en hiernaar herleidbare gegevens ook de naam van een externe partij die de proefdieren zal vangen niet te openbaren, ter bescherming van de persoonlijke levenssfeer en ter voorkoming van onevenredige benadeling.

De CCD honoreert dit verzoek en besluit om, naast persoonsgegevens en hiernaar herleidbare gegevens, de naam van de externe partij niet te openbaren, ter bescherming van de persoonlijke levenssfeer en ter voorkoming van onevenredige benadeling. De partij die de proefdieren zal vangen betreft een relatief kleine onderneming, met een beperkte en aanwijsbare groep medewerkers. Bij openbaarmaking van de naam van de partij, in combinatie met het betreffende project, zijn de betrokken natuurlijke personen gemakkelijk te herleiden. Verder is het gegeven dat deze partij wilde dieren zal vangen een bijzondere omstandigheid dat een verhoogd risico geeft op dierenrechtenactivisme, waarvan de CCD heeft vastgesteld dat dit onevenredig benadelend is.

22. NTS20172144

De vergunninghouder en DEC verzoeken op diverse weigeringsgronden om de openbaarmaking van specifieke informatie te weigeren. Zo motiveren zij onder



andere dat er sprake zou zijn van bedrijfs- en fabricagegegevens, vanwege een unieke positie in de wereld voor bepaalde onderzoeken. De CCD is van oordeel dat onvoldoende is gemotiveerd dat er sprake is van bedrijfs- en fabricagegegevens. Het is niet inzichtelijk dat de informatie in de betreffende onderdelen van de documenten, afzonderlijk en in onderlinge samenhang beschouwd, zijn aan te merken als concurrentiegevoelige bedrijfsinformatie, waarvan openbaarmaking leidt tot wetenswaardigheden met betrekking tot de technische bedrijfsvoering of het productieproces, dan wel met betrekking tot de afzet van de producten of de kring van afnemers en leveranciers. Zie hiervoor ook de algemene overwegingen van de CCD in paragraaf 7.3.

De CCD volgt de vergunninghouder en DEC wel in haar redentatie dat openbaarmaking van deze gegevens geweigerd zou moeten worden vanwege de onevenredige benadeling die dit tot gevolg zou hebben. Het publiekelijk maken van deze informatie, voordat de betrokken onderzoekers de voorgestelde onderzoeken zelf hebben kunnen uitvoeren, kan ertoe leiden dat andere onderzoeksgroepen en commerciële partijen de beschreven nieuwe techniek kan overnemen en/of patenteren. Dit zou daarnaast de eventuele waarde daarvan negatief kunnen beïnvloeden. De onevenredige benadeling ziet tevens op de herleidbaarheid naar de betrokken onderzoekers, hetgeen voorkomen moet worden. De afdelingen bij de vergunninghouder zijn betrekkelijk klein en binnen elke afdeling is maar een (zeer) kleine groep onderzoekers werkzaam. Hierdoor ligt herleidbaarheid naar betrokken natuurlijke personen voor de hand. Via zoekmachines zijn, door het invoeren van diverse trefwoorden die in de documenten zijn opgenomen, de betrokken onderzoekers te achterhalen. Voornoemde concurrentiegevoelige en tevens herleidbare informatie wordt geweigerd.

De vergunninghouder en DEC verzoeken ook om de openbaarmaking van algemene instellingsgegevens te weigeren, ter bescherming van de persoonlijke levenssfeer van de betrokkenen. Zoals in paragraaf 7.8. is beschreven weigert de CCD algemene instellingsgegevens indien deze herleiden naar betrokken personen of als er sprake is van bijzondere omstandigheden. Naar het oordeel van de CCD is de herleidbaarheid naar betrokken personen niet aangetoond. Ook is er geen sprake van bijzondere omstandigheden. De algemene instellingsgegevens worden geopenbaard.

De vergunninghouder en DEC verwijzen in de zienswijze ook naar de weigeringsgronden zoals opgenomen in artikel 10, lid 1, sub d en artikel 10, lid 2, sub d van de Wob. Deze weigeringsgronden zijn echter niet van toepassing op dit Wob-verzoek. Voor de onderbouwing wordt verwezen naar paragraaf 7.4. en paragraaf 7.6. van dit besluit.

23. NTS20172205

Naast de geweigerde persoonsgegevens en hiernaar herleidbare gegevens worden geen aanvullende gegevens geweigerd.

24. NTS20172207

Naast de geweigerde persoonsgegevens en hiernaar herleidbare gegevens worden geen aanvullende gegevens geweigerd.

25. NTS20172225

Naast de geweigerde persoonsgegevens en hiernaar herleidbare gegevens worden geen aanvullende gegevens geweigerd.

26. NTS20172226

De vergunninghouder verzoekt om de openbaarmaking van informatie die verband houdt met de vraagstelling van het onderzoek te weigeren omdat dit onevenredige benadeling tot gevolg zou hebben. De vergunninghouder motiveert dat indien deze informatie openbaar wordt gemaakt, dit betekent dat de gehele vraagstelling die heeft geleid tot het ontwerp van de dierproeven bekend wordt. Ook de volledige gedachtegang die voorafgaat aan het definiëren van de vraagstelling, zou als gevolg van deze openbaarmaking worden prijsgegeven. Hierdoor kunnen derden, actief binnen het betreffende onderzoeksgebied, met deze vertrouwelijke gegevens aan de haal gaan, met alle gevolgen van dien. Betrokken onderzoekers lopen eerste publicaties, onderzoeksubsidies en patentaanvragen mis, consequenties die ook de vergunninghouder aanzienlijk kunnen schaden.

De CCD volgt vergunninghouder in haar motivering. De CCD is van oordeel dat de vergunninghouder aannemelijk gemaakt heeft dat openbaring van specifieke informatie leidt tot onevenredige benadeling. De door vergunninghouder verzochte lakkingen worden overgenomen.

Verder volgt de CCD de vergunninghouder in haar motivering om enkele literatuurverwijzingen niet openbaar te maken, omdat deze verwijzingen ook namen bevatten van betrokken onderzoekers.

27. NTS20172245

De vergunninghouder verzoekt om specifieke informatie te weigeren daar dit vertrouwelijke bedrijfs- en fabricagegegevens zou betreffen. Daarbij geeft zij aan dat deze informatie concurrentiegevoelig is en openbaarmaking zou leiden tot wetenswaardigheden met betrekking tot de technische bedrijfsvoering, het productieproces en de onderzoeksmethode. Verder geeft zij aan dat vroegtijdige openbaarmaking van deze informatie onevenredig benadelend zou zijn. Ook zou het belang van eerste publicatie op dit gebied en eventuele patentaanvragen hierdoor in het geding komen.

De CCD volgt de vergunninghouder in haar motivering en weigert specifieke informatie daar dit bedrijfs- en fabricagegegevens betreft. Ook is de CCD van oordeel dat vroegtijdige openbaarmaking van deze informatie onevenredig benadelend is. De documenten bevatten gedetailleerde informatie over de wijze en opzet waarop het onderzoek zal plaatsvinden, waaronder de maatvoering van gebruikte middelen die vergunninghouder zal testen en details over de soort vaten waarop operaties worden uitgevoerd. Inzicht in deze gegevens geeft concurrenten de mogelijkheid het onderzoek te reproduceren en vergunninghouder in te halen. Aannemelijk is dat openbaarmaking van deze informatie leidt tot wetenswaardigheden met betrekking tot de technische bedrijfsvoering, het productieproces en de onderzoeksmethode. Ook is het aannemelijk dat eerste



publicatie en eventuele patentaanvragen hierdoor in het geding komen, met imagoschade en financiële schade tot gevolg.

De openbaarmaking van voornoemde informatie wordt geweigerd.

28. NTS20172265

De vergunninghouder verzoekt om specifieke informatie te weigeren ter bescherming van bedrijfs- en fabricagegegevens, het voorkomen van onevenredige benadeling en ter bescherming van de persoonlijke levenssfeer.

Zo verzoekt de vergunninghouder om de algemene instellingsgegevens te weigeren vanwege de herleidbaarheid naar de betrokken onderzoekers. De vergunninghouder motiveert dat wanneer zichtbaar is waar het onderzoek plaatsvindt (welke universiteit/afdeling), vrij gemakkelijk te achterhalen is welke onderzoekers betrokken zijn gezien het zeldzame karakter van de onderzochte stofwisselingsziekte en de experimentele behandeling daarvan. De CCD is van oordeel dat de vergunninghouder, met betrekking tot de algemene instellingsgegevens, in voldoende mate de herleidbaarheid naar de betrokken onderzoekers heeft aangetoond. De algemene instellingsgegevens zullen worden geweigerd ter bescherming van de persoonlijke levenssfeer en ter voorkoming van onevenredige benadeling.

Verder verzoekt de vergunninghouder om specifieke informatie te weigeren waaruit de onderzoeksstrategie blijkt, omdat dit bedrijfs- en fabricagegegevens zou betreffen. Openbaarmaking van deze informatie zou daarnaast tevens onevenredig benadelend zijn. Met de wetenschap van de onderzoeksstrategie kan een derde hetzelfde onderzoek verrichten. Daarom is het volgens de vergunninghouder van groot belang om de onderzoeksstrategie niet openbaar te maken, mede ter bescherming van een geldstroomverstrekker. Ook veroorzaakt vroegtijdige openbaarmaking van deze informatie problemen voor eerste publicatie en eventuele patentaanvragen, met imagoschade en financiële schade tot gevolg.

De CCD acht onvoldoende onderbouwd dat er sprake is van bedrijfs- en fabricagegegevens. Het is niet inzichtelijk dat de informatie in de betreffende onderdelen van de documenten, afzonderlijk en in onderlinge samenhang beschouwd, zijn aan te merken als concurrentiegevoelige bedrijfsinformatie, waarvan openbaarmaking leidt tot wetenswaardigheden met betrekking tot de technische bedrijfsvoering of het productieproces, dan wel met betrekking tot de afzet van de producten of de kring van afnemers en leveranciers.

Wel is de CCD van oordeel dat er sprake is van concurrentiegevoelige informatie waarbij het belang van openbaarmaking van deze gegevens niet opweegt tegen de onevenredige bevoordeling of benadeling. De door vergunninghouder aangegeven informatie – dit betreft diverse passages en termen – worden op laatstgenoemde grond geweigerd.

Verder volgt de CCD de vergunninghouder in haar motivering om enkele literatuurverwijzingen niet openbaar te maken, omdat deze verwijzingen ook namen bevatten van betrokken onderzoekers.

29. NTS20172284

De vergunninghouder verzoekt om, met uitzondering van de NTS, geen verdere documenten te openbaren, daar in de documenten vertrouwelijke en bedrijfsgevoelige informatie is opgenomen. Daarbij benoemt de vergunninghouder diverse uitzonderingsgronden, waaronder uitzonderingsgronden waarvan in paragrafen 7.2 en 7.4. van dit besluit is gemotiveerd waarom geen informatie op deze gronden wordt geweigerd. De CCD gaat derhalve niet over tot weigering van alle documenten behalve de NTS.

Wel is de CCD van oordeel dat specifiek door de vergunninghouder aangewezen tekstdelen geweigerd kunnen worden, ter voorkoming van onevenredige benadeling. De vergunninghouder heeft gemotiveerd dat uit deze tekstdelen de onderzoeksstrategie blijkt, hetgeen concurrentiegevoelige informatie betreft. De CCD volgt de vergunninghouder hierin en weigert de openbaarmaking van de specifiek aangewezen tekstdelen, ter voorkoming van onevenredige benadeling.

30. NTS20172349

Naast de geweigerde persoonsgegevens en hiernaar herleidbare gegevens worden geen aanvullende gegevens geweigerd.

De vergunninghouder en DEC verwijzen in de zienswijze naar de weigeringsgronden zoals opgenomen in artikel 10, lid 1, sub d en artikel 10, lid 2, sub d van de Wob. Deze weigeringsgronden zijn echter niet van toepassing op dit Wob-verzoek. Voor de onderbouwing wordt verwezen naar paragraaf 7.4. en paragraaf 7.6. van dit besluit.

31. NTS20172364

Naast de geweigerde persoonsgegevens en hiernaar herleidbare gegevens worden geen aanvullende gegevens geweigerd.

32. NTS20172465

De vergunninghouder beargumenteert dat specifiek benoemde informatie geweigerd dient te worden ter voorkoming van onevenredige bevoordeling of benadeling. Dit betreft concurrentiegevoelige informatie over de onderzoeksstrategieën. Ook staat openbaarmaking van deze informatie eventuele patentaanvragen en eerste publicatie in de weg. Verder geeft de vergunninghouder aan dat sommige concurrenten, bij vroegtijdige openbaarmaking van specifieke informatie, de technieken hebben om de vergunninghouder in te halen. Dit acht de vergunninghouder onevenredig benadelend.

De CCD volgt de vergunninghouder in haar motivering. De onderzoeksstrategie is in hoge mate concurrentiegevoelig, aangezien concurrerende onderzoekers de informatie kunnen gebruiken voor het eigen onderzoek. Vroegtijdige openbaarmaking van deze informatie is naar het oordeel van de CCD onevenredig benadelend. Dit geldt eveneens voor vroegtijdige openbaarmaking van informatie waardoor vergunninghouder niet meer als eerste zou kunnen publiceren over haar onderzoek en patent zou kunnen aanvragen, met imagoschade en financiële schade tot gevolg. De openbaarmaking van voornoemde concurrentiegevoelige informatie wordt geweigerd.



33. NTS20172485

De vergunninghouder beargumenteert dat specifiek benoemde informatie geweigerd dient te worden ter voorkoming van onevenredige bevoordeling of benadeling. Dit betreft concurrentiegevoelige informatie over de onderzoeksstrategieën. Ook staat openbaarmaking van deze informatie eventuele patentaanvragen en eerste publicatie in de weg. Verder geeft de vergunninghouder aan dat sommige concurrenten, bij vroegtijdige openbaarmaking van specifieke informatie, de technieken hebben om de vergunninghouder in te halen. Dit acht de vergunninghouder onevenredig benadelend.

De CCD volgt de vergunninghouder in haar motivering. De onderzoeksstrategie is in hoge mate concurrentiegevoelig, aangezien concurrerende onderzoekers de informatie kunnen gebruiken voor het eigen onderzoek. Vroegtijdige openbaarmaking van deze informatie is naar het oordeel van de CCD onevenredig benadelend. Dit geldt eveneens voor vroegtijdige openbaarmaking van informatie waardoor vergunninghouder niet meer als eerste zou kunnen publiceren over haar onderzoek en patent zou kunnen aanvragen, met imagoschade en financiële schade tot gevolg. De openbaarmaking van voornoemde concurrentiegevoelige informatie wordt geweigerd.

34. NTS20172506

Naast de geweigerde persoonsgegevens en hiernaar herleidbare gegevens worden geen aanvullende gegevens geweigerd.

9. Wijze van openbaarmaking

De verwachting bestaat dat (derden)belanghebbenden bezwaar hebben tegen de openbaarmaking van de informatie. Derhalve vindt de feitelijke openbaarmaking van de documenten – conform artikel 6 lid 5 van de Wob – **niet eerder plaats dan vier weken na dagtekening van dit besluit**. Op deze wijze wordt aan deze belanghebbenden de mogelijkheid geboden om te proberen de openbaarmaking van de documenten tegen te houden.

Dit kan door het indienen van een bezwaarschrift bij de CCD én door daarnaast bij de rechtbank te verzoeken om – bij wijze van voorlopige voorziening – het onderhavige besluit tot openbaarmaking te schorsen. De documenten die met dit besluit voor eenieder openbaar worden, zullen na afloop van bovengenoemde termijn op de website van de CCD (www.centralecommissiedierproeven.nl) worden geplaatst.

Indien binnen vier weken na dagtekening van dit besluit een verzoek om voorlopige voorziening is ontvangen en een (pro forma) bezwaarschrift is ingediend, wordt de uitspraak van de voorzieningenrechter afgewacht, voordat tot daadwerkelijke openbaarmaking wordt overgegaan.

Hopende u hiermee voldoende te hebben geïnformeerd.

Hoogachtend,

De Centrale Commissie Dierproeven,
namens deze,



ir. J.F.M. Daemen
Waarnemend Algemeen Secretaris

Bezwaar

Indien u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen. Het bezwaarschrift kunt u sturen naar de Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag. Bij het indienen van een bezwaarschrift vragen wij u in ieder geval – buiten de in de wet geregelde voorschriften – de datum van de beslissing waartegen u bezwaar maakt en het onderwerp te vermelden. U vindt deze gegevens bovenaan deze brief.

Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat het bestreden besluit wel in werking treedt en geldig is. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige voorziening vragen bij de voorzieningenrechter van de rechtbank. 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 www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx kunt u zien onder welke rechtbank uw vestigingsplaats valt.

Inventaris Wob-verzoek W17-12									
nr.	documenten NTS2016705	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	Projectvoorstel				x			x	
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1				x		x	x	
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2				x		x	x	
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3				x		x	x	
7	DEC-advies				x		x	x	
8	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
9	Verzoek aanvulling aanvraag				x		x	x	
10	Reactie verzoek aanvulling				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? <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 11600 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen																
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table border="1"> <tr> <td>Naam instelling of organisatie</td> <td>Academisch Ziekenhuis Leiden</td> </tr> <tr> <td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td> <td>Leids Universitair Medisch Centrum</td> </tr> <tr> <td>KvK-nummer</td> <td>27366422</td> </tr> <tr> <td>Straat en huisnummer</td> <td>Albinusdreef 2</td> </tr> <tr> <td>Postbus</td> <td>9600</td> </tr> <tr> <td>Postcode en plaats</td> <td>2300 RC Leiden</td> </tr> <tr> <td>IBAN</td> <td>NL11DEUT0451001400</td> </tr> <tr> <td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td> <td>LUMC</td> </tr> </table>	Naam instelling of organisatie	Academisch Ziekenhuis Leiden	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	Leids Universitair Medisch Centrum	KvK-nummer	27366422	Straat en huisnummer	Albinusdreef 2	Postbus	9600	Postcode en plaats	2300 RC Leiden	IBAN	NL11DEUT0451001400	Tenaamstelling van het rekeningnummer	LUMC
Naam instelling of organisatie	Academisch Ziekenhuis Leiden																	
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	Leids Universitair Medisch Centrum																	
KvK-nummer	27366422																	
Straat en huisnummer	Albinusdreef 2																	
Postbus	9600																	
Postcode en plaats	2300 RC Leiden																	
IBAN	NL11DEUT0451001400																	
Tenaamstelling van het rekeningnummer	LUMC																	
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	<table border="1"> <tr> <td>Straat en huisnummer</td> <td>Albinusdreef 2</td> </tr> <tr> <td>Postbus</td> <td>9600</td> </tr> <tr> <td>Postcode en plaats</td> <td>2300 RC Leiden</td> </tr> <tr> <td>IBAN</td> <td>NL11DEUT0451001400</td> </tr> <tr> <td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td> <td>LUMC</td> </tr> </table>	Straat en huisnummer	Albinusdreef 2	Postbus	9600	Postcode en plaats	2300 RC Leiden	IBAN	NL11DEUT0451001400	Tenaamstelling van het rekeningnummer	LUMC						
Straat en huisnummer	Albinusdreef 2																	
Postbus	9600																	
Postcode en plaats	2300 RC Leiden																	
IBAN	NL11DEUT0451001400																	
Tenaamstelling van het rekeningnummer	LUMC																	
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1"> <tr> <td>(Titel) Naam en voorletters</td> <td rowspan="5" style="background-color: black;"></td> <td><input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters		<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.	Functie	Afdeling	Telefoonnummer	E-mailadres									
(Titel) Naam en voorletters		<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.																
Functie																		
Afdeling																		
Telefoonnummer																		
E-mailadres																		
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1"> <tr> <td>(Titel) Naam en voorletters</td> <td rowspan="5" style="background-color: black;"></td> <td><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters		<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie	Afdeling	Telefoonnummer	E-mailadres									
(Titel) Naam en voorletters		<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.																
Functie																		
Afdeling																		
Telefoonnummer																		
E-mailadres																		

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- | | |
|------------|---------------|
| Startdatum | 1 - 7 - 2017 |
| Einddatum | 30 - 6 - 2022 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Investigating the dynamic role of the TGF- β pathway in liver metastases to come closer towards therapies.
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Het onderzoeken van moleculaire en cellulaire aspecten van kanker uitzaaiingen.
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|---|
| Naam DEC | DEC Leiden |
| Postadres | [REDACTED] LUMC
Postbus 9600
2300 RC Leiden |
| E-mailadres | [REDACTED] |

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1541 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 Gemandateerd vergunninghouder

Plaats Leiden

Datum 1 - 6 - 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.

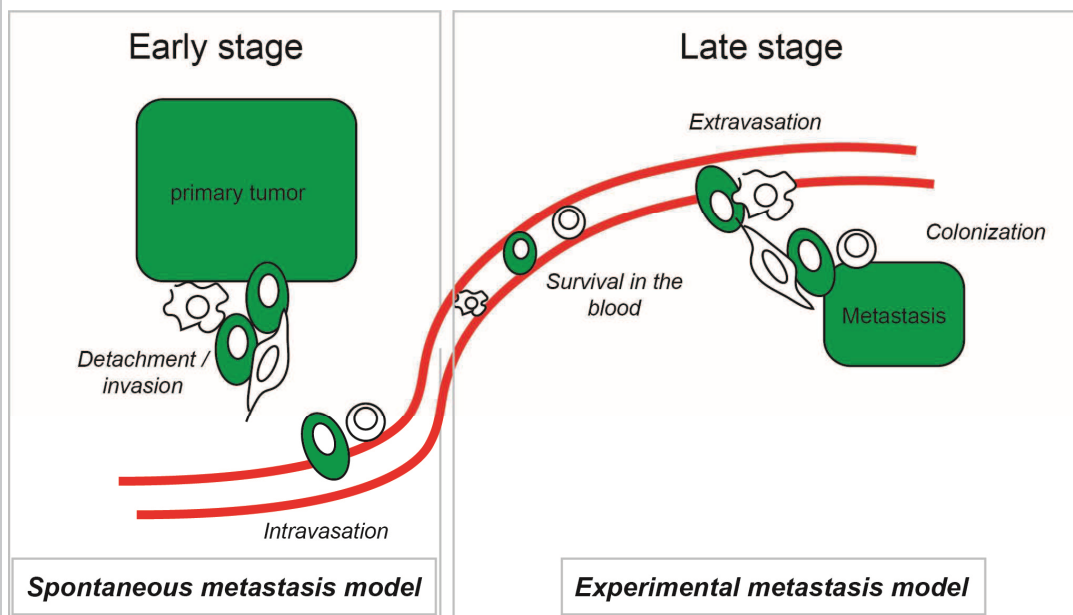
- For legally required animal procedures, indicate which statutory or regulatory requirements apply (with respect to the intended use and market authorisation).
- For routine production, describe what will be produced and for which uses.
- For higher education or training, explain why this project is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

Cancer is one of the deadliest diseases in the western world. About 40.000 patients die of cancer in the Netherlands on a yearly basis. Most of them do not die because of the primary tumor, but rather from metastases because they arise in hard to resect places. One of those places is the liver; if liver

metastases are observed, this usually results in a bad prognosis.

Breast and skin cancer patients that have liver metastases have a poor survival prognosis: on average 4 months which compares unfavourably to metastasis at other sites (Tas, J Oncol, 2012; Patanaphan et al, 1988; O'Reilly et al, 1990). Moreover, for both type of cancer patients we do not have good treatment options when liver metastases are present (Agarwala, Cancer, 2014). Therefore, we would like to better understand the regulation of metastasis colonization in the liver and how to target it with therapy.

The metastatic process is complex and can be divided in an early and late stage (see figure). In the early stage cells detach from the primary tumor, then invade the surrounding tissue and intravasate in the blood stream. In the late stage, cells survive in the blood, extravasate from the blood and colonize a distant tissue (Beerling, JCS, 2012). Sometimes, during colonization, tumor cells can enter into a dormancy state. This is a temporary phase in which the cell is not proliferating, and which can last many years to decades. It is not known how and why cancer cells switch to this state, however, once they escape from dormancy and start proliferating again, it leads to the formation of a metastasis and relapse of the patient (Sosa, NRC, 2014). For both immediate or delayed metastasis formation, the tumor microenvironment (TME) plays an important role. Factors known to play a major role in a variety of the metastatic cascade are fibroblasts, T cells, blood vessels and the extracellular matrix.



Despite all this knowledge, much of the details of this process are still unknown, which explains the lack of therapies to prevent and reduce metastases. Therefore, **a better understanding of the basic pathways that regulate this metastatic process is warranted.**

We are interested in studying the TGF- β pathway as it plays a role in metastasis, but its precise role in liver metastasis is unclear (Zhang, Trends Biochem Sci, 2013). Interestingly, depending on the cellular context, TGF- β can exert pro- and anti-tumorigenic effects (Massague, NRCMB, 2012). In cancer cells, TGF- β signalling often leads to increased migration and invasion of the tumor cells (Padua, Cell Res, 2009). Importantly, besides affecting the tumor cells themselves, TGF- β also affects the tumor microenvironment which will then affect metastasis (Pickup, NRC, 2013). For example, TGF- β activates fibroblasts which can increase tissue stiffness and tumor cell migration, and it inhibits T cell responses that would otherwise eliminate tumor cells. Recently, TGF- β components have been involved in the induction of dormancy pointing out its importance in both direct and delayed metastasis (Bragado, NCB, 2013; Ghajar, NCB, 2013; Gao, Cell, 2012). For all those reasons, TGF- β is a potentially interesting therapeutic to target the metastatic process and inhibitors are already available and used as monotherapy. However, these inhibitors showed mixed responses in humans, indicating that we lack a big part of the basic understanding of how the TGF β pathway regulates metastasis.

Therefore, the aim of this project is to better understand the role of this pathway in liver metastasis of triple negative breast cancer and metastatic melanoma (skin cancer) patients. We hypothesize that TGF- β must be regulated in a dynamic manner in order to allow for successful metastasis formation. For example, TGF- β induced migration and invasion is thought to be beneficial for the early stage of metastasis (detachment, invasion and intravasation), but is likely to be hampering the later stage of metastasis formation (outgrowth of cells in the secondary site). In this example, TGF- β should first be upregulated and later be downregulated. Similar scenarios can be envisioned with regards to the tumor microenvironment. To better understand the dynamic regulation of TGF- β during the metastatic process, it is essential to study the individual steps of metastasis, and study them in the same animal over time. Conventional studies using ex vivo analyses like immunohistochemistry provide snapshots of the tissue, and cannot study invasion, or intravasation separately. Our lab is experienced with the intravital microscopy technique (IVM) in which single tumor cells can be visualized inside a living animal over multiple days. It is the *only* platform that allows us to study dynamic processes like tumor cell migration, intravasation, extravasation, but also the growth of a metastasis over time (colonization) in an animal. It is therefore the best platform to study the dynamic role of TGF- β in breast or melanoma liver metastases.

By comparing the role of the TGF- β pathway in two very different types of cancers (breast cancer and skin cancer), we hope to identify commonalities that may help to treat all cancer patients with liver metastases. However, we also expect to identify specific differences between the two types of cancers, which might lead to tumor-type specific treatments.

3.2 Purpose

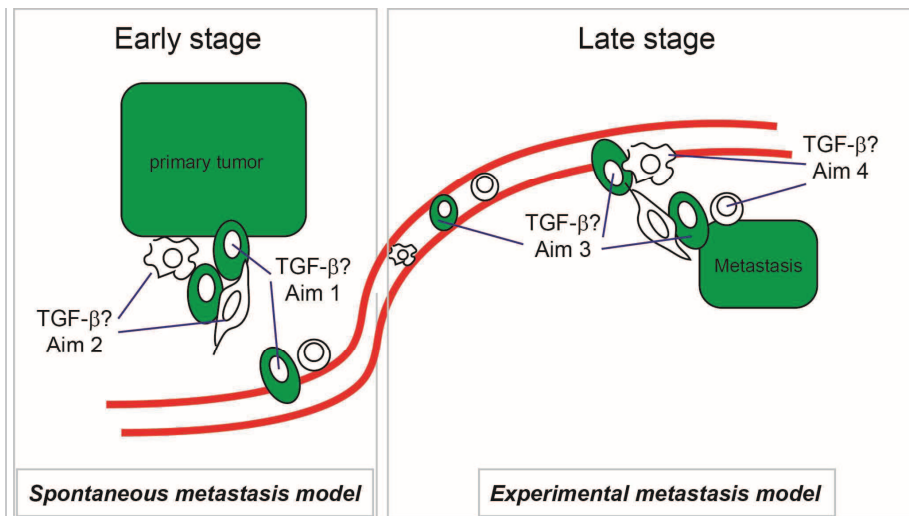
Describe the project's main objective and explain why this objective is achievable.

- 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?

TGF- β can be pro and anti-metastatic, and is known to be important during metastasis. In addition, TGF- β is known to play a major role in the tumor microenvironment. We hypothesize that TGF- β must be regulated in a dynamic manner in order to allow for successful metastasis formation. This relates to TGF- β regulation in the tumor cells and microenvironment. For example, TGF- β induced migration and invasion is thought to be beneficial for the initial stage of metastasis (invasion, intravasation and extravasation), but is likely to be hampering the later stage of metastasis formation (outgrowth of cells in the secondary site). Until now, no one has been able to study the dynamic regulation and expression of the TGF- β pathway in vivo. With IVM we are able to do this. **Thus, the goal of this project is to understand the dynamic role of the TGF- β pathway in breast and skin cancer liver metastases.**

We will achieve this goal by focussing on the following aims:

1. What is the role of TGF- β -related genes during the early stage of metastasis
 2. What is the role of TGF- β in the tumor microenvironment during the early stage of metastasis
 3. What is the role of TGF- β -related genes during the late stage of metastasis
 4. What is the role of TGF- β in the tumor microenvironment during the late stage of metastasis
-



Why is our goal achievable:

The applicant has 7 years of experience working on breast cancer (metastasis), and 3 years working on melanoma (metastasis), clearly showing expertise in these areas. Moreover, the LUMC is specialized in breast and skin cancer (melanoma), so a lot of expertise in this area is present in house (e.g. via a collaboration with a melanoma clinical specialist at LUMC). Moreover, the applying group is embedded in a department [REDACTED] that has been studying metastasis for over a decade, and has close collaborations with the groups who are experts [REDACTED]. Regarding the study of the tumor microenvironment, the applicant has 7 years of experience in this field, and the group has connections with the immunology department and experts in stromal cell biology in the LUMC. In addition, the applicant has over 6 years of experience with the IVM technique, [REDACTED]

[REDACTED] The LUMC owns a multiphoton microscope that is already used for IVM experiments, allowing us to implement the IVM platform to study liver metastasis. A collaboration with [REDACTED] in the Netherlands strengthens this expertise even more. Finally, the group has received multiple sources of funding: [REDACTED]. Altogether, we believe that this lab is perfectly situated to conduct the proposed research.

3.3 Relevance

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

Metastasis is a deadly disease, as most cancer patients do not die from a primary tumor, but rather from secondary metastases. Breast cancer and melanoma patients with liver metastases have a very bad prognosis: A median survival of 1-14 months for breast cancer patients and 4 months for melanoma patients (Tas, J Oncology, 2012). For most patients, few drugs are available that completely eliminate these metastases (Agarwala, Cancer, 2014). Limited knowledge on which pathways regulate the formation of metastasis in the liver is to blame. Thus, it is of utmost importance to study the metastatic process in its greatest detail to ultimately find drugs that eliminate metastases or prevent the formation of (liver) metastases. By studying the dynamics of the metastatic process in using new in vivo methods (intravital microscopy), we expect to find new insights that can help understand the process of liver metastasis in more detail. To be more specific, we aim to investigate the role of specific genes from the TGF-β pathway during various steps of the metastatic process. **This research will be important for the scientific community as it will show that studying metastasis in vivo in a dynamic manner offers new insights into this intriguing process (scientific relevance). Ultimately, we expect that the knowledge of the role of specific TGF-β genes in metastasis might help formulate new therapies or treatment strategies (Societal relevance).**

3.4 Research strategy

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

The goal of this project is to understand the dynamic role of the TGF- β pathway in liver metastases.

This project will answer the following aims (see also figure in section 3.2):

1. What is the role of TGF- β -related genes during the initial stage of metastasis (Appendix 1 and 3).
 2. What is the role of TGF- β in the tumor microenvironment during the initial stage of metastasis (Appendix 1 and 3).
 3. What is the role of TGF- β -related genes during the later stage of metastasis (Appendix 2 and 3).
 4. What is the role of TGF- β in the tumor microenvironment during the later stage of metastasis (Appendix 2 and 3)
- For each aim we will start by **characterizing** the metastatic potential of tumor cell lines.
 - If after characterization no cell line is available that is completely dormant in the liver (meaning the cells are alive, but not forming metastases), we will generate such a **dormant cell line** ourselves (appendix 2, experiment 2).
 - To find TGF- β related genes that are important for liver metastasis, we are performing multiple experiments among which an **in vitro screen** in which the TGF- β pathway is targeted in non-metastatic cells grown in 3D. These cells do not proliferate in 3D (they are in a non-metastatic dormant-like state), so we are screening for TGF- β -related targets that can increase proliferation and make these cells more metastatic. Hits will be verified using other in vitro assays like an apoptosis assay, invasion assay, 2D migration assay. Top hits will be verified in vivo.
 - In addition to the in vitro screen, we will also perform **RNA-seq** on metastatic versus non-metastatic metastases to identify TGF- β -related genes that might be involved in metastasis formation (appendix 2, experiment 3). Top hits will be verified in vivo.
 - Based on the in vitro results and/or RNA-seq results we will pick 3 genes for further in vivo validation. This number is based on the amount of time and people we have to perform the experiments. Moreover, experience has taught us that not every gene validates in vivo, but the chances are high at least one or two of three genes will validate. First, we will **validate the expression** of these genes in tumor or microenvironmental cells using immunohistochemistry or qPCR on tumor tissue from the characterization phase.
 - Then, we will **assess the role of TGF- β -related genes** by manipulating these genes in tumor cells (aim 1 and 2) or tumor microenvironmental cells (aim 3 and 4). We will specifically assess the role of those genes during the initial or late stage of the metastatic process.

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.

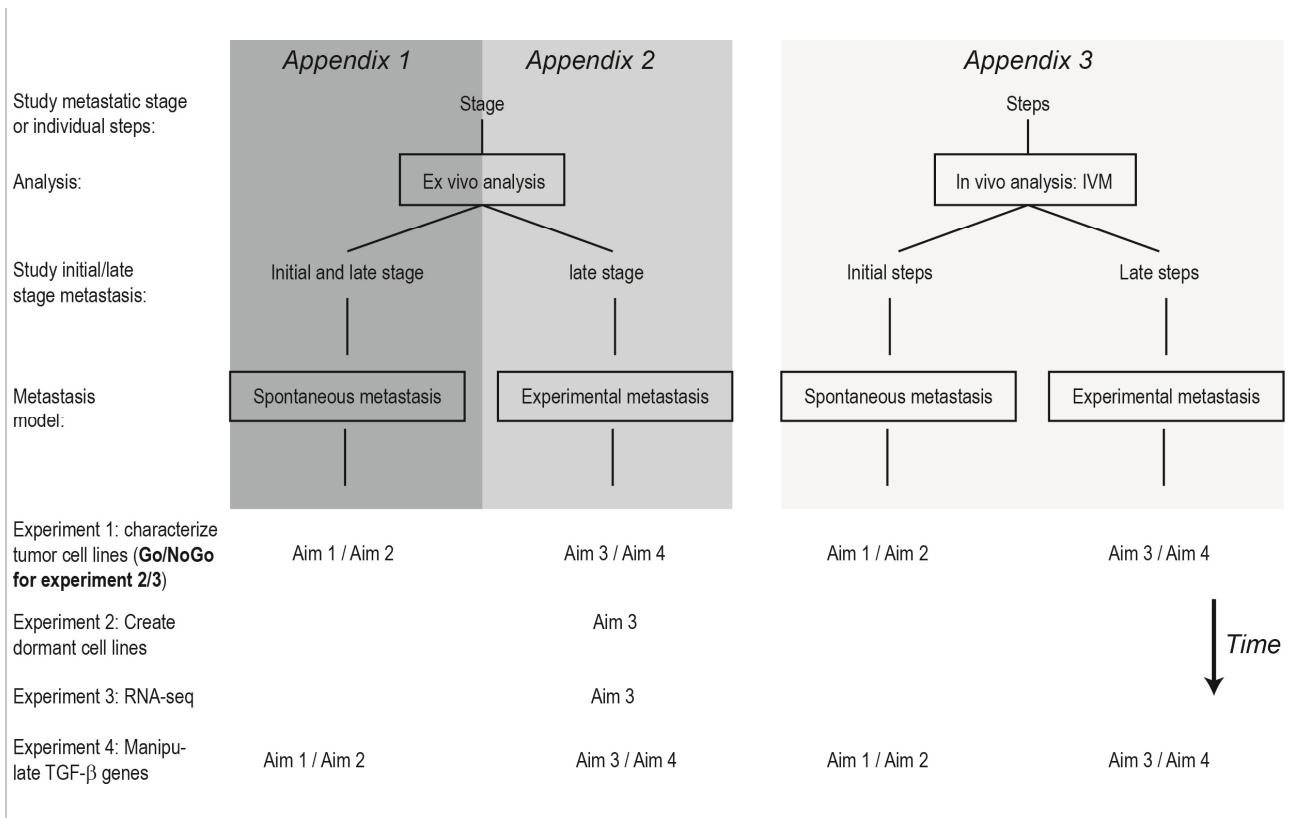
The metastatic process can be subdivided in two stages, each consisting of multiple steps: initial stage (tumor cell dissociation, migration, and intravation into the vasculature), and late stage (tumor cell survival in the blood, extravasation from the vasculature, and colonization of a distant organ). We will study the role of TGF- β -related genes during these metastatic steps using two distinct methods: ex vivo (appendix 1 and 2) and in vivo analyses (appendix 3).

Ex vivo analyses make use of immunohistochemistry on mouse tissue to study the initial or late *stage* of metastasis, as one cannot discriminate the various steps. For example, one can assess the number of metastases, size of metastases, presence of specific cell types or markers etc. Metastases will be studied using a *spontaneous model*, in which tumors are grown and one waits for the tumors to form metastases spontaneously. Ex vivo analyses on this model studies the role of TGF- β -related genes on the entire metastatic cascade, so it is not possible to pinpoint a role for a specific step (e.g. extravasation) (appendix 1). In a second model of metastasis, the *experimental metastasis model*, it is possible to study the role of TGF- β -related genes on the later stages of metastasis, as in this model the initial stage is skipped because cells are injected directly in the vasculature of mice to form metastases (appendix 2). Ex vivo analyses are important as they provide us with information on the ultimate effect TGF- β related genes have on metastasis, and it allows one to study the tissue more carefully for specific proteins or genes using for example immunohistochemistry.

In vivo analysis: A lot of the steps of metastasis are dynamic in nature. To study the role of TGF- β related genes in each *individual step*, intravital microscopy is necessary as it allows one to study these

individual steps over time in a living animal, and analyse the relationship between the various steps. Moreover, it is important to study those processes *in vivo*, as metastasis is highly dependent on the tumor microenvironment. Intravital microscopy is the *only* technique to study these processes *dynamically* at the cellular resolution in a living animal. Other imaging techniques like the often used bioluminescence technique or PET scans do not suffice as the resolution is not adequate to image single cells or small micrometastases. Using the spontaneous model, *in vivo* microscopy allows one to study tumor cell detachment from the primary tumor, migration through the surrounding tissue and intravasation in a blood vessel all in one animal. By visualizing TGF- β expression in the same tumor cell during these various steps, it becomes possible to determine the specific role for TGF- β during these steps. Using the experimental metastasis model it is possible to study the later steps of metastasis such as extravasation, niche finding and colonization of a secondary organ. These analyses allow us to study the role of TGF- β related genes on specific steps of the metastatic process, and study the dynamics during those steps (Appendix 3). Both the spontaneous metastasis model and the experimental metastasis model will be used for *in vivo* analysis.

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



We will study the role of TGF- β related genes during the early or late *stage* of metastasis (using *ex vivo* analysis) or *steps* of metastasis (using *in vivo* analysis). Early metastasis (aim 1 and 2) can be studied using the spontaneous metastasis model and late metastasis (aim 3 and 4) can be studied using the experimental metastasis model. In all aims we will start with characterizing tumor cell lines for their metastatic potential. Then we will manipulate TGF- β -related genes in tumor cells (aim 1 and 3) or tumor microenvironmental cells (aim 2 and 4) to assess their role. In this way we will be able to address the role of TGF- β related genes in early and late stage metastasis, and their role during the various initial and late steps of metastasis. Ultimately, this leads to a better understanding of the dynamic role of the TGF- β pathway in liver metastasis.

- Note that the characterization of the tumor cell lines will always be performed before TGF- β -related gene manipulation.
- The characterization in experiment 1, are a go/no go for experiment 2 and 3 in appendix 2.
- Appendix 1 and 2 will be performed before appendix 3, because the choice of cell lines in appendix 3 is based on the cell lines used in appendix 1 and 2.

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	Study <i>spontaneous</i> metastases ex vivo
2	Study <i>experimental</i> metastases ex vivo
3	Study metastases in vivo
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'.	11600	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	LUMC	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
	1	Study spontaneous metastasis ex vivo

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.

We will study the entire metastatic process (initial and late stage) using ex vivo analyses on tissues obtained from mice injected with tumor cells. We will make use of the *spontaneous metastasis model*, meaning that we will inject mice with tumor cells, wait until a tumor has formed and metastases spontaneously arise. These metastases can arise in a variety of organs, which we will collect and analyse ex vivo (for example by immunohistochemistry, qPCR, westernblot or FACS sorting). These ex vivo analyses are important as they provide us with information on the effect TGF- β -related genes have on metastasis.

We will assess the following primary outcome parameter:

- The number of metastases,

And the following secondary outcome parameters:

- Size of metastases
- Presence of specific microenvironmental cells
- Presence/absence of specific genes/proteins

Who chose this method as it is a widely-used method in cancer research and allows one to study the metastatic cascade in its entirety, mimicking the human disease as closely as possible. The applicant has over 8 years of experience with this method.

We will perform the following experiments using the spontaneous metastasis model:

1. Characterization of tumor cell lines (aim 1 and 2):

To characterize tumor cell lines, we will determine growth of the primary tumor and assess how fast and at which places metastases are forming. We will use this information to identify

timepoints at which the animals should be sacrificed for analysis in experiment 2. In addition, it allows us to determine the variation between mice to form metastases and estimate a coefficient of variation, which can be used to better estimate the number of animals required in experiment 2.

We will also use this experiment to pick the line with the best tumor/metastasis properties to study the TGF- β -related gene (for example, we might need a highly metastatic line to study a gene that reduces metastasis). We will study 3 TGF- β -related genes (see experiment 2, below) in both human and mouse lines, so we will characterize 2 mouse and 2 human lines per gene to pick the best line to study this gene. The lines will be picked based on literature, availability and our experience in working with the lines. Thus, a maximum of 12 breast cancer and 12 melanoma lines will be studied, of which half human and half mouse. This number will be less if a line will be used for more than one gene.

Why study both human and mouse lines? Lines from murine origin can be implanted in immunocompetent mice, providing data on the metastatic process in an isogenic background with an unperturbed immune system. However, contrary to mouse lines, human lines are considered to resemble disease in human patients more closely. But, as human lines cannot be studied in immunocompetent mice, but rather in immunodeficient mice that lack a proper immune system, both murine and human lines offer different insights into the biology and are therefore considered complementary. Hence, we deem it necessary to study both mouse and human lines.

2. Determine the role of TGF- β -related genes by gene manipulation in tumor cells (aim 1) or tumor microenvironmental cells (aim 2):

We will validate genes in the TGF- β pathway. Those genes have been selected for their ability to alter metastasis formation and growth in vitro. Examples are TGF- β 2 and BMP7 that induce delayed metastasis formation in vivo (Bragado et al, NBC, 2013). We are currently running an in vitro screen to identify new genes of interest. We will assess the top 3 most likely candidates from these assays for further in vivo validation, in one mouse and one human line (picked based on experiment 1). Using this experiment, we can determine the role of a TGF- β -related gene in metastasis formation. In addition, we can use the tissues containing the metastases and compare the gene manipulated vs. the non-gene manipulated using for example immunohistochemistry or qPCR to obtain more information on the mechanism by which this gene might influence metastasis formation.

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

1. Characterization of tumor cell lines:
Mice will be injected with (fluorescently labelled) tumor cells at orthotopic site (Breast cancer: mammary fat pad, melanoma: subcutaneous) in a max. volume of 200 μ l. The growth of the tumor will be followed by taking measurements at least once a week by calliper (no anesthesia is required, this will cause more discomfort than quickly (<5 mins) measuring the tumor). Mice will be sacrificed at three different time points, but before tumor reaches >2 cm^3 . This is important to establish a timeline for metastasis formation (how fast are the metastasis growing, how long does it take before tumor cells have spread to a certain organ, etc) which can be used to determine the best timepoint for analysis in experiment 2. In this experiment the organs will be harvested and used for ex vivo analyses.
2. Determine the role of TGF- β -related genes by gene manipulation in tumor cells (aim 1) or tumor microenvironmental cells (aim 2):
Mice will be injected with (fluorescently labelled)(genetically manipulated) tumor cells (aim 1) and (Fluorescently labelled)(genetically manipulated) tumor microenvironmental cells (aim 2)) at orthotopic site (Breast cancer: mammary fat pad, melanoma: subcutaneous) in a max. volume of 200 μ l. The growth of the tumor will be followed by taking measurements at least once a week by calliper (no anesthesia is required, this will cause more discomfort than quickly (<5 mins) measuring the tumor). Depending on the type of gene manipulation (see below), mice will be given doxycycline to drinking water, injected with tamoxifen i.p (max volume 150 μ l), or injected with specific drugs that inhibit our TGF- β -related gene of interest (max volume 150 μ l). Mice will be sacrificed at one time point based on experiment 1. The

organs will be harvested and used for ex vivo analyses.

Gene manipulation of tumor or microenvironmental cells:

- To study a gene of interest we will have to manipulate it, meaning overexpression, gene knockout (using e.g. CRISPR) or gene knock down (using e.g. siRNA). Depending on the process that's being studied, it might be necessary to perform inducible manipulation because the gene is essential for a certain process that is not of interest but which precedes the process of interest. Inducible manipulation during a later stage is then warranted. Inducible manipulation can be obtained using one of three systems: the Dox system, the CreERT2-lox system or using chemicals.
 - Using the Doxycycline inducible gene system, the gene of interest is under the control of a Doxycycline inducible promoter. By adding doxycycline to the water of the mouse, the gene or siRNA gets expressed. This does not lead to extra discomfort.
 - Using the CreERT2-lox inducible gene system (part of) the gene of interest is flanked by loxP sites. Upon i.p. injection of tamoxifen, CreERT2 gets activated and will recombine the loxP sites, resulting in gene expression or gene knockouts. The mouse will be i.p. injected with tamoxifen for a maximum of 2x (to get sufficient induction; max volume 150 µl). The discomfort is minimal but we still aim to give the injections simultaneously with tumor measurements (under anaesthesia) to reduce discomfort.
 - Gene manipulation can easily be obtained using drugs (chemicals) that are available from pharma companies. We will use drugs that specifically inhibit our gene of interest. To use drugs, they need to be administered s.c., i.p., i.m., or i.v. or using a slow release pump. We will opt for the least invasive method of injection if multiple drugs or routes of injection are at our disposal (slow release pump > s.c. > i.p. > i.m. > i.v.). The animals will be injected for a maximum of 10 times in 1 month's time.
- Based on available plasmids for that gene we will choose for non-inducible gene manipulation, doxycycline inducible gene manipulation, CreERT2 inducible gene manipulation or drug based inducible gene manipulation. If all methods can be used, we will opt for non-inducible gene manipulation or Dox inducible gene manipulation, because this does not lead to additional discomfort.

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

Minimise number of animals:

To minimise the number of animals used in experiment 2, we will establish a time line for tumor and metastasis growth in experiment 1 that can be used as a reference. Thus, by performing the experiment 1, we will reduce the number of animals needed in experiment 2. As experiment 2 will be performed for 3 different genes, this ultimately reduces the number of animals required.

In addition, we have the option to characterize multiple cell lines in experiment 1, so that the cell line that has the best properties to study a TGF- β -related gene can be picked in experiment 2. This ultimately reduces the number of animals.

TGF- β -related genes that will be studied in experiment 2 have already been shown to affect dormancy in vitro. Moreover, the presence of these genes in the metastatic cells or microenvironmental cells can be verified in tissues from experiment 1. Only the top 3 most promising candidates will be validated in vivo.

Statistics:

Experiment 1:

Based on experience we know that there is quite some variation (coefficient of variation approx. 25%) between animals with regards to metastases formation (Eckhardt, Mol Canc Res, 2005 / Johnstone, Dis Mod Mech, 2015). To obtain a reliable coefficient of variation in experiment 1 that can be used to calculate animal numbers for experiment 2, we will need at least 5 animals per experiment. This number of animals is based on similar experiments done by others: Eckhardt, Mol Canc Res, 2005 / Johnstone, Dis Mod Mech, 2015. However, if we obtain results that are highly variable (coefficient of variation >25%), it will increase the number of animals needed for further experiment 2, as they are based on this. Therefore, we deem it important to get a more reliable standard deviation by adding more mice.

Our lab has repeatedly performed gene manipulation experiments using the above described cell lines and often required 8 mice per experimental group [REDACTED]. Thus, we will start by using 5 animals per experiment, but can increase this number to 8 if 5 has a standard deviation that is >25%.

Experiment 2:

Our primary outcome parameters will be "number of metastases". We will use the coefficient of variation calculated in experiment 1. We used data from a previous experiment that was comparable to what we are expecting to get now [REDACTED] in order to derive realistic values for the size of the variability in the data and the treatment/intervention effect. In particular, a linear mixed effects model have been fitted on the log-transformed sizes of tumors (R package lme4, Bates et al 2015). The transformation has been applied due to skewness in the raw data. Next we computed the sample size needed to detect a 82% relative decrease in the tumor size in the manipulated group vs the non-manipulated group with 80% power. The computation has been done via simulation and using the values from [REDACTED]. **We found that 10 mice per group needed in this case.**

B. The animals

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

Species: *Mus musculus*.

For BC mouse lines BALB/c: isogenic background.

For BC human lines: Immunodeficient mice (to enable xenografting).

For MM mouse lines C57/Bl6: isogenic background.

for MM human lines: Immunodeficient mice (to enable xenografting).

For all breast cancer studies we will make use of female mice exclusively, because breast cancer mainly occurs in females. Moreover, we focus on triple negative breast cancers, whereas males predominantly get ER⁺ breast cancer, suggesting that our results would not be applicable to the male population. In case of melanoma, males are more likely to cause infarctions of the tumors (tumors become unusable) because they are more aggressive. Thus, using males would require us to house the mice in solitary, causing more discomfort, or use more mice to account for the loss of some tumors. As such, we have decided to use female mice for our melanoma research.

Origin: LUMC or external licenced breeders like Jackson labs and Charles River.

Life stages: Between 8-12 weeks old, this is based on literature. Also, at 8 weeks the mammary fat pads are fully grown and developed.

Estimated number for each experiment (calculations are done based on the maximum number of 8 mice, but are estimated to be performed with only 5 mice, see statistics. Moreover, calculations are based on experiments being performed for all cell lines, but are estimated to be performed for only half of them):

1. Breast cancer (BC): 8 mice x 3 time points x 12 tumor lines (6 mouse, 6 human, see part A) x 2 aims (1 and 2) = 576 mice. Melanoma skin cancer (MC): 8 mice x 3 time points x 12 tumor lines (6 mouse, 6 human, see part A) x 2 aims (1 and 2) = 576 mice. Total (BC and MC): 1152 mice.
2. BC: 10 mice x 2 experimental groups (manipulated vs not manipulated) x 2 tumor lines (1 mouse, 1 human) x 3 genes x 2 aims (1 and 2) = 240 mice. MC: 10 mice x 2 experimental groups (manipulated vs not manipulated) x 2 tumor lines (1 mouse, 1 human) x 3 genes x 2 aims (1 and 2) = 240 mice. Total (BC and MC): 480 mice.

Combined: 1152 + 480 = 1632 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: We have replaced animal experiments by performing initial experiments in vitro. However, to study the different steps of metastasis we cannot use in vitro data because we need an intact animal with the various organs to be able to study the metastases in these organs.

Reduction: The experiments described in experiment 1 are condition finding. Hence, the data obtained in experiment 1 will be used as a guide for experiment 2. For example, it will inform us on the coefficient of variation for the measured parameters, which will be helpful for a better estimation of the number of animals required for experiments 2, thereby reducing the number of animals.

Refinement: By making use of female mice, the animals can be housed in groups. In addition, when we will manipulate genes, we will opt for the least invasive method: slow release pump > s.c. > i.p. > i.m > i.v.. This reduces discomfort for the animals as much as possible.

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

1. Tumor measurements will be performed by experienced researchers without the need for anaesthesia, which would cause more discomfort (fear/stress).
2. There are no adverse effects on the environment; all animals will be housed under strict D1 conditions.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

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.

Adequate short-term anaesthesia (<5 mins) will be used during the injection of tumor cells in the mammary fat pad. It will be performed by trained researchers only.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

The animals may experience mild discomfort from the injection of tumor cells and therapeutic compounds, tumor measurements and anaesthesia.

Explain why these effects may emerge.

The injection or anaesthesia induction can cause mild discomfort to the animal.

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

The anaesthesia will be performed as short as possible by an experienced researcher. For measuring tumor growth and injection of cells in the fat pad < 5 mins.

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.

In all cases we will use criteria according to the code of practice Animals in Cancer Research. In case of tumor/metastases growth and/or window implantation, these are: severe loss of body weight (monitoring every other day based on body conditioning score), severe circulation or breathing problems, changes in behavior (posture, general signals of severe sickness or discomfort), severe clinical appearance of tumor (ulceration, growth hampering mobility, swollen abdomen), a total tumor mass that is too big (>2 cm³).

Indicate the likely incidence.

< 1%

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 mice will experience short-term discomfort from injections or tumor measurements. All these procedures are assigned to the category: Mild

Description	Animal species/strain and sex	Number of animals	Discomfort (expected cumulative discomfort)	Discomfort is a sum of following procedures
Experiment 1/2	-Mus musculus. -BALB/c, C57/Bl6, immunodeficient mice. -Female.	1632	Mild 100%	Tumor cell injections, tumor/metastasis growth, tumor measurements by calliper, if necessary injections for drugs to manipulate genes
			Moderate 0%	
			Severe 0%	
		Total	100%	

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

The animals will have tumors and metastases. If the experiment is finished the animals will have to be sacrificed because otherwise the tumors/metastases will keep growing. Moreover, the organs will be used for further analyses using immunohistochemistry to determine cellular and molecular aspects of tumor/metastasis growth.

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'.	11600	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	LUMC	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
	2	Study experimental metastasis ex vivo

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.

We will study the late stage of the metastatic process using ex vivo analyses on tissues obtained from mice injected with tumor cells. We will make use of the *experimental metastasis model*, meaning that we will inject mice with melanoma or breast cancer cells directly in mesenteric vein or spleen. Cells will then rapidly reach the liver, extravasate and form metastases. No primary tumor formation is involved in this assay, and therefore we will only study the later stage of metastasis. The livers will be collected and analysed ex vivo (for example by immunohistochemistry, qPCR, westernblot or FACS sorting). These ex vivo analyses are important as they provide us with information on the effect TGF- β -related genes have on metastasis.

We will assess the following primary outcome parameter:

- Hepatic replacement area (the total area of liver that is replaced by metastases)

And the following secondary outcome parameters:

- The number of metastases,
- Size of metastases,
- Presence of specific microenvironmental cells
- Presence/absence of specific genes/proteins

We chose this method as it is a widely-used method in cancer research and allows us to study the late stage of the metastatic cascade. As such, it becomes easier to attribute a role for genes in this part of metastatic process. Moreover, the use of this model is essential in metastasis research because often gene manipulation will result in differences in primary tumor growth, making it impossible to study the effect of this gene on metastasis in the spontaneous tumor model; the experimental metastasis model offers a solution because the tumor cells are injected into the vasculature so there is no primary tumor.

We have over 8 years of experience with this method.

We will perform the following experiments using the experimental metastasis model:

1. Characterization of tumor cell lines (aim 3 and 4):
To characterize tumor cell lines, we will assess how fast and how many metastases are forming. We will use this information to identify time points at which the animals should be sacrificed for analysis in experiment 2. In addition, it allows us to determine the variation between mice to form metastases and estimate a coefficient of variation, which can be used to better estimate the number of animals required in experiment 2.
Similar to appendix 1, we will study a maximum of 12 breast cancer and 12 melanoma lines, of which half human and half mouse. The experiment will be performed for aim 3 and aim 4. For more information on the numbers see appendix 1.
2. Create a new dormant cell line (aim 3):
Here we have the option of generating a new dormant non-metastatic cell line. This is necessary to study the process of tumor cells awakening from dormancy and forming metastases (by characterizing this cell line (experiment 1), and later by using it to study the effect of gene manipulation on the escape of tumor cells from dormancy (experiment 4)). The currently available cell lines have been shown to have dormant characteristics in some reports, but not in others. Thus, if the cells are not completely dormant and non-metastatic, we will generate dormant non-metastatic lines derived from the parental line by repeatedly isolating the dormant cells from the liver using FACS sorting and reinjecting them in donor mice. This method selects for cells with dormant properties and has been shown to work (de Cock, Cancer Research, 2016). Moreover, we have experience with isolating live cells from organs. This experiment will only be performed if the results in experiment 1 show that the cells are not completely dormant (go/no go). In case of melanoma there are no dormant lines, so we will have to generate them anyway. It will be performed only for 1 human and 1 mouse cell line, as we will continue with just 1 human and 1 mouse cell line in the next experiments.
3. Isolate cells for RNA-seq (aim 3):
To identify TGF- β related genes that are important for metastasis in an unbiased manner we will use the experimental metastasis model to create liver metastases which we will isolate using FACS sorting and process for RNA-seq. We will compare cells from metastases that were growing rapidly (highly metastatic) versus cells from metastases that were not growing rapidly (non-metastatic) using a method that has been described in de Cock, Cancer Research, 2016. This experiment will only be performed if the results in experiment 1 show that there are cell lines that show huge differences in metastatic outgrowth of tumor cells within a single animal (go/no go). It will be performed in one mouse and one human line, for both Breast cancer and melanoma.
4. Determine the role of TGF- β -related genes by gene manipulation in tumor cells (aim 3) or tumor microenvironmental cells (aim 4):
Using this experiment, we can determine the role of a TGF- β -related gene in the *late* stage of metastasis formation. In addition, we can use the tissues containing the metastases and compare the gene manipulated vs. the non-gene manipulated using for example immunohistochemistry or qPCR to obtain more information on the mechanism by which this gene might influence metastasis formation. The experiment will be performed twice (for aim 3, manipulating TGF- β related genes in the tumor cells, and for aim 4, manipulating TGF- β related genes in the tumor microenvironmental cells). We will validate genes in the TGF- β pathway (see appendix 1 for an explanation on how the genes were selected). We will assess the top 3 most likely candidates from these assays for further in vivo validation, in one mouse and one human line (picked based on experiment 1).

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

1. Characterization of tumor cell lines:
Mice will be injected with (fluorescently labelled) tumor cells in the mesenteric vein or spleen in a max. volume of 100 ul. In this way, the liver is the first capillary network the tumor cells encounter where they get stuck and grow out to form liver metastases. Mice will be sacrificed at three different time points to establish a timeline for metastasis formation (how fast are the metastasis growing, what is the take rate of cells that grow out into a metastasis etc) which can be used to determine the best timepoint for analysis in experiments 2-4. In this experiment the organs will be harvested and used for ex vivo analyses.
2. Create a new dormant cell line:
Similar to experiment 1, but mice will only be sacrificed at one timepoint when dormant cells are still present (based on experiment 1). The liver will be harvested, dissociated, and dormant tumor cells will be isolated and injected into a new donor mouse (again intrasplenically or intramesenterically). By repeating this process 10 times a dormant cell line can be generated (de Cock, Cancer Research, 2016).
3. Isolate cells for RNA-seq:
Similar to experiment 1, but mice will only be sacrificed at one timepoint when big differences between metastatic outgrowth are still present (based on experiment 1). The liver will be harvested, dissociated, and fluorescent tumor cells will be isolated using FACS sorting (de Cock, Cancer Research, 2016). Then, RNA will be extracted for sequencing.
4. Determine the role of TGF- β -related genes by gene manipulation in tumor cells (aim 3) or tumor microenvironmental cells (aim 4):
Mice will be injected with (fluorescently labelled)(genetically manipulated) tumor cells (aim 3) and (Fluorescently labelled)(genetically manipulated) tumor microenvironmental cells (aim 4)) in the mesenteric vein or spleen in a max. volume of 200 ul. Depending on the type of gene manipulation (see appendix 1), mice will be given doxycycline to drinking water, injected with tamoxifen i.p (max volume 150 ul), or injected with specific drugs that inhibit our TGF- β -related gene of interest (max volume 150 ul). Mice will be sacrificed at one time point based on experiment 1. The organs will be harvested and used for ex vivo analyses like immunohistochemistry and qPCR.

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

Minimise number of animals:

To minimise the number of animals used in experiment 2-4, we will establish a time line for metastasis growth in experiment 1 that can be used as a reference. Thus, by performing experiment 1, we will reduce the number of animals needed in experiment 2 because we will only need to sacrifice the animals at 1 timepoint. As experiment 4 will be performed for 3 different genes, this ultimately reduces the number of animals required.

The same argument can be made for the characterization of multiple cell lines in experiment 1. By doing this, the cell line that has the best properties to study a TGF- β -related gene can be picked in experiment 2-4. This ultimately reduces the number of animals.

Statistics:

Experiment 1:

See appendix 1. We need a maximum of **8 mice** per cell line.

Experiment 2:

To generate a dormant cell line, cells have to be injected in 10 successive mice (see protocol de Cock, Cancer Research, 2016). So, we need **10 mice** per cell line.

Experiment 3:

To obtain enough cells from the non-metastatic clone to perform RNA-seq, we will need to pool the cells

from 3 mice. Moreover, for RNA-seq, at least 2 biological repeats should be performed. Hence, we need **6 mice** per cell line.

Experiment 4:

Our primary outcome parameter is hepatic replacement area. We will use the coefficient of variation calculated in experiment 1. We used data from a previous experiment that was comparable to what we are expecting to get now (Sci transl Med, 2012) in order to derive realistic values for the size of the variability in the data and the treatment/intervention? effect. In particular, we computed the sample size needed to detect an effect size of 2 between the manipulated and the non-manipulated groups with 80% power using the function `pwr.t.test` in the R package `pwr` (Champely, 2016). **We found that 5 mice per group are needed in this case.**

B. The animals

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

Species: *Mus musculus*.

For BC mouse lines BALB/c: isogenic background.

For BC human lines: Immunodeficient mice (to enable xenografting).

For MM mouse lines C57/Bl6: isogenic background.

for MM human lines: Immunodeficient mice (to enable xenografting).

For all breast cancer studies we will make use of female mice exclusively, because breast cancer mainly occurs in females. Moreover, we focus on triple negative breast cancers, whereas males predominantly get ER⁺ breast cancer, suggesting that our results would not be applicable to the male population. In case of melanoma, males are more likely to cause infractions of the tumors (tumors become unusable) because they are more aggressive. Thus, using males would require us to house the mice in solitary, causing more discomfort, or use more mice to account for the loss of some tumors. As such, we have decided to use female mice for our melanoma research.

Origin: LUMC or external licenced breeders like Jackson labs and Charles River.

Life stages: Between 8-12 weeks old, this is based on literature. Also, at 8 weeks the mammary fat pads are fully grown and developed.

Estimated number for each experiment:

1. Breast cancer (BC): 8 mice x 3 time points x 12 tumor lines (6 mouse, 6 human, see part A) x 2 aims (aim 3 and 4) = 576 mice. Melanoma skin cancer (MC): 8 mice x 3 time points x 12 tumor lines (6 mouse, 6 human, see part A) x 2 aims (aim 3 and 4) = 576 mice. Total (BC and MC): 1152 mice. * Less mice might be used if similar cell lines are used to study multiple genes.
2. BC: 10 mice x 2 tumor lines (1 mouse, 1 human) = 20 mice. MC: 10 mice x 2 tumor lines (1 mouse, 1 human) = 20 mice. Total (BC and MC) = 40 mice.
3. BC: 6 mice x 2 tumor lines (1 mouse, 1 human) = 12 mice. MC: 6 mice x 2 tumor lines (1 mouse, 1 human) = 12 mice. Total (BC and MC): 24 mice.
4. BC: 5 mice x 2 experimental groups (manipulated vs not manipulated) x 2 tumor lines (1 mouse, 1 human) x 3 genes x 2 aims (3 and 4) = 120 mice. MC: 5 mice x 2 experimental groups (manipulated vs not manipulated) x 2 tumor lines (1 mouse, 1 human) x 3 genes x 2 aims (3 and 4) = 120 mice. Total (BC and MC): 240 mice.

Combined: 1152 + 40 + 24 + 240 = 1456 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: We have replaced animal experiments by performing initial experiments in vitro. However, to study the different steps of metastasis we cannot use in vitro data because we need an intact animal with the various organs to be able to study the metastases in these organs.

Reduction: The experiments described in experiment 1 are condition finding. Hence, the data obtained in experiment 1 will be used as a guide for experiment 2-4. For example, it will inform us on the coefficient of variation for the measured parameters, which will be helpful for a better estimation of the number of animals required for experiments 2-4, thereby reducing the number of animals.

In addition, experiment 2 and 3 are go/no go and will only be performed if experiment 1 shows that it is necessary or possible to perform those experiments.

Refinement: By making use of female mice, the animals can be housed in groups. In addition, when we will manipulate genes, we will opt for the least invasive method: slow release pump > s.c. > i.p. > i.m > i.v.. This reduces discomfort for the animals as much as possible.

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

1. Animals will be monitored intensively after receiving surgery to inject the tumor cells. Before start of the surgery the animals will receive pain killers. Moreover, animals will be monitored on a daily basis by the animal caretakers and at least once a week by the researcher to look for signs of distress caused by tumor growth.
2. There are no adverse effects on the environment; all animals will be housed under strict D1 conditions.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

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.

Adequate anaesthesia will be used during the injection of tumor cells in the mesenteric vein or spleen. The animals will be a pain killer before surgery.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

The animals may experience mild discomfort from the injection of therapeutic compounds.

Explain why these effects may emerge.

The injection can cause mild discomfort to the animal.

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

The injection of the compound will be performed by an experience researcher, without anaesthesia, as this will cause more distress than a short injection.

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.

In all cases we will use criteria according to the code of practice Animals in Cancer Research. In case of tumor/metastases growth these are: severe loss of body weight (monitoring every other day based on body conditioning score), severe circulation or breathing problems, changes in behavior (posture, general signals of severe sickness or discomfort), severe clinical appearance of tumor (ulceration, growth hampering mobility, swollen abdomen), a total tumor mass that is too big ($>2 \text{ cm}^3$).

Indicate the likely incidence.

< 1%

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 injection of tumor cells in the mesenteric vein or spleen is assigned to the category: Moderate.

Description	Animal species/strain and sex	Number of animals	Discomfort (expected cumulative discomfort)	Discomfort is a sum of following procedures
			Mild 0%	
Experiment 1/2/3/4	-Mus musculus. -BALB/c, C57/Bl6, immunodeficient mice. -Female.	1456	Moderate 100%	Tumor cell injections in spleen or mesenteric vein, metastasis growth, if necessary injections for drugs to manipulate genes.
			Severe 0%	
		Total	100%	

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

The animals will have metastases. If the experiment is finished the animals will have to be sacrificed because otherwise the metastases will keep growing. Moreover, the organs will be used for further analyses using immunohistochemistry to determine cellular and molecular aspects of metastasis growth.

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'.	11600	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	LUMC	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number 3	Type of animal procedure Study metastasis in vivo

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.

We will study individual steps of the entire metastatic process (early and late stage) using *in vivo* analyses on tissues obtained from mice injected with tumor cells. It is important to study the individual steps of metastasis because we expect that TGF- β -related proteins might be differentially regulated in each of the steps. The only method to study the individual steps of metastasis *in vivo* is using intravital microscopy.

We will make use of the *spontaneous metastasis model in combination with intravital microscopy* to study the early steps of metastasis (detachment, invasion, intravasation) by imaging individual tumor cells over time. This allows us to measure parameters like cell speed, plasticity, directionality etc, which are all important for metastasis.

We will also make use of *the experimental metastasis model in combination with intravital microscopy* to study the late steps of metastasis (Survival in the blood, extravasation, colonization). By imaging individual tumor cells over time, we can measure cell migration, but also cell proliferation/cell doubling, which is important for colonization.

We chose this method as it is the *only* method to study cells at the single level inside a living animal, and as such it is the *only* method to study the individual steps of the metastatic cascade. The applicant has over 8 years of experience with this method.

We will perform the following experiments using the spontaneous metastasis and the experimental metastasis model for aim 1 - 4:

1. Characterization of tumor cell lines (aim 1-4):

To characterize tumor cell lines, we will assess tumor cell migration and intravasation in the

primary tumor (using the spontaneous model and intravital microscopy) and survival in the blood, extravasation and colonization (using the experimental model and intravital microscopy). This allows us to determine the variation between mice and estimate a coefficient of variation, which can be used to better estimate the number of animals required in experiment 2. We will study 3 TGF- β -related genes (see experiment 2, below) in both human and mouse lines, so we will characterize 2 mouse and 2 human lines per gene to pick the best line to study this gene. The lines will be picked based on experiments performed in appendix 1 and 2. Thus, a maximum of 2 breast cancer and 2 melanoma lines will be studied, of which half human and half mouse.

Why study both human and mouse lines? See appendix 1

2. Determine the role of TGF- β -related genes by gene manipulation in tumor cells (aim 1/3) or tumor microenvironmental cells (aim 1-4):

We will validate genes in the TGF- β pathway (see appendix 1 for an explanation on how the genes were selected). We will assess the top 3 most likely candidates from these assays for further in vivo validation, in one mouse and one human line (picked based on experiment 1). Using this experiment, we can determine the role of a TGF- β -related gene in *each individual step* of the metastasis process. The spontaneous assay and the experimental assay will be performed twice (manipulating TGF- β related genes in the tumor cells, and manipulating TGF- β related genes in the tumor microenvironmental cells).

3. Training:

The success of this project is for a large part dependent on the successful execution of intravital microscopy (IVM). Surgery comprises an important part of IVM, and proper execution of this surgery is vital for the experiment and determines for a large part the discomfort of the animal. Therefore, we deem it necessary to practise these procedures with new labmembers before allowing them to perform these types of experiments. It is essential that all researchers who will perform IVM will learn the techniques because it is essential surgeries are done at a certain stage or time. Hence, it is not possible to have a single dedicated member doing all the procedures. Each new lab member will learn intrasplenic/intramesenteric injections, short-term IVM, long-term IVM. Depending on the experience of the researcher with microsurgeries, more or less animals will be used; however, for each trainee a maximum number of animals is given that should not be exceeded. A training will be finished if the procedure can be performed successfully and within a certain time limit without the help of an experienced supervisor. This will be assessed by an independent researcher.

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

1. Characterization of tumor cell lines:

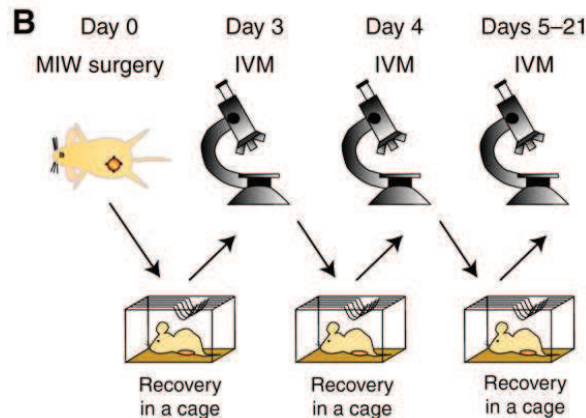
For this experiment, we will only use cell lines that have been selected for use in appendix 1 and 2. Hence, it reduces the number of cell lines to characterize to 1 human and 1 mouse line for both breast cancer and melanoma.

Spontaneous metastasis model. Mice will be injected with fluorescently labelled tumor cells at orthotopic site (Breast cancer: mammary fat pad, melanoma: subcutaneous) in a max. volume of 200 μ l. The growth of the tumor will be followed by taking measurements at least once a week by calliper (no anesthesia is required, this will cause more discomfort than quickly (<5 mins) measuring the tumor). Short and long-term intravital microscopy will be performed (see explanation below) on the primary tumor before tumor reaches >2 cm^3 (timepoint based on appendix 2, experiment 1). This is important to determine which cell line can best be used for analysis in in experiment 2. After intravital microscopy the organs will be harvested and used for ex vivo analyses.

Experimental metastasis model. Mice will be injected with fluorescently labelled tumor cells in the mesenteric vein or spleen in a max. volume of 100 μ l. Short and long-term intravital microscopy will be performed (see explanation below) on the liver metastases (timepoint based on appendix 2, experiment 1). This is important to determine which cell line can best

be used for analysis in in experiment 2. After intravital microscopy the organs will be harvested and used for ex vivo analyses.

2. Determine the role of TGF- β -related genes by gene manipulation in tumor cells (aim 1/3) or tumor microenvironmental cells (aim 2/4):
Spontaneous metastasis model. Mice will be injected with fluorescently labelled (genetically manipulated) tumor cells (aim 1/3) and (Fluorescently labelled)(genetically manipulated) tumor microenvironmental cells (aim 2/4)) at orthotopic site (Breast cancer: mammary fat pad, melanoma: subcutaneous) in a max. volume of 200 μ l. The growth of the tumor will be followed by taking measurements at least once a week by calliper (no anesthesia is required, this will cause more discomfort than quickly (<5 mins) measuring the tumor). Depending on the type of gene manipulation (see appendix 1), mice will be given doxycycline to drinking water, injected with tamoxifen i.p (max volume 150 μ l), or injected with specific drugs that inhibit our TGF- β -related gene of interest (max volume 150 μ l). Short and long-term intravital microscopy will be performed (see explanation below) on the primary tumor before tumor reaches >2 cm^3 . The organs will be harvested and used for ex vivo analyses. This experiment allows us to assess the role of TGF- β related genes in specific steps of the early metastatic cascade.
Experimental metastasis model. Same as for spontaneous model, except that cells will be injected in the mesenteric vein or spleen, and imaging will be performed on the liver. This experiment allows us to assess the role of TGF- β related genes in specific steps of the latey metastatic cascade.
3. Training animals:
Procedures are similar to experiment 1.
 - Short and long-term intravital microscopy
Intravital microscopy, meaning visualization of single fluorescent cells in living animals, will be used to study the individual steps of the metastatic cascade in vivo. Intravital microscopy can be performed short-term or long-term.
Short-term (< 24 hours): Mice are anesthetized, the organ/tumor gets exposed and imaged on the microscope. This is a terminal procedure: after imaging the mouse is sacrificed. This procedure is used for assessing for example tumor cell migration or extravasation.
Long-term (max 28 days): Mice are anesthetized and an imaging window will be implanted on top of the tumor/organ. The tumor cells can be visualized on the microscope through the imaging window. After imaging the mouse will recover in its cage. By repeating this process over multiple days, processes that take more than one day can be visualized (see figure below). For example, long-term migration, proliferation, and formation of micrometastases. Both methods are required to be able to study all of the different steps of metastasis. We have a lot of expertise in both intravital microscopy methods (> 6 years) and have developed various methods to perform intravital microscopy [REDACTED]



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

Minimise number of animals:

By performing characterization in experiment 1, we can determine a more reliable coefficient of variation to make a better estimate of the required number of animals to get statistically significant data in experiment 2.

In this appendix, we will only use cell lines that have been selected for use in appendix 1 and 2. Hence, it reduces the number of cell lines to characterize, and therefore it also reduces the number of animals.

Furthermore, by performing long-term IVM, we can study the same process over time in the same animal. Ultimately, this reduces the number of animals required for these kind of experiments, because we don't have to sacrifice multiple animals at various time points.

In the training animals, we chose to combine the teaching of intrasplenic/intramesenteric vein injections and intravital microscopy in the same animal, as it will reduce the number of animals required for teaching purposes. Moreover, a competent supervisor will ensure proper training of the new labmember; if the new labmember is deemed sufficiently trained by the supervisor with fewer animals than the maximum requested, the other animals will not be used.

Statistics:

Experiment 1:

See appendix 1. We need a maximum of **8 mice** per cell line.

Experiment 2:

We used data from a previous experiment that was comparable to what we are expecting to get now (Sci Transl Med, 2012) in order to derive realistic values for the size of the variability in the data and the treatment/intervention effect. In particular, a linear mixed effects model have been fitted on the log-transformed migration speed (R package lme4, Bates et al 2015). The transformation has been applied due to skewness in the raw data. Next we computed the sample size needed to detect a 55% relative decrease in the migration speed in the manipulated group vs the non-manipulated group with 80% power. The computation has been done via simulation and using the values from the experiment of (Sci Transl Med, 2012). **We found that 6 mice per group needed in this case.**

Experiment 3:

From experience, we know that ~10 animals are required to learn intrasplenic/intramesenteric injections, ~5 animals are required to learn the skinflap procedure (short-term IVM), and ~8 animals are required to learn the window procedure (long-term IVM). So, 10 animals for short term-IVM and 10 animals for long-term IVM should be sufficient. If the labmembers are not deemed sufficiently trained after exceeding this number of animals, the members will not be allowed to perform the surgery.

We estimate that we will have to train 5 new labmembers. If this number is not met, the other animals will not be used.

B. The animals

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

Species: *Mus musculus*.

For BC mouse lines BALB/c: isogenic background.

For BC human lines: Immunodeficient mice (to enable xenografting).

For MM mouse lines C57/Bl6: isogenic background.

for MM human lines: Immunodeficient mice (to enable xenografting).

For all breast cancer studies we will make use of female mice exclusively, because breast cancer mainly occurs in females. Moreover, we focus on triple negative breast cancers, whereas males predominantly get ER⁺ breast cancer, suggesting that our results would not be applicable to the male population. In case of melanoma, males are more likely to cause infirmities of the tumors (tumors become unusable) because they are more aggressive. Thus, using males would require us to house the mice in solitary, causing more discomfort, or use more mice to account for the loss of some tumors. As such, we have decided to use female mice for our melanoma research.

Origin: LUMC or external licenced breeders like Jackson labs and Charles River.

Life stages: Between 8-12 weeks old, this is based on literature. Also, at 8 weeks the mammary fat pads are fully grown and developed.

Estimated number for each experiment:

1. Breast cancer (BC): 8 mice x 2 tumor lines (1 mouse, 1 human, see part A) x 2 methods (spontaneous and experimental) x 2 IVM (short and long-term) x 4 aims = 256 mice. Melanoma skin cancer (MC): 8 mice x 2 tumor lines (1 mouse, 1 human, see part A) x 2 methods (spontaneous and experimental) x 2 IVM (short and long-term) x 4 aims = 256 mice. Total (BC and MC): 512 mice.
2. BC: 6 mice x 2 experimental groups (manipulated vs not manipulated) x 2 tumor lines (1 mouse, 1 human) x 3 genes x 2 methods (spontaneous and experimental) x 4 aims = 576 mice. MC: 6 mice x 2 experimental groups (manipulated vs not manipulated) x 2 tumor lines (1 mouse, 1 human) x 3 genes x 2 methods (spontaneous and experimental) x 4 aims = 576 mice. Total (BC and MC): 1152 mice.
3. 10 mice x 2 IVM (short and long-term) x 5 labmembers = 100 mice

Combined: 512 + 1152 + 100 = 1764 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: We have replaced animal experiments by performing initial experiments in vitro. However, to study the different steps of metastasis we cannot use in vitro data because we need an intact animal with the various organs to be able to study the metastases in these organs.

Reduction: The experiments described in experiment 1 are condition finding. Hence, the data obtained in experiment 1 will be used as a guide for experiment 2. For example, it will inform us on the coefficient of variation for the measured parameters, which will be helpful for a better estimation of the number of animals required for experiments 2, thereby reducing the number of animals.

By making use of multi-day IVM experiments we will also reduce the number of animals because we can use a single animal for multiple time points.

Refinement: We refine the experiments by first performing ex vivo experiments and based on those experiments we decide which cell lines to use in vivo. Because the ex vivo experiments cause less discomfort compared to the in vivo experiments we reduce the amount of discomfort for a lot of mice. In addition, when we will manipulate genes, we will opt for the least invasive method: slow release pump > s.c. > i.p. > i.m > i.v.. This reduces discomfort for the animals as much as possible.

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

1. We will perform surgeries under adequate anaesthesia. Analgesia will be provided prior and post-surgery to reduce the pain. We also reduce animal suffering by sacrificing the animal immediately after the last IVM sessions, so while the animal is still under anaesthesia. Tumor measurements will be performed by experienced researchers without the need for anaesthesia, which would cause more discomfort.
2. There are no adverse effects on the environment; all animals will be housed under strict D1 conditions.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

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.

1. Adequate analgesia will be given before surgery (to make sure the analgesia is effective). Surgery will be performed by trained researchers only.
2. Adequate short-term anaesthesia (<5 mins) will be used during the injection of tumor cells in the mammary fat pad. It will be performed by trained researchers only.
3. Adequate anaesthesia will also be used during the IVM sessions to ensure the animal is not moving and not stressed by the fixation that is required for proper imaging.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

1. The animals that receive an imaging window will be housed solitary for 1 day to prevent other mice from biting the wound and hampering wound healing.
2. The animals may experience mild discomfort from the injection of tumor cells, tumor measurements and anaesthesia for IVM.
3. The animals will experience moderate discomfort after imaging window surgery because of the surgery itself, and because of the presence of the window.

Explain why these effects may emerge.

1. Mice are social animals and don't like to be housed in solitary.
2. The injection or anaesthesia induction can cause mild discomfort to the animal.
3. The surgical procedure will cause the animal moderate discomfort.

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

1. Only animals that have received an imaging window will be housed in solitary. The other animals described in this appendix will not be housed in solitary. The animals will be housed in solitary only for 1 day during which they show reduced mobility as the result of surgery.
2. The anaesthesia will be performed as short as possible. For measuring tumor growth and injection of cells in the fat pad < 5 mins.
3. The surgery will be performed by experienced researchers and the animal will be monitored closely after surgery. The first two days after surgery daily by the researcher, and if fine, daily by animal caretakers.

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.

In all cases we will use criteria according to the code of practice Animals in Cancer Research. In case of tumor/metastases growth and/or window implantation, these are: severe loss of body weight (monitoring every other day based on body conditioning score), severe circulation or breathing problems, changes in behavior (posture, general signals of severe sickness or discomfort), severe clinical appearance of tumor (ulceration, growth hampering mobility, swollen abdomen), a total tumor mass that is too big (>2 cm³).

In case of window implantation, we will also sacrifice the animal if the tissue underneath the window gets infected or infested (milky white), or if the skin surrounding the window gets infected (red and

swollen).

In case of window implantation, we will also sacrifice the animal if the tissue underneath the window gets infected or infested (milky white), or if the skin surrounding the window gets infected (red and swollen).

Indicate the likely incidence.

< 1%

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 injection of tumor cells in the mesenteric vein or spleen, and intravital microscopy is defined as moderate. The housing in solitary for 1 day is defined as mild.

Description	Animal species/strain and sex	Number of animals	Discomfort (expected cumulative discomfort)	Discomfort is a sum of following procedures
			Mild 0%	
Experiment 1/2/3	-Mus musculus. -BALB/c, C57/Bl6, immunodeficient mice. -Female.	1764	Moderate 100%	Tumor cell injections (in the skin, spleen or mesenteric vein), tumor/metastasis growth, if applicable tumor measurements by calliper, if applicable injections for drugs to manipulate genes, Intravital microscopy.
			Severe 0%	
		Total	100%	

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

The animals will have tumors and metastases. If the experiment is finished the animals will have to be sacrificed because otherwise the tumors/metastases will keep growing. Moreover, the organs will be used for further analyses using immunohistochemistry to determine cellular and molecular aspects of tumor/metastasis growth.

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

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

Yes

DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: AVD116002016705
2. Titel van het project: Investigating the dynamic role of the TGF- β pathway in liver metastases to come closer towards therapies.
3. Titel van de NTS: Het onderzoeken van moleculaire en cellulaire aspecten van kanker uitzaaiingen.
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
 - wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: DEC Leiden
 - 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: 09-02-2017 & 09-03-2017
 - anderszins behandeld: via emailronde
 - termijnonderbreking(en) van 14-02-2017 t/m 24-02-2017 & 21-03-2017 t/m/ 22-05-2017
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 24-02-2017 & 22-05-2017
 - advies aan CCD: 02-06-2017
7. De IvD geeft aan dat de aanvrager de aanvraag 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
 - Datum: 14-02-2017
 - Strekking van de gestelde vragen:
De DEC heeft bij de aanvrager aangegeven dat zij vanwege de enorme omvang en complexiteit moeite had met de leesbaarheid en navolgbaarheid van het projectvoorstel. Zij heeft tevens aanvullende informatie ingewonnen met betrekking tot de achtergrond, het gebruikte figuur, de onderzoeksvragen, de haalbaarheid & samenwerking met andere afdelingen, gebruikte referenties, de strategie, gebruikte milestones & beslismomenten en de verfijning.
 - Naar aanleiding van deze vragen is het projectvoorstel inclusief bijlages herschreven.
 - Datum: 21-03-2017
 - Strekking van de gestelde vragen:

De DEC heeft naar aanleiding van de herschreven aanvraag bij de aanvrager aanvullende informatie ingewonnen met betrekking tot de strategie, de motivatie voor het gebruik van de IVM, de statistiek, keuze voor het geslacht, verfijning, de individuele huisvesting, training personeel en het ongerief.

- Naar aanleiding van deze vragen is het projectvoorstel inclusief bijlages en de NTS naar tevredenheid door de aanvrager aangepast.

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

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 over deze projectaanvraag te adviseren. De benodigde expertise op dit wetenschappelijke terrein is aanwezig binnen de DEC.
4. Geen van de DEC leden is betrokken bij het betreffende project.

C. Beoordeling (inhoud)

1. Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. De aanvraag komt overeen met voorbeeld 1 en 4B uit de handreiking 'Wat is een project': De verschillende subdoelen zijn uitkomstafhankelijk van elkaar of worden parallel uitgevoerd. Deze subdoelen zijn allemaal noodzakelijk om de doelstelling te behalen. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft duidelijk beschreven op basis van welke criteria deze zal besluiten het project wel of niet te continueren. De DEC is er daardoor van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.
2. Voor zover de DEC kan beoordelen is er geen sprake van tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van dit project het verkrijgen van inzicht in de dynamische rol van de TGF- β pathway in lever metastasen bij borst- en huidkanker. Het uiteindelijke doel is het identificeren van overeenkomsten en verschillen tussen de rol van de TGF- β pathway in huid- en borstkanker, die kunnen helpen bij de behandeling van kankerpatiënten met metastasen en die kunnen leiden tot tumor-type specifieke behandeling. De DEC is van mening dat er een duidelijke relatie is tussen het directe en uiteindelijk doel. De aanvrager heeft helder gemaakt wat de status is van het onderzoeksveld en wat de bijdrage van dit project aan het onderzoeksveld zal zijn. Ondanks dat er al veel bekend is over het metastatisch proces zijn er ook nog veel details onbekend. Door gebrek aan kennis over welke pathways de vorming van levermetastasen reguleren zijn er geen therapieën beschikbaar die lever metastasen

voorkomen of verminderen. De DEC is van mening dat het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld.

5. De belangrijkste belanghebbenden in dit project dat gericht is op het verkrijgen van kennis over de regulatie van tumor metastasen in de lever zijn de proefdieren, de onderzoekers en de patiënt.
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 pijn ondergaan.
Waarden die voor de onderzoekers bevorderd worden: De wetenschappers zullen kennis verkrijgen. Ook zullen de carrièremogelijkheden van de wetenschappers verbeteren door publicaties.
Waarden die voor de patiënten bevorderd worden: Meer kennis over het metastatische proces kan mogelijk lijden tot het vinden van een therapie voor de behandeling van lever metastasen.
6. Voor zover de DEC kan beoordelen is er geen sprake van substantiële milieueffecten.

Proefopzet en haalbaarheid

7. Naar de overtuiging van de DEC beschikt de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen om de projectdoelstelling met de gekozen strategie binnen de gevraagde termijn te realiseren. Het project bouwt verder op langlopend onderzoek dat wordt uitgevoerd door de onderzoeksgroep in samenwerking met nationale onderzoeksgroepen. De onderzoeksgroep heeft veel expertise op het gebied van dierexperimenteel onderzoek met betrekking tot borst- en huidkankeronderzoek en het gebruik van IVM om levermetastasen te kunnen bestuderen in muizen. In de afgelopen jaren zijn volgens vergelijkbare strategieën en aanpak belangrijke wetenschappelijke resultaten behaald resulterend in een aantal publicaties in internationaal gerenommeerde wetenschappelijke tijdschriften. Daarnaast zijn er belangrijke subsidies voor dit onderzoek binnen gehaald.
8. 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 binnen de looptijd van het project.

Welzijn dieren

9. Alle dieren worden gefokt bij een geregistreerd fokbedrijf voor het gebruik in dierproeven, er is geen sprake van afwijkende huisvesting en/of hergebruik. Er is geen sprake van bedreigde diersoorten, niet-menselijke primaten, zwerfdieren en/of dieren uit het wild. De toegepaste methoden voor anesthesie, analgesie en euthanasie zijn conform de Richtlijn.
10. De DEC is ervan overtuigd dat de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de richtlijn. Het proefdiercentrum van het LUMC beschikt over uitstekende faciliteiten en uitsluitend bevoegd en competent personeel zal zorg dragen voor de verzorging van de dieren en de uitvoering van de dierproeven.
11. 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 DEC schat dat het merendeel van de dieren cumulatief maximaal matig ongerief zullen ondervinden als gevolg van de orthotope tumorcel injectie en de IVM. De overige muizen zullen maximaal mild ongerief ondervinden. Deze inschatting is in overeenstemming met het niveau van het cumulatief ongerief ingeschat door de onderzoekers.

12. De integriteit van dieren wordt fysiek aangetast doordat de dieren tumoren en metastasen ontwikkelen. De integriteit zal ook gedragsmatig worden aangetast. Gedurende het project worden de dieren namelijk beperkt in hun bewegingsvrijheid. Hierdoor zullen de dieren minder natuurlijk gedrag kunnen vertonen.
13. Naar mening van de DEC zijn de humane eindpunten zorgvuldig beschreven en is de inschatting van de incidentie met betrekking tot het bereiken van een humaan eindpunt eveneens zorgvuldig beschreven in de projectaanvraag.

3V's

14. In het project wordt de keuze voor de diermodellen duidelijk onderbouwd. De betrokken dieren en het gekozen diermodel zijn het meest geschikt voor deze studieopzet. De desbetreffende dierproef berokkent de dieren het minste pijn, lijden, angst of blijvende schade. Met behulp van het spontane model wordt het mogelijk om de specifieke rol voor TGF- β tijdens deze stappen te bepalen. Terwijl met behulp van het experimentele metastasemodel het mogelijk is om de latere stappen van metastase te bestuderen. De DEC is ervan overtuigd dat er geen alternatieven beschikbaar zijn voor het voorgestelde gebruik van intacte dieren om de doelstelling van dit project te realiseren.
15. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereisten van vermindering van dierproeven. Zo maakt in vivo microscopie het mogelijk om tumorcelafscheiding van de primaire tumor, migratie door het omliggende weefsel en intravasatie in een bloedvat te onderzoeken in één dier. Naar inzien van de DEC zijn de beschreven go/no-go momenten realistisch, helder en eenduidig omschreven, waardoor er geen onnodig onderzoek zal worden uitgevoerd. De DEC is ervan overtuigd dat het onderzoek ethisch verantwoord zal worden uitgevoerd. De DEC acht het maximale aantal te gebruiken dieren realistisch geschat.
16. De uitvoering van het project is in overeenstemming met de vereisten van verfijning van dierproeven en is zo opgezet dat de dierproeven met zo min mogelijk ongerief worden uitgevoerd. Bij de opzet van dit onderzoek wordt rekening gehouden met dierenwelzijn door eerst *ex vivo* te onderzoeken welke cellijnen er het beste gebruikt kunnen worden voor het *in vivo* onderzoek. De DEC is ervan overtuigd dat de beschreven dierproeven zo humaan mogelijk zullen worden uitgevoerd.
17. Het betreft hier geen wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Deze aanvraag is gericht op drievoudig negatieve borstkanker, terwijl mannen overwegend ER+ borstkanker krijgen, dit betekent dat de resultaten niet van toepassing zijn op de mannelijke bevolking. De aanvrager zal in het project daarom alleen vrouwelijke dieren gebruiken. Tevens is bij het gebruik van mannelijke muizen de kans groter dat de tumor beschadigd door vechten, waardoor de uitval hoger zou worden. De onderzoeker heeft dit naar mening van de DEC voldoende onderbouwd in de projectaanvraag.

19. De dieren worden in het kader van het project gedood. De organen zullen worden uitgenomen en gebruikt worden voor verdere analyses met behulp van immuno-histochemie om cellulaire en moleculaire aspecten van tumor / metastase groei te bepalen. Het doden van de dieren gebeurt volgens een voor de diersoort passende dodingsmethode die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU.
20. Er worden voor dit projectvoorstel geen niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren gebruikt.

NTS

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

D. Ethische afweging

1. Rechtvaardigt onderzoek doen naar de dynamische rol van de TGF- β pathway in lever metastasen bij borst- en huidkanker met als uiteindelijke doel het identificeren van overeenkomsten en verschillen tussen de rol van de TGF- β pathway in huid- en borstkanker, die kunnen helpen bij de behandeling van kankerpatiënten met metastasen en die kunnen leiden tot tumor-type specifieke behandeling het ongerief dat de dieren wordt aangedaan?
2. Project gericht op het verkrijgen van kennis over de regulatie van metastasen in de lever en hoe dit getarget kan worden met therapie.
Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: matig nadeel.
Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: gering voordeel.
Waarden die voor de patiënten (incl. de samenleving) bevorderd worden: groot voordeel.
De DEC is van mening dat de belangen van de samenleving in het algemeen en de patiënten in het bijzonder in dit project zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de proefdieren.
Kanker is één van de dodelijkste ziektes ter wereld. In Nederland sterven jaarlijks 40.000 patiënten aan kanker. De meeste hiervan sterven niet als gevolg van de primaire tumor, maar vanwege de metastasen op moeilijk te reseceren plekken zoals de lever. De prognose voor borst- of huidkankerpatiënten met levermetastasen is gemiddeld slechts 4 maanden. Ondanks dat er al veel bekend is over het metastatisch proces zijn er ook nog veel details onbekend. Door gebrek aan kennis over welke pathways de vorming van levermetastasen reguleren zijn er geen therapieën beschikbaar die lever metastasen voorkomen of verminderen. De DEC acht het bestuderen van de individuele stappen van metastase in de loop der tijd van essentieel belang om de dynamische regulering van TGF- β beter te begrijpen tijdens het metastatische proces. Het is aannemelijk dat de doelstelling behaald zal worden. Hiertoe zullen dieren worden gebruikt. De onderzoekers doen er echter alles aan om het lijden van de dieren te beperken, waardoor het ongerief van de dieren zo veel mogelijk beperkt blijft.
3. De DEC is overtuigd van het belang van de doelstelling van dit project. De DEC is van mening dat de waarden die voor de doelgroep bevorderd kunnen worden zwaarder wegen dan de waarden die voor de proefdieren in het geding zijn. Het project is goed opgezet. De DEC is bovendien 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. De DEC is er verder van overtuigd

dat de onderzoeksgroep voldoende ervaring heeft met de gekozen onderzoeksstrategie en met de voorgestelde dierproeven om de doelstelling te behalen en dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om zowel het ongerief van de dieren alsmede het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken. De DEC onderschrijft dat de doelstelling niet zonder het gebruik van proefdieren behaald kunnen worden en acht het gebruik van het aantal dieren en het daarmee samenhangende ongerief bij de dieren 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
 - Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.
 - Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist
 - Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...
- De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
 - De vaststelling dat het project niet vergunning plichtig is om de volgende redenen:...
 - De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...
 - De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

3. Er zijn tijdens de beoordeling van dit projectvoorstel geen echte knelpunten en of duidelijke dilemma's naar voren gekomen.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academisch Ziekenhuis Leiden h.o.d.n. LUMC
Mevr. Leids Universitair Medisch Centrum
Postbus 9600
2300 RC 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
AVD116002016705
Bijlagen
2

Datum 22 juni 2017
Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte mevrouw Leids Universitair Medisch Centrum,

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 20 juni 2017. Het gaat om uw project "Investigating the dynamic role of the TGF-R pathway in liver metastases to come closer towards therapies". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD116002016705. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

Datum:

22 juni 2017

Aanvraagnummer:

AVD116002016705

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
22 juni 2017
Aanvraagnummer:
AVD116002016705

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 11600
Naam instelling of organisatie: Academisch Ziekenhuis Leiden h.o.d.n. LUMC
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: Mevr. Leids Universitair Medisch Centrum
KvK-nummer: 27366422
Straat en huisnummer: Albinusdreef 2
Postbus: 9600
Postcode en plaats: 2300 RC LEIDEN
IBAN: NL11DEUT0451001400
Tenaamstelling van het rekeningnummer: LUMC

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam:
Functie:
Afdeling:
Telefoonnummer:
E-mailadres:



Datum:
22 juni 2017
Aanvraagnummer:
AVD116002016705

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam:
Functie:
Afdeling:
Telefoonnummer:
E-mailadres:



Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u?

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

Over uw project

Geplande startdatum:

1 juni 2017

Geplande einddatum:

31 mei 2022

Titel project:

Investigating the dynamic role of the TGF-R pathway in liver metastases to come closer towards therapies

Titel niet-technische samenvatting:

Het onderzoeken van moleculaire en cellulaire aspecten van kanker uitzaaiingen.

Naam DEC:

DEC Leiden

Postadres DEC:

 LUMC Postbus 9600 ' : 2300 RC Leiden

E-mailadres DEC:



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:

- DEC-advies

Ondertekening

Naam: 
Functie: Gemandateerd functiehouder
Plaats: Leiden
Datum: 1 juni 2017

Datum:
22 juni 2017
Aanvraagnummer:
AVD116002016705



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academisch Ziekenhuis Leiden h.o.d.n. LUMC
Leids Universitair Medisch Centrum
Postbus 9600
2300 RC 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
AVD116002016705

Bijlagen

2

Datum 22 juni 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 22 juni 2017
Vervaldatum: 22 juli 2017
Factuurnummer: 170705

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD116002016705	€ 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.

[REDACTED]

Van: Info-zbo
Verzonden: dinsdag 22 augustus 2017 16:56
Aan: Wob CCD
Onderwerp: FW: Aanvraag AVD116002016705

Zie onder

Van: Info-zbo
Verzonden: maandag 17 juli 2017 15:40
Aan: [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: Aanvraag AVD116002016705

Geachte [REDACTED]
Op 20 juni 2017 hebben wij uw projectaanvraag "Investigating the dynamic role of the TGF-R pathway in liver metastases to come closer towards therapies" met aanvraagnummer AVD116002016705 ontvangen. Wij hebben nog aanvullende informatie van u nodig.

- Voor alle drie de bijlagen dierproeven is het ons onder vraag D niet duidelijk wat u in vitro onderzocht heeft en op basis waarvan u besloten heeft om dierproeven te gaan doen. Kunt u ons inzicht geven in hoe de in vitro resultaten de in vivo experimenten sturen?

Zonder deze aanvullende informatie kan de beslissing nadelig voor u uitvallen omdat de gegevens onvolledig of onduidelijk zijn.

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.

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

Medewerker behandelen en ontwikkelen
Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028
E: info@zbo-ccd.nl

afdeling [redacted]
 postzone [redacted]
 afzender [redacted]
 bezoekadres [redacted]
 telefoon [redacted]
 fax [redacted]
 e-mail [redacted]
 onze referentie [redacted]
 uw referentie [redacted]
 datum 20 juli 2017
 onderwerp Aanvraag AVD116002016705
 aantal pagina's 2

aan Centrale Commissie Dierproeven
 Postbus 20401
 2500 EK
 Den Haag

Geachte [redacted]

Afgelopen maandag 17 juli 2017 heeft u ons een email gestuurd met daarin het verzoek tot aanvullende informatie betreffende mijn CCD aanvraag "Investigating the dynamic role of the TGF-b pathway in liver metastases to come closer towards therapies" met aanvraagnummer AVD116002016705.

Uw vraag luidde als volgt:

- Voor alle drie de bijlagen dierproeven is het ons onder vraag D niet duidelijk wat u in vitro onderzocht heeft en op basis waarvan u besloten heeft om dierproeven te gaan doen. Kunt u ons inzicht geven in hoe de in vitro resultaten de in vivo experimenten sturen?

Ons antwoord daarop met de aanvullende informatie is als volgt:

2D in vitro culture models can be used to study tumor growth and metastasis, but only to a certain extend. We have setup a 3D in vitro model that recapitulates in vivo tumor/metastasis growth more closely compared to the 2D in vitro models. This is evident by the fact that some cell lines that proliferate in 2D do not proliferate in 3D. Similarly, in literature it was shown that these cell lines do not form metastases in vivo. As such, the 3D situation mimics the in vivo situation more closely.

We have used this 3D in vitro assay to study the proliferation of the cell lines we want to test in vivo. Indeed, some lines are hardly growing in the 3D assay whereas other lines are growing fine. In order to identify genes that are important for metastatic growth we have performed RNA-sequencing of the lines grown in the 3D assay and compared them. The sequencing is performed as we speak, so after we obtain the list with genes that are differentially regulated, we will make a top 10 list of interesting genes to study (related to the TGF-b pathway). These genes will be up or downregulated experimentally (siRNA, overexpression) in the cells, and we will then study their effect on proliferation, apoptosis and cell cycle using the 3D in vitro model. The top 3 genes that perform best in these assays will be used to guide the in vivo experiments.

afdeling [REDACTED]
onze referentie
datum 20 juli 2017
onderwerp Aanvraag AVD116002016705
aantal pagina's 2 van 2

aan Centrale Commissie Dierproeven

Dit antwoord geldt voor alle drie de bijlagen.

Ik hoop u hiermee voldoende te hebben geïnformeerd, maar mocht u nog meer vragen hebben dan hoor ik dat graag.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]
[REDACTED]



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academisch Ziekenhuis Leiden h.o.d.n. LUMC

t.a.v. [REDACTED]

Postbus 9600

2300 RC 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
AVD116002016705

Bijlagen

1

Datum 21 juli 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte mevrouw [REDACTED]

Op 20 juni 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Investigating the dynamic role of the TGF-R pathway in liver metastases to come closer towards therapies" met aanvraagnummer AVD116002016705. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 20 juli 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Op ons verzoek is het in vitro werk dat voorafgaat aan het onderliggende project nader uitgelegd.

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 "Investigating the dynamic role of the TGF-R pathway in liver metastases to come closer towards therapies" starten. De vergunning wordt afgegeven van 21 juli 2017 tot en met 30 juni 2022. Deze termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat de door u aangevraagde startdatum in het verleden ligt.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Leiden gevoegd. Dit advies is opgesteld op 2 juni 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:
21 juli 2017
Aanvraagnummer:
AVD116002016705

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. 
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

- Vergunning
- Hiervan deel uitmakend:
- DEC-advies
 - Weergave wet- en regelgeving

Datum:
21 juli 2017
Aanvraagnummer:
AVD116002016705



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Academisch Ziekenhuis Leiden h.o.d.n. LUMC

Adres: Postbus 9600

Postcode en plaats: 2300 RC LEIDEN

Deelnemersnummer: 11600

deze projectvergunning voor het tijdvak 21 juli 2017 tot en met 30 juni 2022, voor het project "Investigating the dynamic role of the TGF-R pathway in liver metastases to come closer towards therapies" met aanvraagnummer AVD116002016705, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Leiden. 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 20 juni 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 20 juni 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 20 juni 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 2 juni 2017, ontvangen op 20 juni 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 20 juli 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Study spontaneous metastasis ex vivo				
	Muizen (Mus musculus) /	1.632	Licht	
3.4.4.2 Study experimental metastasis ex vivo				
	Muizen (Mus musculus) /	1.456	Matig	
3.4.4.3 Study metastasis in vivo				
	Muizen (Mus musculus) /	1.764	Matig	

Voorwaarden

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

Aanvraagnummer:
AVD116002016705

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:

AVD116002016705

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:

AVD116002016705

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 W17-12									
nr.	documenten NTS2017858	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	Projectvoorstel				x		x	x	
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1				x			x	
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2				x			x	
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3				x			x	
7	Bijlage beschrijving dierproeven 4				x			x	
8	Bijlage beschrijving dierproeven 5				x			x	
9	DEC-advies				x		x	x	
10	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
11	Aanvullende vragen en antwoorden				x		x	x	
12	Advies CCD		x						x
13	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 11600 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen	
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	Academisch Ziekenhuis Leiden
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	Leids Universitair Medisch Centrum
		KvK-nummer	27366422
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	Albinusdreef 2
		Postbus	9600
		Postcode en plaats	2300 RC Leiden
		IBAN	NL11DEUT0451001400
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	LUMC
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	
		Afdeling	
		Telefoonnummer	
		E-mailadres	
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	

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1827 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 Gemandateerd vergunninghouder

Plaats Leiden

Datum 

Handtekening 



Format

Projectvoorstel dierproeven

1. Dit format gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
2. Bij dit format hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
3. Meer informatie over het projectvoorstel vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
4. 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.

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

opleidingsprogramma en eindtermen, is gekozen voor dierproeven.

Kanker is een van de belangrijkste doodsoorzaken in de westerse wereld en de incidentie neemt nog steeds toe. Het merendeel van de patiënten overlijdt ten gevolge van metastasering van de tumoren. Het proces van disseminatie en uitgroei van tumoren wordt sterk beïnvloedt door de interacties tussen verschillende celtypen in solide tumoren. Huidige therapieën berusten vaak op chirurgische verwijdering van de tumor, al dan niet aangevuld met chemotherapie of bestraling en in enkele gevallen targeted therapie, gericht op specifieke signaal transductie routes. De meeste therapieën richten zich op de epitheliale tumor cellen, maar onderzoek van onze groep en anderen heeft duidelijk laten zien dat er een cruciale rol is voor interacties tussen epitheliale tumoren cellen en het endotheel (in de vorm van angiogenese), de omringende fibroblasten (die een groot deel van het tumor stroma vormen) en de immuun cellen. Binnen deze interacties spelen verschillende signaal transductie routes een belangrijke rol. Het onderzoeken van deze routes en therapeutische interventies in deze routes vereist een volledig organisme om de bevindingen uit eerdere *in vitro* co-cultures celtypen te valideren en systemische effecten te bestuderen. Het proces van het uitzaaien van een tumor door interacties tussen verschillende celtypen naar een ander orgaan is *in vitro* helaas nog niet mogelijk. Dit wordt veroorzaakt door de verschillende fasen die een tumorcel doorloopt tijdens het uitzaaien, zoals ontsnappen aan de tumor, overleven in de bloedsomloop, engrafting en signalen van verschillende celtypen om uitgroei te initiëren. Ons onderzoek richt zich met name op receptoren en liganden van de Transforming Growth Factor- β familie. Deze familie bestaat uit ~ 33 liganden, waaronder de TGF- β s, bone morphogenetic proteins (BMPs) en activins. Een groot aantal receptoren reguleert de onderliggende signaaltransductie routes die een belangrijke rol spelen in fysiologische processen zoals proliferatie, differentiatie, apoptose, angiogenese en regulatie van het immuunsysteem. Cytokines uit de TGF- β familie zijn cruciaal voor embryonale ontwikkeling en spelen een belangrijke rol in tumor progressie en metastasering. Dit wordt verder onderstreept door het grote aantal klinische trials die lopen naar inhibitie van TGF- β in tumoren en fibrose (et al Growth Factors 2011).

Eerdere onderzoeken in onze onderzoeksgroep hebben laten zien dat liganden en receptoren uit de TGF- β familie van groot belang zijn in de interacties tussen verschillende celtypen in tumoren, en kunnen leiden tot verhoogde invasiviteit en tumor metastasering (et al Oncogene 2014, et al Oncogene 2016, et al Clin Ca Res 2016). Ons onderzoek heeft zich met name gericht op de We konden al een belangrijke rol laten zien voor deze receptoren in de progressie van tumoren, maar veel is nog onbekend over hoe deze interacties tot stand komen.

Ongepubliceerde data laten bijvoorbeeld een sterk effect zien van cel type specifieke deletie van TGF- β receptoren, in tumor initiatie, via paracrine interacties tussen epitheelcellen, fibroblasten en het immuunsysteem. Vanwege de interacties tussen fibroblasten, epitheel en het immuunsysteem zijn deze experimenten niet na te bootsen *in vitro* en is onderzoek in muismodellen noodzakelijk.

Voor het translationele therapeutische onderzoek richting wij ons op de vraag, hoe een maximaal therapeutisch effect bereikt kan worden door targeting van deze receptoren met neutraliserende antilichamen, zowel in monotherapy en door combinaties van therapieën met andere recent ontwikkelde targeted therapies of conventionele therapieën. Onze eerdere gepubliceerde (et al Oncogene 2014, et al Oncogene 2016, et al Clin Ca Res 2016) en ongepubliceerde experimenten hebben laten zien dat er mogelijk groot therapeutisch benefit is van het targetten van endoglin. In deze experimenten hebben we dit alleen laten zien in borsttumoren. Huidige experimenten richten zich op darmtumoren, maar in de toekomst willen we verschillende andere tumoren, zoals het hepatocellulair carcinoom (HCC), vulva tumoren en pancreas tumoren waarin endoglin een belangrijke rol speelt (hoge expressie, sterke correlatie met tumorgroei en metastasering) bekijken en ook de combinaties met andere therapieën. Vanwege de verschillende cellen die een rol spelen in de therapeutische effecten en in de toxiciteit van deze compounds is het uitvoeren van muizenexperimenten hiervoor noodzakelijk.

Binnen huidige en toekomstige projecten willen we ons richten op fundamenteel onderzoek hoe de TGF- β familie bijdraagt aan de interacties tussen epitheliale tumor cellen en het tumor stroma en hoe dit de progressie en metastasering van tumoren beïnvloedt. Dit willen we onderzoeken door gebruik te maken van celtypen specifieke knockout muizen, die reeds aanwezig zijn. Dit zal fundamentele nieuwe inzichten geven in de rol van de TGF- β familie in tumor initiatie en progressie, wat toekomstig vertaald kan worden naar klinische toepassingen. Verder willen we in een translationele setting onderzoeken hoe we therapeutisch deze interacties en hopelijk daarmee de pro-metastaserende effecten kunnen inhiberen. Dit willen we zowel in monotherapie onderzoeken als in nieuwe combinaties met bestaande medicatie. Deze experimenten moeten aanleiding geven tot nieuwe klinische trials met betrekking tot targeting van de TGF- β familie als monotherapie of in combinatie met andere therapieën. Dit is realiseerbaar door nauwe samenwerking met bedrijven die deze neutraliserende antilichamen in klinische trials testen op mensen ontwikkelen op dit moment.

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

4. 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?
5. In geval het een ander dan een onderzoeksdoel betreft: in welke concrete behoefte voorziet dit project?

In dit project willen we onderzoeken wat de rol is van de TGF- β signaaltransductieroute in initiatie, progressie en metastasering van solide tumoren en hoe we hier therapeutisch op in kunnen grijpen. Specifiek zijn de 2 vraagstellingen van dit project:

1. Wat is de invloed van manipulatie van TGF- β receptoren op epitheliale-stromale interacties in epitheliale homeostase en tumor initiatie, groei en metastasering?
2. Welke therapeutische interventies gericht op TGF- β in monotherapie of in combinatie zijn het meest effectief in monotherapie en in nieuwe combinaties met conventionele of targeted therapieën

Onze aandachtsgebieden zullen zijn: colorectale carcinomen, het hepatocellulair carcinoom, pancreascarcinoom en vulva tumoren. De keuze voor deze tumoren berust op hoge expressie TGF β family members en correlatie met klinisch beloop in patiënten, gecombineerd met prevalentie (colorectale tumoren), of zeer beperkte huidige behandelingsmogelijkheden (hepatocellulair carcinoom (HCC), pancreas en vulvatumoren).

Haalbaarheid:

In het Leids Universitair Medisch Centrum wordt binnen het profileringsgebied Cancer Pathogenesis and Therapy veel onderzoek gedaan naar onderliggende mechanismen van tumor progressie en metastasering. Binnen dit samenwerkingsverband werkt onze onderzoeksgroep samen met verschillende andere groepen om de toepasbaarheid van targeting van de TGF- β familie. Door het combineren van expertise binnen andere afdelingen zoals Pathologie (vulva tumoren), heelkunde (pancreas tumoren), immunohepatologie en bloedtransfusie (combinatie studies) moleculaire celbiologie (combinatie studies) werken wij aan nieuwe innovatieve kanker therapieën. We maken gebruik van de meest geavanceerde *in vitro* en *in vivo* modellen om op hoog internationaal niveau translationeel kankeronderzoek te doen.

De doelstelling om de TGF- β signaaltransductie route en mogelijk therapeutische interventies hierin opgehelderd te krijgen wordt door ons als haalbaar geacht. We hebben een sterk onderzoeksteam met veel expertise op het gebied van dierexperimenteel werk en werken tevens, voor de modellen waar wij de expertise nog niet hebben, samen met onderzoeksgroepen (immunohepatologie en bloedtransfusie, heelkunde) die deze modellen routinematig gebruiken. In de afgelopen jaren zijn de meeste diermodellen en technieken ontwikkeld en geoptimaliseerd voor onze toepassingen. De resultaten behaald met deze experimenten zijn gepubliceerd in toonaangevende tijdschriften zoals Gastroenterology, Cancer

Research, Oncogene, Clinical Cancer Research en anderen. We maken veel gebruik van geavanceerde orthotope modellen met mogelijkheden voor bioluminescente imaging, waardoor het aantal dieren duidelijk beperkt wordt. Onze studies zijn via onze samenwerking met een aantal farmaceutische bedrijven ook van belang om afwegingen te maken voor de initiatie van klinische studies. Vanuit de aanvragende afdeling hebben de PIs veel vergelijkbare studies gepubliceerd in toonaangevende tijdschriften. Ten tweede is voldoende financiering gerealiseerd uit toegekende fondsen van het Alpe D'HuZes fonds, Stichting Fonds Oncologie Holland, Stichting Swarttouw-Hijmans en uit afdelingsbudget, wat de haalbaarheid van deze studies onderstreept. Verder worden de combinatiestudies mede gefinancierd door [REDACTED] die zowel kosten van de experimenten als personele lasten financieren voor voorgestelde combinatie studies. Andere subsidieaanvragen met betrekking tot voorgestelde projecten zijn nog onder review (NWO, Maag- Lever-Darm stichting en KWF kankerbestrijding).

3.3 Belang

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

Kanker is de belangrijkste doodsoorzaak in Nederland; 1 op de 3 mensen krijgt kanker, waarbij er jaarlijks ruim 43,000 mensen overlijden. Darmkanker behoort tot een van de meest voorkomende kanker soorten met 15,500 diagnoses en ruim 4900 sterfgevallen in 2014 (cijfersoverkanker.nl). Pancreas- en levertumoren komende minder vaak voor maar zijn gekenmerkt door een slechte prognose: 6% van alle kanker sterfte is afkomstig van pancreastumoren. Vulvatumoren behoren tot een zeldzamere vorm van tumoren, maar zijn wel gekenmerkt door een bijzonder slechte kwaliteit van leven voor patiënten die lijden aan deze ziekte. In eerdere studies hebben we laten zien dat [REDACTED]. Dit soort nieuwe therapeutische benaderingen kunnen van groot belang zijn voor patiënten met solide tumoren. Deze therapieën kennen ook duidelijk minder bijwerkingen, waardoor de kwaliteit van leven van deze patiënten gewaarborgd wordt. Om de aangrijpingspunten (liganden/receptoren) van deze therapieën en de mogelijk effecten op verschillende celtypen die deze liganden en receptoren tot expressie brengen in kaart te kunnen brengen, is fundamenteel onderzoek nodig. Door specifieke deletie van bijvoorbeeld een receptor op fibroblasten, epitheel cellen of immuun cellen kunnen we duidelijk de fysiologische rol onderzoeken en tevens voor medicatie onderzoeken waar de werkzaamheid op berust. Tezamen met de therapeutische (combinatie) studies geeft dit nieuwe behandelingsstrategieën voor mensen met CRC, HCC of vulvatumoren.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

Binnen dit project komen de volgende 5 jaar de volgende vraagstellingen centraal te staan, die we volgens onderstaande strategie zullen benaderen:

1. Wat is de invloed van manipulatie van TGF- β receptoren op epitheliale-stromale interacties in epitheliale homeostase en tumor initiatie, groei en metastasering?

Om te onderzoeken hoe TGF- β en BMP signalering weefsel homeostase beïnvloeden en om de potentiële therapeutische effecten en risico's van deze therapie te kunnen inschatten zijn deze experimenten noodzakelijk. Bijvoorbeeld om te kunnen bepalen of de effecten worden veroorzaakt door targeting van de receptor op een epitheelcel of fibroblast (aangezien dat mogelijk tegengestelde effecten kan hebben), zijn celtype specifieke knockout dieren noodzakelijk. Hiervoor maken we gebruik van muizen met induceerbare, weefsel-specifieke CRE-expressie, in combinatie met muizen waarin belangrijke genen voor ons onderzoek (bijvoorbeeld [REDACTED]) geflankeerd zijn door LoxP residuen. Door de cel- of weefsel-specifieke CRE expressie vindt recombinatie alleen in deze cellen plaats, op het moment dat CRE-expressie geïnduceerd wordt, in de cellen met activiteit van de gekozen promotor. Spontane tumor vorming door genetische achtergrond of chemisch geïnduceerde carcinogenese kan worden onderzocht op deze manier. Ook transplantatiestudies met gemodificeerde cellen (tumorcellen

en/of fibroblasten, overexpressie of knockdown van receptoren of liganden uit TGF- β familie) in muizen behoren hiertoe. Ook willen we in deze experimenten bekijken hoe leverfibrose als voorstadium van HCC beïnvloed wordt door [REDACTED] TGF- β receptoren.

2. Welke therapeutische interventies gericht op TGF- β in monotherapie of in combinatie zijn het meest effectief?

Om deze onderzoeksvraag te beantwoorden willen we ons richten op neutraliserende antilichamen tegen liganden en receptoren van de TGF- β familie. Door samenwerkingen met farmaceutische bedrijven en onze jarenlange ervaring met het genereren van dit soort targeting molecules hebben we een aantal goede therapeutica die we willen testen in diermodellen die sterk de patiënten-situatie benaderen. Hiervoor willen we zowel modellen van primaire tumorgroei gebruiken, maar ook klinisch zeer relevante modellen waarbij we chirurgisch de tumor verwijderen om post-operatieve recidieven en metastasen te verminderen. Omdat wij verwachten dat, zeker klinisch gezien, een combinatie van behandelingen effectiever zal zijn dan een monotherapie en onze eerdere studies dit ook reeds hebben laten zien, willen we targeting van TGF- β liganden combineren met [REDACTED]. De tumormodellen waarin we dat willen testen zijn CRC, pancreas- en vulvatumoren en fibrose gerelateerde HCC, ook inclusief resectie van de primaire tumor. Om targeting van deze tumoren te bevestigen willen we ook met gelabelde antilichamen de tumoren visualiseren.

Er duidelijk verband tussen de 2 vraagstellingen; in vraagstelling 1 wordt kennis verkregen over de rol van deze receptoren waardoor zowel over potentie als mechanisme van therapeutische targeting veel informatie wordt verkregen. De experimenten onder vraagstelling 2 dragen bij aan het inschatten van therapeutisch potentieel van deze behandelingen. **De experimenten vinden parallel plaats. Op basis van eerder geïdentificeerde targets wordt gestart met therapeutische studies gedaan, terwijl nieuwe targets geïdentificeerd worden (vraagstelling-1) op basis van de mechanistische studies en door kunnen gaan naar therapeutische studies bij bewezen belang.**

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 onderstaande onderzoeksvragen hebben we weergegeven welk type dierproef we daarvoor uit dienen te voeren om de onderzoeksvraag te kunnen beantwoorden. De experimenten staan ook schematisch weergegeven in **onderstaande flowcharts-1** (behorende bij doel-1) en flowchart-2 (behorend bij doel-2).

1. Wat is de invloed van manipulatie van TGF- β receptoren op epitheliale-stromale interacties in epitheliale homeostase en tumor initiatie, groei en metastasering?

Om deze vraag te kunnen beantwoorden moeten we gebruik maken van celtype specifieke knockout muizen. Daartoe hebben we reeds muizen gekruist met celtype specifieke CRE expressie (bijvoorbeeld [REDACTED] en gladde spiercellen), met muizen waarbij het gen van interesse (bijvoorbeeld [REDACTED]) geflankeerd wordt door loxP residuen. Na inductie van CRE expressie vindt recombinatie plaats en deletie van het gen. Deze modellen willen we gebruiken om:

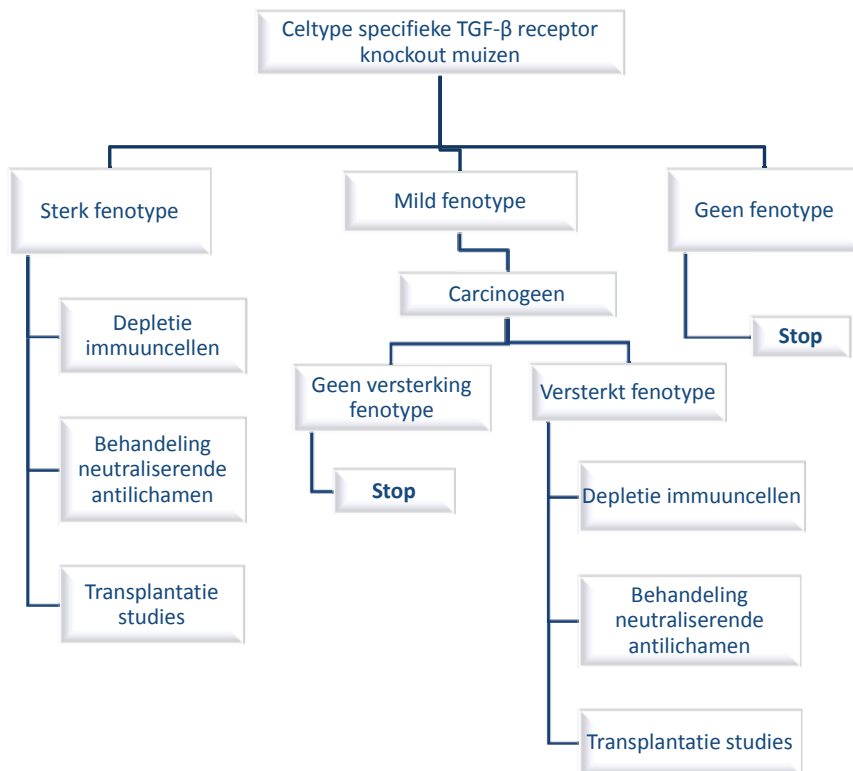
- **Spontane veranderingen in weefsel homeostase/poliep en tumor groei tgv verlies van deze receptoren te bekijken.** Hierbij wordt de deletie van receptoren of liganden van de TGF- β familie celtype specifiek geïnduceerd en worden de dieren opgeofferd na een vooraf vastgestelde periode (bijvoorbeeld 6 maanden in geval van [REDACTED] of bij tekenen van tumorgroei of andere aan de knockout gerelateerd ongerief. Dit model is representatief voor vroege fasen van carcinogenese, en geeft informatie hoe mutaties kunnen leiden tot benigne of maligne groei. Voor de timing en volgorde van experimenten wordt verwezen naar flowcharts 1 en 2. Deze experimenten staan beschreven in bijlage-1.

- **Te onderzoeken of chemisch geïnduceerde carcinogenese verandert.** Hiertoe wordt de celtype specifieke knockout geïnduceerd en wordt er een "second hit" gegeven door toediening van een carcinogeen (e.g. azoxymethaan) en/of een combinatie van een carcinogeen met ontsteking (bijvoorbeeld Dextran Sodium Sulphate-geïnduceerde colitis). Dit model kan inzichten geven in spontane tumorvorming en de gevolgen van een second hit of ontsteking in dit proces. Het is mogelijk dat deletie van een receptor een mild fenotype (bijv uitsluitend poliep vorming en geen invasieve tumoren) geeft, maar dat maligne ontaarding na een second hit (bijvoorbeeld geïnduceerd door azoxymethaan-DSS) plaatsvindt. Voor de timing en volgorde van experimenten wordt verwezen naar flowcharts 1 en 2. Deze experimenten staan beschreven in bijlage-1.

- **Orthotope transplantatie van cellen of tumor stukjes.** Hiertoe worden tumorcellen met knockdown van bepaalde receptoren of stukje tumoren bestaande uit die cellen orthotoop geplaatst (dwz in de pancreas, darm of vulva van de muis). Dit model is representatief voor invasieve tumor groei en de effecten op metastasering van tumoren in tegenstelling tot de benigne en vroeg maligne lesies in chemisch geïnduceerde tumor modellen in de darm. Deze experimenten staan beschreven in bijlage-2.

- **Combinatie van celtype specifieke deletie van TGF-β receptoren en neutraliserend antilichamen tegen TGF-β family members** of

Flowchart doel-1: Wat is de invloed van manipulatie van TGF-β receptoren op epitheliale-stromale interacties in epitheliale homeostase en tumor initiatie, groei en metastasering?



immuuncel populaties.

Door uitschakelen van bijvoorbeeld op fibroblasten te vergelijken met muizen die met anti- behandeld worden kunnen de effecten op verschillende celtypen beoordeeld worden. Volledige knockout muizen voor nagenoeg alle TGFβ receptoren zijn niet levensvatbaar.

Om te onderzoeken of het fenotype een gevolg is van een andere compositie van immuun infiltraat, willen we verschillende populaties zoals kunnen

neutraliseren. Voor de timing en volgorde van experimenten wordt verwezen naar flowcharts 1 en 2. Deze experimenten staan beschreven in

Flowchart-1. Overzicht experimenten met betrekking tot doel-1. * als op basis van histologische analyses afwijkingen gevonden worden in weefsels, kan het toevoegen van een carcinogeen overwogen worden

Flowchart doel-2: Welke therapeutische interventies gericht op TGF- β in monotherapie of in combinatie zijn het meest effectief?



Flowchart-2. Overzicht experimenten met betrekking tot doel-2. Behandelingen zullen worden getest op primaire tumorgroei en/of als adjuvante behandeling na resectie van de primaire tumor afhankelijk van de specifieke vraagstelling. Keuze momenten zijn gelijk voor beide set-ups.

bijlage-1.

2. Welke therapeutische interventies gericht op TGF- β in monotherapie of in combinatie zijn het meest hoopgevend om in klinische trials op patiënten met solide tumoren te gaan testen (flowchart 2)?

Therapeutische [redacted] met neutraliserende antilichamen hebben we reeds eerder gebruikt in diermodellen voor borst- en colorectale tumoren. In deze studie willen we dat uitbreiden naar modellen voor CRC, HCC, pancreastumoren en in combinatie met andere nieuwe therapieën. Na inductie van de tumoren worden de muizen behandeld met neutraliserende antilichamen tegen [redacted] [redacted] liganden uit de TGF- β familie, gebaseerd op *in vitro* bevindingen. Dit wordt gecombineerd met andere nieuwe therapieën die potentieel versterkend kunnen werken,



Dit zal zowel getest worden op muizen met een primaire tumor, maar ook in muizen waarbij de tumor operatief verwijderd is, om zo nauwkeurig mogelijk de situatie van patiënten na te kunnen bootsen. Het type dierproef dat we hiervoor uit willen voeren zijn:

- **Chemisch geïnduceerde darm tumoren**, die we behandelen met anti-TGF- β therapie (gericht tegen liganden of receptoren), al dan niet in combinatie met [redacted]. Om het mechanisme te ontrafelen willen we deze experimenten ook combineren met depletie van effector cellen, [redacted]. Voor de timing en volgorde van experimenten wordt verwezen naar flowchart 2. Deze experimenten staan beschreven in bijlage-1.
- **Orthotope en subcutane modellen voor darm-, lever-, vulva-, en pancreastumoren**, die we behandelen zoals hierboven beschreven. Om het mechanisme te ontrafelen willen we deze experimenten ook combineren met depletie van effector cellen [redacted]. Dit model geeft een beeld hoe efficiënt therapie kan zijn als behandeling van een primaire tumor. De keuze voor orthotope of subcutane modellen zal gemaakt worden op basis van de exacte vraagstelling van het experiment. Als we de invloed van stroma willen bekijken zullen we meestal gebruik maken van orthotope modellen en als het gaat om primaire epitheliale tumorcel groei of PDX, subcutane modellen. Uit lopend onderzoek weten we dat het gedrag en immuunpopulatie van subcutane en orthotope tumoren nogal verschilt. Voor de timing en volgorde van experimenten wordt verwezen naar flowchart 2. Deze experimenten staan beschreven in bijlage-2 en-3.
- **Orthotope resectie modellen**, waarbij we na orthotope transplantatie van de primaire tumor deze chirurgische verwijderen en de muizen (neo-)adjuvant behandelen, sterk gelijkend op de

patiënten situatie. In deze experimenten zal bekeken worden of er therapeutische potentieel is om dit soort therapieën in een adjuvante setting bij patiënten toe te passen. Deze experimenten staan beschreven in bijlage-2.

- **Fibrose- afhankelijk hepatocellulair carcinoom groei.** In een muismodel waarbij fibrose wordt geïnduceerd willen kijken of therapeutische remming van TGF- β liganden of receptoren fibrose kan verminderen. Tevens willen we dit fibrose model combineren met een orthotoop HCC model en onderzoeken wat de therapeutische relevantie is van TGF- β targeting in HCC, in monotherapie en in combinatie met [REDACTED]. Voor dit model willen we leverfibrose induceren door middel van CCL4, gevolgd door orthotope injectie van muis HCC cellen. Dit model is recent in de literatuur beschreven (Reiberger et al Nat Prot 2015) en geeft een goede representatie van het humaan HCC. Deze experimenten staan beschreven in bijlage-4.
- **Modellen voor experimentele levermetastasen.** Om het directe effect van TGF- β members op engraftment en uitgroei van (colon)-tumor cellen en/of fibroblasten te onderzoeken (co-) injecteren we de cellen in de milt en bestuderen uitgroei van de cellen in de lever. Deze experimenten staan beschreven in bijlage-5.

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.

De experimenten behorende bij doel-1 zullen zorgen voor fundamentele kennis over hoe TGF- β receptoren de initiatie en progressie van tumoren beïnvloeden. Huidige experimenten richten zich op [REDACTED]

[REDACTED] De opbouw in deze experimenten is dat de TGF- β member wordt uitgeschakeld in specifieke celtypen en gekeken of er een fenotype (poliep of tumorontwikkeling in de darm) optreedt. Als dat het geval is volgen studies naar het mechanisme hoe dit veroorzaakt wordt (interactie met immuuncellen, paracrine interactions met epitheel) *in vitro* en vervolg bewijs van de *in vitro* data *in vivo*. Hierbij worden dan ook de orthotope modellen gebruikt.

Met betrekking tot het tweede doel is er een duidelijke opbouw; het effect van anti-TGF- β therapie wordt bekeken op primaire tumor groei en metastasering, zowel in monotherapie als in combinatie met [REDACTED]. Door deze twee afzonderlijke doelen te combineren, kunnen we controle groepen (zowel placebo groepen als monotherapie groepen) combineren binnen hetzelfde experiment, wat het aantal benodigde dieren vermindert. Afhankelijk van effectiviteit wordt besloten of verdere experimenten [REDACTED] zinvol zijn.

De effectiviteit van TGF- β targeting als adjuvante therapie wordt eerst onderzocht in het darmkanker model als monotherapie. Op basis van eerdere experimenten in vergelijkbare modellen voor borstkanker verwachten wij hier sterke effecten. Afhankelijk van de resterende hoeveelheid tumor wordt besloten of een nieuw experiment met gecombineerde behandelingen zinvol wordt geacht. Met betrekking tot de [REDACTED] combinatie wordt eerst een pilot experiment uitgevoerd om het ongerief en effectiviteit van [REDACTED] vast te stellen. Pilot experimenten laten zien dat het ongerief ten gevolge van het [REDACTED] zeer beperkt is. Op basis van deze experimenten wordt besloten of de combinatie met bijvoorbeeld endoglin targeting getest gaat worden.

Met betrekking tot de fibrose-HCC gerelateerde experimenten wordt zowel het effect op fibrose alleen als op fibrose-geassocieerde HCC ~~wordt~~ onderzocht om een klinisch duidelijk beeld te krijgen waar de meeste winst te behalen valt. Aangezien wij op basis van ongepubliceerde *in vitro* bevindingen verwachten dat [REDACTED]

[REDACTED] eerste experiment dat gepland staat. Mocht dit geen effect blijken te hebben op de fibrose of fibrose-geassocieerde HCC worden de patient derived xenograft (PDX) experimenten en combinatiebehandelingen niet uitgevoerd.

Samenvattend gaat deze set van experimenten een duidelijk beeld geven over de in de kliniek te verwachten therapeutische effecten van anti-TGF- β therapie en de meest kansrijke combinaties van

medicatie om in klinische trials te onderzoeken.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Spontane en chemisch geïnduceerde tumor modellen
2	Orthotope tumormodellen
3	Subcutane tumor modellen
4	Orthotoop, fibrose gerelateerd hepatocellulair kanker model
5	Modellen voor experimentele metastasen
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.	AVD116002015271				
1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Leids Universitair Medisch Centrum				
1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.	<table><thead><tr><th>Volgnummer</th><th>Type dierproef</th></tr></thead><tbody><tr><td>1</td><td>Spontane en chemisch geïnduceerde tumor modellen</td></tr></tbody></table>	Volgnummer	Type dierproef	1	Spontane en chemisch geïnduceerde tumor modellen
Volgnummer	Type dierproef				
1	Spontane en chemisch geïnduceerde tumor modellen				

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.

Om een beter begrip te krijgen van de rol van verschillende celtypen in de darm bij het ontstaan van darmpoliepen, de progressie naar geavanceerde tumoren en uiteindelijk maligne ontarding (met invasie en metastasering als gevolg) in de context van veranderde Transforming Growth Factor- β gemedieerde signalering willen wij gebruik maken van cel-specifieke (conditionele) knockout/knockin muismodellen. Door het cel-specifiek uitschakelen/overactief maken van TGF- β signalering in transgene muislijnen, bijvoorbeeld alleen in de epitheliale cellen van de darmmucosa en/of mesenchymale/stromale cellen in de submucosa, zal de kennis over het ontstaansmechanisme en daaropvolgende progressie van darmpoliepen/-tumoren door veranderingen in TGF- β signalering toenemen. Dit is mogelijk door aan het eind van het experiment weefsels te isoleren voor nadere analyses in het laboratorium. Ook het meten van biomarkers in het bloed en het monitoren van het gewicht van de muizen gedurende de experimenten zijn belangrijke uitleesparameters. Therapeutisch (doel-2) willen we zien hoe het ingrijpen in vroege fasen van tumor ontwikkeling de tumorgroei kan inhiberen.

De resultaten van deze dierproeven kunnen uiteindelijk worden gebruikt om vroegtijdig (hoog-risico) precursoren van darmkanker te identificeren en classificeren. Verder kunnen we medicatie testen die specifiek ingrijpt op componenten van de TGF- β in vroege fasen van tumorigenese.

Primaire uitkomstmaten:

- Intestinale poliep- en tumorvorming (hoeveelheid poliepen in zowel dunne als dikke darm)
- Verstoring van de normale darmarchitectuur (zowel dunne als dikke darm op microscopisch niveau)
- Circulerende cytokines en immuunprofiel in perifere bloed

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.

Initiëren conditionele knockout:

- intraperitoneale (IP) of intraveneuze (IV) injectie (maximaal 5 keer, maximaal 0,1 ml/10 g lichaamsgewicht per injectie voor IP of 0.05 ml/10 g lichaamsgewicht voor IV) of orale sondevoeding (maximaal 5 keer, maximaal 100 microliter per keer)

Afnemen monsters voor analyse:

- Afneme van veneus bloed via staartvene (maximaal 5 keer, minstens 2 dagen interval en maximaal 25 microliter per bloedafname)
- Euthanasie door middel van toegestane euthanasie methodes (cervicale dislocatie, CO₂), met zo min mogelijk ongerief, waarna uitnemen van weefsels en serum voor verdere analyse in het laboratorium

Optioneel chemisch geïnduceerde tumoren (zie flowchart):

- Eenmalige IP toediening van het carcinogeen azoxymethaan (maximaal 0.1 ml/10 g lichaamsgewicht) om het proces van poliep initiatie, progressie naar invasief carcinoom en metastasering te versnellen met als doel het geobserveerde fenotype beter te kunnen beschrijven. Azoxymethaan is een gen muterend agens welke frequent wordt gebruikt in proefdieren om de mechanismen van darmkanker initiatie, progressie en chemopreventie te onderzoeken.
- 3 cycli van maximaal 7 dagen waarbij Dextran Sulfate Sodium (DSS) via het drinkwater wordt toegediend om darmontsteking te induceren en daarmee tumorigenese te versnellen. Indien de ontsteking te heftig is (beoordeeld op basis van **aanhoudend rectaal bloedverlies en gewichtsverlies (>10% in 1 dag)**) kan aantal cycli of duur cycli beperkt worden.

Optioneel monitoring poliepvorming:

- Volgen van poliepgroei door middel van endoscopie onder isofluraan anesthesie, maximaal 10 minuten, maximaal 1x per 2 weken.

Optioneel (na respons en indicaties voor betrokkenheid immuuncellen) behandelingen en/of depletieren immuunpopulaties:

- Depletieren van verschillende immuuncelpopulaties dmv antilichamen, die maximaal 1x per week, IP worden toegediend, maximaal 8 weken. Wordt uitgevoerd als er respons op therapie of invloed op immuuncellen zichtbaar is.
- Maximaal 4x per week in het geval van combinatietherapie, of 2 keer in geval van monotherapie, afhankelijk van de medicatie subcutane, IP (0.1 ml/10gr), of IV (maximaal 100 µl) toediening van medicatie of ██████████ (IP, IV of intratumoraal, maximaal 50 µl). Combinatie toegepast op basis van criteria uit flowchart.

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

Bij vergelijkbare dierproeven in het verleden bij onze afdeling werd een variërend aantal poliepen/tumoren gezien na (conditionele) knockout/-in van componenten van de TGF-β signalering. Uit de literatuur blijkt ook dat het te verwachten aantal gevormde poliepen/tumoren sterk kan variëren waardoor het op voorhand vaststellen van het aantal benodigde dieren om statistische betrouwbare resultaten te verkrijgen lastig is. Wij hebben een berekening gemaakt van het benodigde aantal muizen op basis van het gemiddelde effect van de laatste paar experimenten en hieruit blijkt bij een spreiding van 25%, een verwacht effect van 35%, een power van 90% bij een alpha van 0.05 dat de groepsgroottes 11 muizen zijn. Voorafgaand aan het daadwerkelijke experiment zullen protocollen worden geschreven ter beoordeling van de IVD waarin de groepsgroottes op basis van het pilot experiment, ervaring en statistische berekeningen zullen worden vermeld.

Een experiment bestaat doorgaans uit drie groepen: één knockout/-in groep, één controlegroep waarbij wel het inductiemiddel wordt geïnjecteerd maar waarbij knockout/-in niet mogelijk is doordat de transgen(en) afwezig zijn, één controlegroep met (alle) transgen(en) zoals de eerste groep maar niet geïnjecteerd met het inductiemiddel en er dus geen knockout/-in plaats zou mogen vinden. Het geschatte aantal te onderzoeken celtypen is ongeveer 5, het aantal genconstructen 5, met of zonder toediening van azoxymethaan en DSS. Het maximaal aantal experimenten dat zal worden uitgevoerd is 30 met ieder minstens 2 en maximaal 5 experimentele condities. Dit geeft maximaal 1650 dieren.

B. De dieren

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

Muizen, vanuit eigen fok. Cel type specifieke (bijv. fibroblast-, darmepitheel-, endotheel-, etc specifieke), induceerbare CRE muizen zullen worden gekruist met muizen waarin het gen van interesse gefloxed is. Indien een transgene muislijn van interesse niet beschikbaar is binnen ons instituut zal deze van een geregistreerde fokker worden gekocht.
(Jong)volwassen dieren vanaf 4-20 weken oud: maximaal 1650, zowel mannetjes als vrouwtjes muizen zullen 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.

Vervanging: Voordat een experiment met transgene muizen van start gaat zullen eerst onze hypothesen *in vitro* worden getest door middel van 2D (monolayer van darm(kanker)cellen) en 3D (intestinale organoïden) celkweek experimenten. In beide typen celkweek experimenten is het mogelijk om tot een redelijk niveau de *in vivo* situatie na te bootsen om zo een idee te krijgen of het te verwachten effect inderdaad plaats zal vinden. Echter zijn dergelijke kweeksystemen niet voldoende, omdat er veel meer celtypen, signaalstoffen en andere processen plaatsvinden in de darm waardoor in het verleden al veelvuldig is gebleken dat de *in vitro* resultaten niet te reproduceren zijn *in vivo*.

Vermindering: Ieder experiment zal degelijk worden opgezet en geëvalueerd worden of er verder wordt gegaan of dat verdere experimenten worden gestaakt. Hierna zal ieder experiment zorgvuldig worden uitgewerkt (inclusief degelijke power berekeningen) en besproken worden door leden van de onderzoeksgroep ervaren met dergelijke dierproeven vooraleer van start wordt gegaan met een vervolg experiment. Verder worden alleen muizen gebruikt met cel specifieke deleties waar we op basis van literatuur en eerdere experimenten voldoende aanleiding voor hebben. Tot slot hoeven we door het monitoren van poliepvorming dmv endoscopie geen muizen eerder op te offeren.

Verfijning: Het ongerief voor de proefdieren zal zo minimaal mogelijk worden gehouden door technisch ervaren en getraind personeel de dierproeven te laten uitvoeren. Tijdens de DSS cycli worden de muizen dagelijks gewogen om nauwkeurig het verwachte gewichtsverlies te kunnen monitoren en evt vroegtijdig de DSS toediening te kunnen beëindigen, wanneer het gewichtsverlies hiertoe aanleiding geeft. Met betrekking tot de andere modellen wordt tumorgroei nauwkeurig gemonitord door endoscopie onder kortdurende anesthesie, waardoor betere inschatting gemaakt kan worden van mogelijk ongerief. Deze muizen worden wekelijks gewogen.

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.

Bij ieder experiment zullen alle individuele muizen wekelijks nauwkeurig worden geobserveerd en gemonitord door de onderzoeker. Daarnaast zullen de proefdiervverzorgers standaard dagelijks de dieren bekijken en zo nodig contact opnemen met de onderzoeker. Zodoende wordt onverwacht ongerief spoedig vastgesteld en waar nodig onmiddellijk gestopt. Nadelige milieueffecten zijn alleen te verwachten wanneer gebruik wordt gemaakt van azoxymethaan omdat dit een schadelijk middel is voor mens en dier (genmuterend agens). Dit middel zal daarom alleen door ervaren personeel worden toegediend in een

hiervoor geschikte zuurkast. De proefdierverzorgers zullen tijdig op de hoogte worden gesteld en na toediening van het middel zullen de muizen voor minstens drie dagen in onderdruk worden gehuisvest in hun afzonderlijke IVC's. Al het materiaal (voer, bedding etc.) afkomstig van deze dieren zal de eerste drie dagen op een gecontroleerde wijze afzonderlijk worden afgevoerd. Hierna is er geen risico meer voor schade aan mens of dier.

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 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.

Omdat bij deze langdurige experimenten niet ingeschat kan worden bij welke knockout en wanneer het ongerief kan optreden is pijnbestrijding niet mogelijk. Verder kunnen morfinomemetica de darm peristaltiek beïnvloeden en zijn NSAIDs vanwege hun bloedverdunnende en onstekingsremmende werking niet te combineren met het DSS geïnduceerde ontstekingsmodel en kunnen dus niet gebruikt worden. Bij het optreden van rectale prolapsen of grote poliepen op basis van de endoscopie, leidend tot pijn zullen de dieren uit experiment worden genomen.

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?

De muizen zullen ongerief (stress, irritatie) kunnen ondervinden door de injecties of orale toediening van de middelen en door de bloedafnames. DSS geeft ontsteking van de dikke darm, waardoor bloederige ontlasting kan optreden.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De handelingen horende bij het experiment. DSS beschadigt specifiek het darmepitheel van de dikke darm.

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

De uit te voeren experimentele handelingen die ongerief kunnen veroorzaken zullen alleen uitgevoerd worden door getraind en ervaren personeel en tot een minimum beperkt worden. Muizen worden tijdens de DSS cycli dagelijks gemonitord en de humane eindpunten worden zorgvuldig in acht genomen.

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.

De Code of Practice kankeronderzoek in proefdieren zal in acht worden genomen. Het is onwaarschijnlijk dat de humane eindpunten die hierin beschreven staan worden bereikt. De dieren zullen worden geëuthanaseerd op het moment dat ze tekenen vertonen die aangeven dat ze pijn of ander ongerief ervaren zoals beschreven in de Code of Practice kankeronderzoek in proefdieren.

De muizen zullen worden opgeofferd bij sterk gewichtsverlies in korte tijd (>10% in 2-3 dagen, of >20% tov start experiment), aanhoudend rectaal bloedverlies **na de DSS cycli**, rectale obstructie (**ook beoordeeld dmv scapie beelden**). Ook als de muizen duidelijke tekenen van ongerief vertonen (zoals moeizame ademhaling, lethargisch gedrag of slechte vachtconditie of ander sterk afwijkend gedrag) worden de dieren uit experiment genomen. **De DSS cycli kunnen worden verkort of bij een te heftige ontsteking (>10% gewichtsverlies in een dag, hoge mate van rectaal bloedverlies beoordeeld door dierversorgers en onderzoeker).**

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

Alleen de proefdieren waar knockout/-in heeft plaatsgevonden lopen het risico om darmtumoren te ontwikkelen en kunnen daarom mogelijk deze eindpunten bereiken. Op basis van de eerdere dierproeven uitgevoerd door onze afdeling verwachten wij dat maximaal 10% van de proefdieren vroegtijdig geëuthanaseerd dient te worden omdat deze een humaan eindpunt heeft bereikt.

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.

Het ongerief wordt ingeschat op gering zonder toediening azoxymethaan (**maximaal 825 dieren**) en DSS en matig bij het wel toedienen van azoxymethaan en DSS (**maximaal 825 dieren**).

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.

De proefdieren worden gedood als onderdeel van het experiment om weefsels te isoleren en hierop onder andere immunologische analyses te kunnen doen in het laboratorium, of om verder ongerief te voorkomen doordat de darmtumoren verder groeien en invaderen/metastaseren.

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

1. Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
2. Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
3. Meer informatie vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
4. 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 |
|------------|-------------------------|
| 2 | Orthotope tumormodellen |

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.

Orthotope darm tumoren

Eerdere en lopende experimenten laten zien dat de er substantiële verschillen zijn tussen orthotope en subcutane tumoren. Vandaar dat het belangrijk is om verschillende therapieën en combinaties van therapieën te testen zowel in een orthotop als subcutaan model (zie bijlage 3). In ons lab hebben we een orthotop model voor CRC lopend, waarbij stukjes tumor gehecht worden op de caecale wand. Afhankelijk van de vraagstellingen gebruiken we hiervoor muis MC38 CRC cellen in C57/bl6 muizen of muis CT26 CRC cellen in Balb/c muizen. In dit model behoort resectie van de tumor tot de mogelijkheden. Een aanvullend nieuw model wat we willen opzetten is endoscopische injectie van deze cellen in de dikke darm van de muizen, de plaats waarbij bij mensen de meeste tumoren voorkomen. Het orthotope model geeft in tegenstelling tot het endoscopische model momenteel, meer mogelijkheden met betrekking tot resectie van de primaire tumor en transplantatie van tumor stukjes. In beide modellen wordt tumorgroei en metastasering gevolgd door middel van bioluminescentie. In deze modellen willen we progressie en metastasering van tumoren volgen en therapeutische interventies testen. Hierbij wordt zowel gekeken naar monotherapie als combinaties van bestaande en nieuwe therapieën en het mechanisme hoe deze therapieën werken. Zowel behandeling van primaire tumoren als na resectie van de primaire tumor wordt gekeken (adjuvante behandeling, klinisch zeer relevant).

Primaire uitkomstparameters;

- Tumorgroei op basis van bioluminescentie en na offeren tumor gewicht en volume
- Metastasering op basis van bioluminescentie
- Immunrespons en activatie in bloed, organen en tumoren (in geval van immunotherapie)

Orthotope pancreas tumoren

Vanwege de hoge activiteit van de TGF- β pathway in pancreastumoren en hoge expressie van componenten uit de TGF- β pathway *in vitro* ligt hier veel therapeutische ruimte. Voor deze experimenten worden de muizen orthotoop ingespoten met humane BXP3 cellen al dan niet in combinatie met tumor geassocieerde fibroblasten (in immunodeficiënte Balb/c nude muizen) of KPC3 muizen pancreas tumorcellen (Kras G12D, P53 -/- cellen in C57/bl6 muizen voor studies in immuuncompetente muizen. Alle tumorcellen brengen luciferase tot expressie waardoor *in vivo* imaging van tumorgroei mogelijk is.

Primaire uitkomstparameters:

- Tumorgroei op basis van bioluminescentie en na opofferen tumor gewicht en volume
- Metastasering op basis van bioluminescentie
- ██████████ en activatie in bloed, organen en tumoren (in geval van ██████████)

Orthotoop vulva model:

Onze *in vitro* experimenten en analyse van patiëntmateriaal hebben laten zien dat er mogelijk groot therapeutisch potentieel is van targeting van de TGF- β signaaltransductieroute. Om zo nauwkeurig mogelijk de klinische situatie na te bootsen hebben wij een orthotoop model voor vulvatumoren opgezet. Dit muismodel willen we gebruiken om therapeutische interventies te testen. Tevens willen we dit model verder ontwikkelen om te bekijken of we ook een resectie van de tumoren kunnen doen, om zo de klinische situatie van post-operatieve recidieven en metastasering te benaderen. Primaire uitkomst parameters van deze experimenten zijn:

Primaire uitkomstparameters:

- Tumorgroei op basis van bioluminescentie en na opofferen tumor gewicht en volume
- Metastasering op basis van bioluminescentie
- ██████████ in bloed, organen en tumoren (in geval van ██████████)

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.

Orthotope darm tumoren

Donormuizen:

- Subcutane injectie van tumorcellen in beide flanken van de muis, maximaal 200 μ l per injectie in zoutoplossing
- Regelmatig (maximaal drie maal per week) hanteren voor tumor meting via caliper. Muizen worden geëuthanaseerd als de tumor 500 mm³ is, **angezien dit de grootte is nodig om te kunnen transplanteren zonder necrose in de tumor.**

Operatie orthotoop model:

- 30 minuten voor de operatie krijgen de dieren pijnbestrijding in de vorm van buprenorfine injectie subcutaan, maximaal 0.1 ml/10gr.
- Operatie vindt plaats onder geschikte anesthesie (isofluraan).
- Buikholte van de muis wordt geopend vervolgens wordt het caecum blootgelegd en een stukje van 2-3 mm³ tumor uit een subcutane donor getransplanteerd mbv resorbeerbaar hechtdraad
- Buikwand en de huid worden afzonderlijk gehecht met resorbeerbaar hechtdraad
- Tumor groei wordt gevolgd via bioluminescente imaging (totale duur maximaal 10 minuten, maximaal 2 keer per week, maximaal 10 weken)
- IP injectie (0.1 ml/10gr) luciferin, isofluraan anesthesie en imaging gedurende 1 min

Optioneel: Tumor resectie model (beschreven door Metildi et al 2014):

- Tumoren worden verwijderd uit het orthotoop model tussen de 7 en 20 dagen afhankelijk van de groei van de tumor (op basis van BLI signaal) na tumor initiatie.
- 30 minuten voor de operatie krijgen de dieren pijnbestrijding in de vorm van buprenorfine injectie subcutaan, maximaal 0.1 ml/10gr.
- Operatie vindt plaats onder anesthesie middels isofluraan.
- Buikholte van de muis wordt geopend vervolgens wordt het caecum blootgelegd het onderste gedeelte van het caecum met de primaire tumor wordt afgebonden met een stuk resorbeerbaar hechtdraad.
- Tumor wordt verwijderd door het stuk van het caecum met de tumor af te knippen.
- Caecum wordt schoon gemaakt met PBS en gesteriliseerd met jodium en terug geplaatst in de

buikholte.

- Buikwand wand en de huid worden afzonderlijk gehecht met resorbeerbaar hecht draad
- Tumor groei (recurrence primaire tumor en groei metastasen) wordt gevolgd via bioluminescente imaging, maximaal 2x per week, maximaal 6 weken na resectie
- IP injectie met 0.1 ml/10gr luciferin, isofluraan anesthesie en imaging gedurende 1 min

Toediening van therapeutische neutraliserende of depletende antilichamen via een van de volgende routes:

- Subcutane, IP of IV (maximaal 4 keer per week (combinatie therapie, anders maximaal 2 keer per week), maximaal 0.1ml/10g lichaamsgewicht, afhankelijk van toedieningsroute)
- Behandeling met [REDACTED] (IP, IV (max 100 µl) of intratumoraal (max 50 µl),

Endoscopisch orthotoop model (beschreven door: Zigmond et al 2011):

- Endoscopie maximaal 1x per week onder isofluraan anesthesie, 1 sessie duurt maximaal 10 minuten
- Injecties van tumor cellen tijdens de scopie via de endoscoop in de dikke darm van de muis, maximaal 2x in een zoutoplossing 50ul
- Nemen van een biopsie tijdens reguliere endoscopie maximaal 4x met een interval van minimaal 1 week
- Tumor groei wordt gevolgd via bioluminescente imaging
- IP injectie met 0.1 ml/10gr luciferin, isofluraan anesthesie en imaging gedurende 1 min

Monsterafname in orthotoop caecum en endoscopisch model

- Bloedafname via staartvene (maximaal 6 keer, minstens 2 dagen interval, maximaal 25 microliter per bloedafname)
- Euthanasie door middel van toegestane euthanasie methodes (cervicale dislocatie, CO₂) met zo min mogelijk ongerief, waarna uitnemen van weefsels en serum *in vitro* analyse in het laboratorium

Optioneel: 24h voorafgaand aan opofferen, ten behoeve van imaging

- IV injectie van fluorescent gelabelde antilichamen, die geschikt zijn voor intra vitale beeldvormende technologie
- Imaging onder de IVIS onder isofluraan anesthesie

Optioneel: Toediening van inductiemiddel om conditionele knockout te initialiseren via een van de volgende routes:

- IP of IV injectie (maximaal 5 keer, maximaal 0,1 ml/10 g lichaamsgewicht per injectie)
- Orale sondevoeding (maximaal 5 keer, maximaal 100 microliter per toediening)

Orthotoop pancreas model:

Plaatsen van orthotope tumoren

- 30 minuten voor de operatie krijgen de dieren geschikte pijnbestrijding
- Operatie vindt plaats onder geschikte anesthesie.
- Huid en buikwand worden geopend zodat pancreas zichtbaar is, waarna eenmalig maximaal 50 µl in de pancreas wordt geïnjecteerd.
- Buikwand en de huid worden afzonderlijk gehecht met resorbeerbaar hecht draad

Monitoren van tumorgroei:

- Muizen worden ingespoten met maximaal 0.1 ml/10g luciferine en onder isofluraan anesthesie gebracht waarna ze gedurende 1 minuut worden geimaged. Uiterlijk 6 weken na start van het experiment worden de muizen opgeofferd.
- Bloedafname via staartvene (maximaal 4 keer, minstens 2 dagen interval, maximaal 25 microliter per bloedafname)

Behandeling:

- Maximaal 4x per week in geval van combinatietherapie, of 2 keer in geval van monotherapie, afhankelijk van de medicatie subcutane, IP (0.1 ml/10gr) of IV (maximaal 100 µl) toediening van medicatie of [REDACTED] (IP, IV (max 100 µl) of intratumoraal (max 50 µl)

Einde experiment:

- Injecteren IV van CW-800 gelabelde antilichamen voor tumor visualisatie, max 100 µl via staartvene, 24h voor opofferen

- Euthanasie door middel van toegestane euthanasie methodes (cervicale dislocatie, CO₂) met zo min mogelijk ongerief, waarna uitnemen van weefsels en serum *in vitro* analyse in het laboratorium.

Orthotoop vulva model:

Orthotope injectie van tumorcellen:

- Anesthesie onder geschikte anesthesie (isofluraan)
- Injectie van humane vulva tumor cellen in de vulva van de muis, 10 µl injectie per muis

Behandeling:

- IP injectie met neutraliserende antilichamen, maximaal 4x per week voor combinatie behandelingen en 2x per week voor monotherapie, maximaal 0.1 ml/10gr

Monitoren tumorgroei en bioluminescente imaging:

- IP injectie met maximaal 0.1 ml/10g luciferine
- Isofluraan anesthesie en imaging, maximaal 10 min per keer, maximaal 1 keer per week voor maximaal 10 weken
- Bloedafname via staartvene (maximaal 4 keer, minstens 2 dagen interval, maximaal 25 microliter per bloedafname)

Einde experiment:

- Euthanasie door middel van toegestane euthanasie methodes (cervicale dislocatie, CO₂) met zo min mogelijk ongerief, waarna uitnemen van weefsels en serum voor *in vitro* analyse in het laboratorium

Optioneel: fluorescente imaging indien dit meer informatie verschaft over target lokalisatie/expressie:

- IV injectie van fluorescent gelabelde antilichamen, maximaal 100 µl in staartvene, 24h voor opofferen. Imaging in IVIS of PEARL imaging systeem onder isofluraan anesthesie, waarna de muis opgeofferd wordt.

Optioneel tumor resectie om effecten op metastasering na verwijderen primaire tumor te bekijken:

- Subcutane injectie met buprenorfine pre-operatief ter voorkoming van post-operatieve pijn, maximaal 0.1 ml/10gr lichaamsgewicht IP
- Geschikte anesthesie (Isofluraan) voor de duur van de operatie
- Chirurgische verwijderen van de primaire tumor, hechten van de wond
- Volgen van metastasering door middel van bioluminescente imaging (zie boven).

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

Darmkanker model:

Voor de tumor experimenten ligt de spreiding rond de 25%, het verwachte effect op tumorvolume is 35%, bij een power van 90% en een alpha van 0,05 wordt de groepsgrootte 11 muizen. Een experiment bestaat doorgaans uit twee controle groepen (positieve en negatieve) en 4 of 5 experimentele condities, zodat een tumor experiment uit 66 muizen bestaat. De tumortake in de modellen is minimaal 90% gebaseerd op voorgaande experimenten, waardoor aantal muizen (6 groepen, 10% uitval/geen tumortake) op 73 per experiment komt. Wij hebben de berekening voor het totale geschatte aantal berust op de aantallen die in de afgelopen jaren gebruikt zijn, gecombineerd met de hoeveelheid projecten dat de komende jaren gefinancierd is.

Het maximaal aantal experimenten dat uitgevoerd zal worden is 25 experimenten (combinatie therapieën maximaal 15 experimenten, resectie experimenten maximaal 10. Dit is gezien de vraagstelling van effectiviteit en beschikbare mankracht en middelen een reële schatting. Hierdoor komt de maximale totale hoeveelheid muizen op 1825.

Pancreastumor model:

Voor aanvang van een experiment wordt met behulp van power analyse bepaald wat de statistisch verantwoorde groepsgrootte is. Ervaring leert dat de spreiding 25% is, het verwachte effect 35%, bij een power van 90% en een alpha van 0,05 wordt de groepsgrootte dan 8 muizen. De tumortake in de modellen

is 95-100%.

Een experiment bestaat doorgaans uit maximaal 6 groepen, zodat een experiment uit 48 muizen bestaat. Wij hebben de berekening voor het geschatte aantal berust op de aantallen die in de afgelopen jaren gebruikt zijn, gecombineerd met de hoeveelheid projecten dat de komende jaren gefinancierd is, en de behandelingen die wij verwachten te gaan testen. Wij verwachten maximaal 20 experimenten te doen, waardoor het totaal op maximaal 980 dieren uitkomt

Vulvatumor model:

De groepsgroottes worden bepaald op basis van eerdere ervaringen met dit soort experimenten en powerberekeningen op basis van te verwachten verschillen en variatie. Onderstaand is een schatting gemaakt van het aantal noodzakelijke dieren om deze vragen te kunnen beantwoorden. De exacte statistische berekeningen worden gemaakt voorafgaand aan het experiment op basis van de meest up to date informatie. Wij verwachten op basis van eerdere experimenten 10 muizen per groep nodig te hebben. Tumortake in dit model is minimaal 90%. We gebruiken 2 histologisch verschillende cel lijnen om onze onderzoeksvraag te kunnen beantwoorden. Dit geeft 22 muizen per groep. We willen 10 (combinaties van) therapeutica testen, wat neerkomt op 220 muizen totaal.

Voor de tumor resecties verwachten wij uitval van maximaal 10%, waardoor we op 24 muizen per groep uitkomen, waarbij we dezelfde therapieën testen. Hierdoor komt dit op 240 muizen. De imaging experimenten kunnen we aan het einde van de lopende experimenten doen en daardoor zijn geen extra dieren nodig. In totaal verwachten wij dus maximaal 460 muizen nodig te hebben voor deze experimenten.

B. De dieren

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

Voor de darmkankermodellen zullen we gebruik maken van immunocompetente C57/Bl6 muizen (MC38), of Balb/c muizen (CT26 cellen). Voor het pancreas model zullen we gebruik maken van C57/Bl6 muizen (KPC cellen komen uit C57/Bl achtergrond) en voor het vulvatumor model van immunodeficiënte Balb/c nude muizen (human xenografts). Voor combinatiestudies [REDACTED] zijn immunocompetente muizen nodig en daarom modellen met muis tumorcellen. Om effecten op humane cellen te bestuderen mag er geen adaptieve immuunsysteem aanwezig zijn om afstoting te voorkomen. De muizen zullen afkomstig zijn van geregistreerde fokkers of eigen fok, wanneer knock-out van bepaalde receptoren (bijvoorbeeld Fc receptor KO) noodzakelijk is. Volwassen dieren van 6-12 weken oud zullen gebruikt worden, maximaal 3265 dieren, zoals hierboven gemotiveerd. Zowel mannetjes als vrouwtjes zullen worden gebruikt voor de experimenten, uitgezonderd voor het vulva tumor model, waarbij alleen vrouwtjes gebruikt zullen worden.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging: beoogde behandeling worden eerst uitvoerig getest *in vitro*. Alleen wanneer daar aanwijzingen zijn voor werkzaamheid zal te vertaling naar *in vivo* experimenten gemaakt worden. Aangezien we voornamelijk geïnteresseerd zijn in de interactie tussen tumorcellen en de daar omheen liggende steuncellen, is het cruciaal om het gehele organisme in ogenschouw te nemen. Voor deze experimenten worden alleen de meest kansrijke (combinatie) van compounds getest, zoals we dit *in vitro* hebben bepaald en op basis van eerdere dierexperimenten. De medicatie wordt getest in reguliere en 3-dimensionale

celkweekmodellen.

Vermindering: groeps groottes zijn gebaseerd op eerdere experimenten en ervaring met dit model, waardoor een betere inschatting gemaakt kan worden van het benodigd aantal dieren. Na ieder experiment zal beoordeeld worden of de gebruikte behandeling genoeg effect laat zien voor vervolgonderzoek. Door gebruik te maken van endoscopische monitoring kunnen we het aantal dieren reduceren. Verder worden alleen muizen gebruikt met celspecifieke deleties waar we op basis van literatuur en eerdere experimenten voldoende aanleiding hebben om aan te nemen dat dit een cruciale rol kan spelen. Door het combineren van mono- met combinatietherapie kunnen dezelfde controlegroepen gebruikt worden binnen 1 experiment. Door de *in vivo* imaging is het niet nodig om muizen vroegtijdig op te offeren om tumorgroei te monitoren. Streng selectie van de therapeutica die in muizen getest worden heeft plaatsgevonden om het aantal dieren te verminderen. Na elk experiment wordt bekeken of de effecten sterk genoeg zijn om een vervolg te verantwoorden.

Verfijning: Personeel met veel technische ervaring met proefdieren en dit specifieke model zal de proeven uitvoeren. Door de imaging kunnen we tevens de muizen tijdig (bij grote tumoren of metastasen) uit het experiment halen voordat de dieren er veel last van krijgen. Door samenwerking met een groep die uitgebreide ervaring heeft met die model wordt kans op ongerief verminderd. Waar mogelijk wordt pijnbestrijding bij de muizen toegepast.

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.

Elke individuele muis wordt minstens tweemaal per week nauwkeurig geobserveerd en gemonitord door de onderzoeker. Daarnaast worden de muizen standaard dagelijks bekeken door de proefdierversorgers, en eventuele onverwachte problemen worden direct doorgegeven aan de betreffende onderzoeker. Zo kan onverwacht lijden worden vastgesteld en onmiddellijk gestopt. Nadelige milieueffecten worden niet verwacht.

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?

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.

Voor de operatie krijgen de muizen een buprenorfine injectie om de post-operatieve pijn te verminderen. Tijdens de imaging en endoscopie zijn de muizen onder anesthesie.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

De muizen kunnen ongerief ondervinden van de injecties van therapeutica en de bloedafname, zoals stress. Ze ondervinden stress door desoriëntatie na het ontwaken uit de anesthesie en licht ongerief door de subcutane tumorgroei. Tumorgroei, alsmede metastase groei kan matig ongerief met zich meebrengen.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De experimentele handelingen, behandeling, operatie, endoscopie, anesthesie.

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

Muizen die geopereerd worden krijgen pijnbestrijding en worden na de operatie dagelijks gemonitord tot de wond genezen is (4 tot 7 dagen) daarna worden ze minimaal tweemaal per week gemonitord.

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.

Muizen zullen worden opgeofferd bij sterk gewichtsverlies in korte tijd (>10% in 2-3 dagen, of >20% tov start experiment) en aanhoudend rectaal bloedverlies of rectale prolapsen. Ook als de muizen duidelijke tekenen van ongerief vertonen (zoals moeizame ademhaling, lethargisch gedrag of slechte vachtconditie of ander sterk afwijkend gedrag) worden de dieren uit experiment genomen. **Groei van metastasen op basis van bioluminescente imaging wordt gemonitord en bij signaal boven de detectielimiet (indicatie voor grote metastasen) wordt het experiment beëindigd.**

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

Op basis van onze ervaring zal ongeveer 10% van de dieren de humane eindpunten halen voor het einde van het experiment.

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.

Het ongerief geschat voor de verschillende modellen:

Subcutane donor muizen: licht ongerief (maximaal 100 muizen)

Orthotoop transplantatie modellen: matig ongerief

Orthotoop resectie model: matig ongerief (Totaal matig ongerief maximaal 3165 dieren)

Orthotoop endoscopisch model: matig 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.

De muizen worden gedood als onderdeel van het experiment om tumorvorming en -morfologie te kunnen analyseren

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.	11600				
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Leids Universitair Medisch Centrum				
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>3</td> <td>Subcutane tumor modellen</td> </tr> </tbody> </table>	Volgnummer	Type dierproef	3	Subcutane tumor modellen
Volgnummer	Type dierproef					
3	Subcutane tumor modellen					

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.

Subcutane tumormodellen hebben als voordeel dat ze een snelle methode zijn om de effectiviteit van therapieën te kunnen bepalen. Voordeel ten opzichte van de orthotope modellen is dat dit vaak sneller gaat en met minder ongerief voor de muizen omdat de tumorgroei eenvoudig gemonitord kan worden en er minder invasie optreedt. Verder is dit model geschikt om patient derived xenografts (PDX) te testen. Voordeel hiervan is dat de effectiviteit direct wordt getest op humane tumoren in muizen. Nadeel is de afwezigheid van een volwaardig immuunsysteem, waardoor deze component niet wordt meegenomen, in combinatie met de beperkte metastasering van subcutane modellen.

Primaire uitkomst parameters:

- Tumor groei of eradicatie
- Circulerende cytokines en immuuncellen uit bloed

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.

Subcutane tumoren:

- Tumor inductie: muizen worden in de flank geïnjecteerd met tumorcellen, maximaal in 200 µl fysiologisch zoutoplossing.
- Behandeling: zodra er palpabele tumoren zijn wordt de behandeling gestart via IP, IV of subcutane injectie, maximaal 2x (monotherapie) of 4x per week (combinatie therapie) voor maximaal 10 weken. Voor combinatie therapie met [REDACTED] (IP, IV (max 100 µl) of intratumoraal (max 50 µl).
- Bloedafname via staartvene (maximaal 6 keer, minstens 2 dagen interval, maximaal 25 microliter per bloedafname).
- Meten van de tumoren via palpatie en schuifmaat metingen, 2x per week.
- Euthanasie door middel van toegestane euthanasie methodes (cervicale dislocatie, CO₂) met zo min

mogelijk ongerief, waarna uitnemen van weefsels en serum voor verdere analyse in het laboratorium

Patient derived xenografts:

- Onder geschikte anesthesie plaatsing stukjes humane tumor subcutaan.
- Hechten van de incisie.
- Behandeling, monsterafname en monitoren tumorgroei als boven beschreven.

Monsterafname en einde experiment voor beiden:

- Bloedafname via staartvene (maximaal 4 keer, minstens 2 dagen interval, maximaal 25 microliter per bloedafname)
- Euthanasie door middel van toegestane euthanasie methodes (cervicale dislocatie, CO₂) met zo min mogelijk ongerief, waarna uitnemen van weefsels en serum *in vitro* voor analyse in het laboratorium.

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

Op basis van eerdere experimenten en de geobserveerde verschillen (verwachting van 35% verschil met een variatie van 30%) verwachten wij op basis van power berekeningen experimenten te doen met maximaal 16 muizen per groep, aangezien we weinig uitval verwachten, maar wel variatie in tumorgrootte. Gemiddeld gezien zullen de experimenten uit 4 groepen (controle-monotherapie x 2-combinatietherapie) bestaan en verwachten wij voor het testen van onze mono – en combinatie therapieën 20 experimenten op basis van de tumormodellen van interesse en depletie van effectorcellen bij bewezen effectiviteit) uit te voeren. Totaal hebben we dan maximaal 1280 muizen nodig voor deze experimenten.

B. De dieren

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

Afhankelijk van de gekozen tumorcellen (KPC (muis pancreas) / MC38/CT26 (beide muis CRC) / patient derived xenografts) hebben we respectievelijk C57/Bl6, Balb/c of immunodeficiënte balb/c nude muizen nodig van 6-10 weken oud. Voor mechanistische studies kunnen specifieke knockout muizen nodig zijn. Zowel mannetje als vrouwtjes zullen gebruikt worden. Maximaal 1280 muizen zullen gebruikt worden.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging: Alle therapeutica zijn uitvoerig *in vitro* in 2 dimensionale en in 3 dimensionale organoid systemen getest en alleen de meest kansrijke combinaties zullen getest worden *in vivo*. **Aangezien we de interacties tussen verschillende celtypen willen onderzoeken is een volledig organisme noodzakelijk om processen zoals tumorgroei, inductie van angiogenese, recruitment van immuuncellen, activatie van fibroblasten te kunnen analyseren.**

Vermindering: Groepsgroottes zijn gebaseerd op eerdere experimenten en ervaring met dit model, waardoor een betere inschatting gemaakt kan worden van het benodigd aantal dieren. Na ieder experiment zal beoordeeld worden of de gebruikte behandeling genoeg effect laat zien voor vervolgonderzoek.

Verfijning: Personeel met veel technische ervaring met proefdieren en dit specifieke model zal de proeven uitvoeren waardoor het ongerief voor de dieren zo beperkt mogelijk blijft. Wanneer de tumor 1000 mm³ wordt de muis om de dag gemonitord om mogelijk ongerief voor te zijn.

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.

Dieren worden nauwkeurig gemonitord en op het moment dat de tumoren groter dan 1.5 cm³ worden, worden ze de dieren uit experiment genomen. De muizen worden 2 maal per week gewogen en beoordeeld door de onderzoekers en dagelijks door de proefdierversorgers. Alle handelingen worden uitgevoerd door ervaren onderzoekers.

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 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?

Er kan bij de muizen stress optreden ten gevolge van de het hanteren van de dieren, het meten van de tumoren en toedienen van de behandeling.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De oorzaken zijn de aard van de (be-) handelingen.

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

Alle handelingen worden uitgevoerd door ervaren onderzoekers en het hanteren van de dieren wordt zoveel mogelijk beperkt.

J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Het experiment wordt uitgevoerd met inachtneming van de code-of-practise kankeronderzoek. Bij sterk gewichtverlies (10-15% in korte tijd of meer als 20% tov start van het experiment worden de dieren uit experiment genomen. Ook als de muizen duidelijke tekenen van ongerief vertonen (zoals moeizame ademhaling, lethargisch gedrag of slechte vachtconditie), of als de tumor boven de 1500 mm³ is gegroeid worde de muizen uit experiment genomen. Als de tumor groter dan 1000 mm³ is wordt de muis om de dag gemeten, zodat de tumor nooit groter dan 1500 mm³ kan worden, overeenkomstig de Code of Practice kankeronderzoek in proefdieren.

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

In voorgaande experimenten bleek dat slecht een klein gedeelte van maximaal 5% deze eindpunten haalt.

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.

Het ongerief van deze experimenten wordt ingeschat als gering.

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.

Om de tumoren te verzamelen en histologisch te analyseren is dit noodzakelijk. Het in leven houden van dieren met tumoren geeft onnodig ongerief aan de dieren.

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 |
|------------|---|
| 4 | Orthotoop, fibrose gerelateerd hepatocellulair kanker 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.

In patiënten wordt vaak gezien dat leverfibrose kan leiden tot het hepatocellulair carcinoom. *In vitro* studies laten een rol zien voor de TGF- β pathway in dit proces. Vandaar dat we therapeutische interventies in het proces van fibrose naar maligne onttaarding willen testen in dit model. Dit model is recent beschreven in Nature protocols (Reiberger et al Nat Prot 2015; vol 10, issue 8:1264-1274) en na injectie van de cellen in fibrotische achtergrond zeer representatief voor de humane pathogenese.

Primaire uitkomst parameters zijn:

- mate van fibrose op basis van histologische analyses en bloed analyses
- tumorgroei op basis van bioluminescentie

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 dieren zullen de volgende behandelingen ondergaan:

- 12 weken CCL₄ toediening, 3 keer per week orale sondevoeding, 20% oplossing, maximaal 150 μ l per toediening voor het induceren van leverfibrose
- Bloedafname via de startvene, maximaal 4x met minimaal 1 week tussenposen, maximaal 25 μ l/keer om leverfunctie/mate van fibrose te bepalen dmv metingen van leverenzymen

Optioneel operatie en injectie van muis HCC cellen:

- subcutane injectie van pijnstilling (0.1 ml/10 gr lichaamsgewicht maximaal)
- Geschikte anesthesie
- Openen van de buikholte en injectie van 20 μ l HCC cellen/matrigel oplossing onder het leverkapsel

- Hechten van de muizen met oplosbaar hechtdraad

Optioneel imaging van HCC tumoren (wekelijks vanaf 2 weken na operatie):

- IP injectie met 0.1 ml/10gr luciferine oplossing wekelijks
- Geschikte anesthesie
- imaging van tumorcellen onder met behulp van bioluminescentie.

Behandeling:

- Maximaal 4x per week in geval van combinatietherapie, of 2 keer in geval van monotherapie, afhankelijk van de medicatie subcutane, IP (0.1 ml/10gr) of IV(maximaal 100 µl) toediening van medicatie of ██████████ (IP, IV (max 100 µl) of intratumoraal (max 50 µl), maximaal 10 weken na operatie.

Monsterafname en einde experiment:

- Bloedafname via staartvene (maximaal 4 keer, minstens 2 dagen interval, maximaal 25 microliter per bloedafname)
- Euthanasie door middel van toegestane euthanasie methodes (cervicale dislocatie, CO₂) met zo min mogelijk ongerief, waarna uitnemen van weefsels en serum *in vitro* voor analyse in het laboratorium

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

Op basis van gepubliceerde data (Reiberger et al Nat Prot 2015; vol 10, issue 8:1264-1274) met dit model is een uitval van 5% te verwachten door de CCL4 behandeling en minimaal 90% tumor take. Omdat we inschatten 8 muizen per behandelde groep nodig te hebben om statistisch voldoende power te hebben, hebben we met de uitval 9 muizen per groep nodig. Aangezien we verschillende therapeutica in monotherapie en in combinatie willen testen verwachten we gemiddeld gezien 6 experimentele groepen per experiment te hebben en in totaal 15 experimenten uit te voeren. In totaal zouden we dan 831 muizen nodig hebben voor deze experimenten.

B. De dieren

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

Mannelijke C3H muizen van een geregistreerde leverancier, 4-5 weken oud, vanwege de transplantatie van de HCA3 cellen en de betere fibrotische respons in mannelijke muizen dan in vrouwtjes (Reiberger et al). Maximaal 831 muizen zullen gebruikt worden voor deze 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: De therapeutische antilichamen die getest worden in dit model zijn reeds uitvoerig getest *in vitro* in celweek modellen en in 3 dimensionale organoid modellen. Hierbij worden alleen de meest veelbelovende kandidaten verder getest *in vivo*. Verder zijn de modellen zo gekozen dat ze nauw aansluiten bij de klinische situatie.

Aangezien we de interacties tussen verschillende celtypen willen onderzoeken is een volledig organisme noodzakelijk om processen zoals tumorgroei, inductie van angiogenese, recruitment van immuuncellen, activatie van fibroblasten te kunnen analyseren.

Vermindering: Door de *in vivo* imaging hoeven we niet voor het einde van het experiment muizen op te offeren om tumorgroei te analyseren, waardoor minder muizen nodig zijn. Na elk experiment wordt bekeken of de effecten sterk genoeg zijn om een vervolg te verantwoorden.

Verfijning: De muizen ontvangen pijnstilling om de post-operatieve pijn te verminderen. Verder geeft het monitoren van tumorgroei ook een betere welzijnsbewaking van de muizen, aangezien we snelle groei en eventuele metastasen kunnen identificeren op basis van bioluminescentie.

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 muizen worden uitsluitend behandeld door getraind en ervaren personeel. Het hanteren van de dieren wordt beperkt tot het strikt aantal noodzakelijke handelingen.

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 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.

Er wordt pre-operatieve pijnbestrijding gegeven door buprenorfine injectie. Verder worden de operatie en imaging gedaan onder inhalatie anesthesie (isofluraan).

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Door de behandelingen en het hanteren van de muizen kan stress optreden. Door de anesthesie kunnen de muizen gedesoriënteerd zijn, maar ten opzichte van injectie anesthesie is deze methode sneller en komen de muizen sneller bij. CCL4 toediening kan ook ongerief veroorzaken door het hepatotoxische effect.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De aard van de (be)handelingen.

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

De handelingen worden uitgevoerd door getraind en ervaren personeel. Verder worden de muizen nauwkeurig gemonitord door de proefdierverzorgers en minimaal 2 keer per week door de onderzoekers.

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.

Dit experiment wordt uitgevoerd in overeenstemming met de code-of-practice kankeronderzoek. De eindpunten die gehanteerd worden is sterk gewichtsverlies in korte tijd 10-15% in 2-3 dagen of meer als 20% tov start van het experiment. Ook als de muizen duidelijke tekenen van ongerief vertonen (zoals moeizame ademhaling, lethargisch gedrag of slechte vachtconditie of ander sterk afwijkend gedrag) worden de dieren uit experiment genomen. **Groei van metastasen op basis van bioluminescente imaging wordt gemonitord en bij signaal boven de detectielimiet (indicatie voor grote metastasen) wordt het experiment beëindigd.**

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

Wij verwachten dat ongeveer 20% van de dieren een van deze eindpunten gaan bereiken.

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.

Wij verwachten matig ongerief voor de dieren in dit experiment.

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.

Om het lijden te verminderen van de dieren en om de tumoren te kunnen analyseren is het doden van de dieren essentieel.

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 |
|------------|--|
| 5 | Modellen voor experimentele metastasen |

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.

Voor de metastaserende fase van colorectale tumor progressie zijn weinig goede modellen beschikbaar. Vandaar dat er vaak gebruikt gemaakt wordt van modellen voor experimentele metastasen. Voor dikke darmkanker (CRC) is injectie van tumorcellen in de milt een vaak gebruikt model. Luciferase gelabelde cellen worden, al dan niet in combinatie met tumor-geassocieerde fibroblasten, in de milt geïnjecteerd en vormen metastasen in de lever, de plek waar dit bij patiënten met CRC ook vaak wordt waargenomen. Binnen deze experimenten willen we testen of we door het targetten van de TGF- β pathway voornamelijk door middel van neutraliserende antilichamen dit kunnen verminderen.

Primaire uitkomst parameters:

- Grootte en bioluminescentie signaal van de tumoren

Optioneel voor immunotherapie gerelateerde studies:

- in bloed

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.

Milt injecties:

- Geschikte anesthesie, openen van de huid en buikwand
- Injectie van tumorcellen in de milt, maximaal 50 μ l
- Hechten van buikwand en huid afzonderlijk

Behandelingen:

- Maximaal 4x per week (combinatie therapie) of 2x per week (monotherapie door IP, IV of subcutane injecties) afhankelijk van de te testen medicatie.

Monsterafname en einde experiment:

- Bloedafname via staartvene (maximaal 4 keer, minstens 2 dagen interval, maximaal 25 microliter per bloedafname)
- Euthanasie door middel van toegestane euthanasie methodes (cervicale dislocatie, CO₂) met zo min mogelijk ongerief, waarna uitnemen van weefsels en serum voor *in vitro* analyse in het laboratorium.

Imaging:

- IP injectie met luciferine (maximaal 0.1 ml/10 gr) en geschikte anesthesie, maximaal 4 weken, maximaal 2x/week om metastase groei te monitoren. Imaging 1 min, totale duur anesthesie maximaal 10 minuten.

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

Voor de experimenten verwachten wij een verschil van minimaal 30% met een variatie van 20%, waardoor we 10 muizen per groep nodig hebben. Wij verwachten maximaal 6 groepen per experiment te testen, ook doordat we combinaties van tumorcellen met tumor-geassocieerde fibroblasten willen testen. Omdat we effecten op humane cellen in xenografts en syngeneic voor de combinatie met immunotherapie willen testen (beide 5 experimenten) verwachten we maximaal 600 muizen nodig te hebben voor deze experimenten.

B. De dieren

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

8-10 weken oude balb/c nude muizen voor HT29 xenografts, en 8-10 weken oude C57/Bl6 voor syngeneic MC38 injecties, beide van geregistreerde leveranciers. Zowel mannetjes als vrouwtjes zijn geschikt voor deze experimenten. In totaal verwachten we maximaal 600 muizen te gebruiken.

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: Alle medicatie is van tevoren getest *in vitro* in 2 dimensionale migratie en invasie assays alsmede 3-dimensionale systemen, om de effecten op metastaserende cellen te kunnen inschatten voorafgaand aan muizenexperimenten. **Omdat metastasering een complexe interplay is tussen verschillende tumor en host cellen in een volledig organisme nodig om dit proces na te kunnen bootsen.**

Vermindering: Alleen de meest potente therapeutica worden getest *in vivo*. Door de selectie van de modellen is met een minimaal aantal dieren een goede voorspelling te maken voor de klinische effecten in patiënten. Na elk experiment wordt bekeken of de effecten sterk genoeg zijn om een vervolg te verantwoorden.

Verfijning: De dieren worden nauwkeurig gemonitord door de onderzoekers en dierverzorgers en bij

tekenen van ernstig ongerief uit experiment genomen om verder lijden te voorkomen. De imaging van de metastasen zorgt voor een goede inschatting van groei van metastases en mogelijk naderend ongerief.

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.

Nauwkeurige monitoring door de proefdierverzorgers (dagelijks) en onderzoekers (tweemaal per week). Handelingen en operaties worden uitsluitend door getraind personeel uitgevoerd. Post-operatief worden de dieren in de eerste uren gemonitord om milt bloedingen te kunnen detecteren. Nadelige milieueffecten worden niet verwacht.

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 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.

De groei van metastasen kan aanleiding geven tot pijn, al hebben we dit niet geobserveerd in eerdere experimenten. Omdat het moment niet ingeschat kan worden bij welke knockout en wanneer het ongerief kan optreden is pijnbestrijding niet mogelijk. Verder kunnen morfinomemetica de darm peristaltiek beïnvloeden en zijn NSAIDs vanwege hun bloedverdunnende en ontstekingsremmende werking niet te combineren met onze vraagstellingen. Mocht er tekenen van pijn optreden (zoals bol zitten en andere

kenmerken op te stellen in overleg met de IVD en dierenarts) worden de dieren conform de eindpunten uit experiment genomen.

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?

Door het hanteren van de dieren en de anesthesie voor de wekelijkse imaging kunnen de dieren stress ondervinden. De injectie van de cellen in de milt kan aanleiding geven tot bloedingen. Mocht dit gebeuren en de bloeding niet te stelpen zijn wordt de muis uit experiment genomen.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De aard van de behandelingen.

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

Handelingen worden uitsluitend door getraind personeel uitgevoerd en de frequentie wordt tot een minimum beperkt.

J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Het experiment wordt uitgevoerd met inachtneming van de code-of-practice kankeronderzoek. Bij sterk gewichtverlies (10-15% in korte tijd of meer als 20% tov start van het experiment worden de dieren uit experiment genomen. Ook als de muizen duidelijke tekenen van ongerief vertonen (zoals moeizame ademhaling, lethargisch gedrag of slechte vachtconditie of ander sterk afwijkend gedrag) worden de dieren uit experiment genomen. **Groei van metastasen op basis van bioluminescente imaging wordt gemonitord en bij signaal boven de detectielimiet (indicatie voor grote metastasen) wordt het experiment beëindigd.**

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

Wij verwachten dat dit bij maximaal 10% van de dieren het geval zal zijn voor het einde van het experiment.

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.

Wij verwachten maximaal matig ongerief voor de dieren.

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.

Vanwege de analyse van de ontstane metastasen en de voortdurende groei van de metastases, met ernstig ongerief mogelijk als gevolg.

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: AVD116002017858
2. Titel van het project: Onderzoek naar de rol en therapeutische potentie van de Transforming Growth Factor- β signaaltransductie route in progressie en metastasering van solide tumoren.
3. Titel van de NTS: Identificeren van nieuwe therapeutische aangrijpingspunten om tumorgroei en uitzaaiingen te verminderen.
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
 - wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: DEC Leiden
 - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
 - e-mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: 24-02-2017
 - aanvraag compleet: 24-02-2017
 - in vergadering besproken: 23-03-2017 en 13-04-2017
 - anderszins behandeld:
 - termijnonderbreking(en) van / tot: 04-04-2017 t/m 06-04-2017
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 06-04-2017
 - advies aan CCD: 20-04-2017
7. De IvD geeft aan dat de aanvrager de aanvraag 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
 - Datum: 04-04-2017
 - De DEC heeft bij de aanvrager aanvullende informatie ingewonnen met betrekking tot de titel, de go/no-go momenten, de motivatie voor de diersmodellen en de samenhang tussen deel 1 en deel 2.
 - Datum antwoord: 06-04-2017
Naar aanleiding van deze vragen is het projectvoorstel inclusief bijlage en de NTS door de aanvrager aangepast.
10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC)
 - N.v.t.

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 over deze projectaanvraag te adviseren. De benodigde expertise op dit wetenschappelijke terrein is aanwezig binnen de DEC.
4. Geen van de DEC leden is betrokken bij het betreffende project.

C. Beoordeling (inhoud)

1. Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. De aanvraag komt overeen met voorbeeld 1 uit de handreiking 'Wat is een project': De verschillende subdoelen zijn uitkomstafhankelijk van elkaar. Deze subdoelen zijn allemaal noodzakelijk om de doelstelling te behalen. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft duidelijk beschreven op basis van welke criteria deze zal besluiten het project wel of niet te continueren. De DEC is er daardoor van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.
2. Voor zover de DEC kan beoordelen is er geen sprake van tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van dit project is onderzoeken wat de rol is van de TGF- β signaaltransductieroute in initiatie, progressie en metastasering van solide tumoren en hoe hier therapeutisch op kan worden ingegrepen. Met als uiteindelijke doel het verkrijgen van aanknopingspunten voor het ontwikkelen van nieuwe behandelingsstrategieën voor mensen met darm-, pancreas-, lever- of vulvatumoren. De DEC is van mening dat er een duidelijke relatie is tussen het directe en uiteindelijk doel. De aanvrager heeft helder gemaakt wat de status is van het onderzoeksveld en dat de bijdrage van dit project aan het onderzoeksveld zal zijn. Uit de aanvraag blijkt dat eerder onderzoek heeft laten zien dat liganden en receptoren uit de TGF- β familie, van groot belang zijn in de interacties tussen verschillende celtypen in tumoren en kunnen leiden tot verhoogde invasiviteit en tumor metastasering. Maar het is nog niet bekend hoe deze interacties tot stand komen. De DEC is van mening dat het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld.
5. De belangrijkste belanghebbenden in dit project dat gericht is op fundamenteel onderzoeken hoe de TGF- β familie bijdraagt aan de interacties tussen epitheliale tumor cellen en het tumor stroma en hoe dit de progressie en metastasering van tumoren beïnvloedt zijn de proefdieren, de onderzoekers, de patiënten en de samenleving.
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 pijn ondergaan. Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: De onderzoekers zullen kennis verkrijgen. Ook zullen de carrièremogelijkheden van de onderzoekers verbeteren door publicaties.

Waarden die voor patiënten bevorderd worden: de nieuwe therapeutische benaderingen hebben minder bijwerkingen, waardoor de kwaliteit van leven van deze patiënten verhoogd wordt.

Waarden die voor de samenleving bevorderd worden: nieuwe behandelingsstrategieën voor mensen met darm-, pancreas-, lever- of vulvatumoren kunnen wereldwijd een grote positieve impact hebben op de maatschappij door het afnemen van de mortaliteit- & morbiditeitgraad en enorme ziektekosten.

6. Nadelige milieueffecten zijn alleen te verwachten wanneer gebruik wordt gemaakt van azoxymethaan omdat dit een schadelijk middel is voor mens en dier. Dit middel wordt echter alleen door ervaren personeel toegediend in een hiervoor geschikte zuurkast. Na toediening van het middel zullen de muizen voor minstens drie dagen in onderdruk worden gehuisvest in afzonderlijke IVC's. Al het materiaal afkomstig van deze dieren zal de eerste drie dagen op een gecontroleerde wijze afzonderlijk worden afgevoerd. Hierna is er geen risico meer voor schade aan mens of dier.

Proefopzet en haalbaarheid

7. Naar de overtuiging van de DEC beschikt de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen om de projectdoelstelling met de gekozen strategie binnen de gevraagde termijn te realiseren. De onderzoeksgroep heeft veel expertise op het gebied van dierexperimenteel onderzoek en geavanceerde orthotopie modellen met mogelijkheden voor bioluminescentie imaging. In de afgelopen jaren zijn volgens vergelijkbare strategieën en aanpak belangrijke wetenschappelijke resultaten behaald resulterend in een aantal proefschriften en een groot aantal publicaties in gerenommeerde wetenschappelijke tijdschriften. Daarnaast zijn er belangrijke subsidies voor dit onderzoek binnen gehaald.
8. 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 doelstelling en de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen naar de mening van de DEC leiden tot het behalen van de doelstelling binnen de looptijd van het project.

Welzijn dieren

9. Alle dieren worden gefokt bij een geregistreerd fokbedrijf voor het gebruik in dierproeven, er is geen sprake van afwijkende huisvesting en/of hergebruik. Er is geen sprake van bedreigde diersoorten, niet-menselijke primaten, zwerfdieren en/of dieren uit het wild. De toegepaste methoden voor anesthesie, analgesie en euthanasie zijn conform de Richtlijn.
10. De DEC is ervan overtuigd dat de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de richtlijn. Het proefdiercentrum van het LUMC beschikt over uitstekende faciliteiten en uitsluitend bevoegd en competent personeel zal zorg dragen voor de verzorging van de dieren en de uitvoering van de dierproeven.
11. 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 dieren die spontaan tumoren ontwikkelen of

subcutane tumoren hebben ondervinden maximaal mild ongerief. De dieren met chemisch geïnduceerde tumoren, orthotope tumoren of metastasen ondervinden cumulatief maximaal matig ongerief vanwege de toediening van azoxymethaan, DSS of CCL4 en de groei van tumoren en metastasen. De inschatting van de DEC is in overeenstemming met het niveau van cumulatief ongerief ingeschat door de onderzoekers.

12. De integriteit van dieren wordt fysiek aangetast door de dieren genetisch zijn veranderd. De integriteit zal ook gedragsmatig worden aangetast. Gedurende het project zullen er tumoren ontstaan die de dieren beperken in hun bewegingsvrijheid en hun natuurlijke gedrag.
13. 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 beschreven in de projectaanvraag.

3V's

14. In het project wordt de keuze voor de diermodellen duidelijk onderbouwd. De betrokken dieren en het gekozen diermodel zijn het meest geschikt voor deze studieopzet. De desbetreffende dierproef berokkent de dieren het minste pijn, lijden, angst of blijvende schade. Zo worden de hypothesen eerst *in vitro* getoetst door middel van 2D en 3D celkweek experimenten, voordat een experiment met transgene muizen van start gaat. De DEC is ervan overtuigd dat er geen alternatieven beschikbaar zijn voor het voorgestelde gebruik van dieren om de doelstelling van dit project te realiseren.
15. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereisten van vermindering van dierproeven. De onderzoeksgroep heeft jarenlange ervaring met dit soort experimenten. Bovendien beschikt de onderzoeksgroep over een team van biotechnici die de benodigde ervaring hebben met proefdieronderzoek. Tevens wordt door het gebruik van endoscopisch monitoring alsmede het combineren van controlegroepen het totaal aantal benodigde dieren voor de beschreven experimenten verminderd. De DEC is ervan overtuigd dat het onderzoek ethisch verantwoord zal worden uitgevoerd. De DEC acht het maximale aantal te gebruiken dieren realistisch geschat.
16. De uitvoering van het project is in overeenstemming met de vereisten van verfijning van dierproeven en is zo opgezet dat de dierproeven met zo min mogelijk ongerief worden uitgevoerd. Bij de opzet van dit onderzoek wordt rekening gehouden met dierenwelzijn door het gebruik van adequate anesthesie en analgesie waar nodig. Door het gebruik van *in vivo* imaging kan de tumorgroei zeer nauwkeurig worden gemonitord waardoor overbodig ongerief wordt voorkomen. De DEC is ervan overtuigd dat de beschreven dierproeven zo humaan mogelijk zullen worden uitgevoerd.
17. Het betreft hier geen wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Voor de meeste experimenten wordt gebruik gemaakt van zowel mannelijke als vrouwelijke dieren. Voor het vulva model worden uiteraard alleen vrouwelijke dieren gebruikt en voor het hepatocellulair kanker model alleen mannelijke dieren. De onderzoeker heeft dit naar mening van de DEC voldoende onderbouwd in de projectaanvraag.
19. De dieren worden na afloop van het experiment gedood om het materiaal voor

analyses te kunnen isoleren en om verder ongerief te beperken. Het doden van de dieren gebeurt volgens een voor de diersoort passende dodingsmethode die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU.

20. Er worden voor dit projectvoorstel geen niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren gebruikt.

NTS

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

D. Ethische afweging

1. Rechtvaardigt het onderzoek naar de rol van de TGF- β signaaltransductieroute in initiatie, progressie en metastasering van solide tumoren en hoe hier therapeutisch op kan worden ingegrepen, met als uiteindelijke doel het ontwikkelen van nieuwe behandelingsstrategieën voor mensen met darm-, pancreas-, lever- of vulvatumoren. het ongerief dat de dieren wordt aangedaan?
2. Project gericht op het verkrijgen van fundamentele nieuwe inzichten in de rol van de TGF- β familie in tumor initiatie en progressie, wat toekomstig vertaald kan worden naar klinische toepassingen.
Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: matig nadeel.
Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: gering voordeel.
Waarden die voor de doelgroep (incl. de maatschappij) bevorderd worden: groot voordeel.
De DEC is van mening dat de belangen van de samenleving in het algemeen en de patiënten in het bijzonder in dit project zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de proefdieren. Kanker is een van de belangrijkste doodsoorzaken in de westerse wereld en de incidentie neemt nog steeds toe. Pancreas-, darm-, lever- en vulvatumoren komende minder vaak voor maar worden gekenmerkt door een slechte prognose en slechte kwaliteit van leven voor patiënten. Het merendeel van de patiënten overlijdt ten gevolge van metastasering van de tumoren. Huidige therapieën berusten vaak op chirurgische verwijdering van de tumor, al dan niet aangevuld met chemotherapie of bestraling, maar gaan gepaard met veel bijwerkingen. Ondanks dat eerder onderzoek heeft aangetoond dat liganden en receptoren uit de TGF- β familie van groot belang zijn in de interacties tussen verschillende celtypen in tumoren, is er nog veel onbekend over hoe deze interacties tot stand komen. de DEC acht het verkrijgen van fundamentele kennis over hoe TGF- β receptoren de initiatie en progressie van tumoren beïnvloeden van essentieel belang om een duidelijk beeld te kunnen vormen over de in de kliniek te verwachten therapeutische effecten van anti-TGF- β therapie en de meest kansrijke combinaties van medicatie om in klinische trials te onderzoeken. Het is aannemelijk dat de doelstelling behaald zal worden. Hiertoe zullen dieren worden gebruikt. De onderzoekers doen er echter alles aan om het lijden van de dieren te beperken, waardoor het ongerief van de dieren zo veel mogelijk beperkt blijft.
3. De DEC is overtuigd van het belang van de doelstelling van dit project. De DEC is van mening dat de waarden die voor de doelgroep bevorderd kunnen worden zwaarder wegen dan de waarden die voor de proefdieren in het geding zijn. Het project is goed opgezet. De DEC is bovendien 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. De DEC is er verder van overtuigd dat de onderzoeksgroep voldoende ervaring heeft met de gekozen onderzoeksstrategie en met de voorgestelde dierproeven om de doelstelling te behalen en dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om zowel het ongerief van de dieren alsmede het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken. De DEC onderschrijft dat de doelstelling niet zonder het gebruik van proefdieren behaald kunnen worden en acht het gebruik van het aantal dieren en het daarmee samenhangende ongerief (terminaal) bij de dieren 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
 - Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.
 - Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist
 - Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...
- De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
 - De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen:...
 - De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...
 - De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

3. Tijdens de beoordeling van dit projectvoorstel is het volgende knelpunt naar voren gekomen: Het betreft een erg complexe aanvraag met een voornamelijk exploratief karakter. Er is in de DEC gediscussieerd over de samenhang van de subdoelen en of men hier voldoende informatie uit kan halen. Op basis van de wetenschappelijke inhoud heeft de DEC geconcludeerd dat de onderzoeksvragen door middel van de beschreven subdoelen beantwoord kunnen worden. De DEC adviseert de vergunning te verlenen mits de uitvoering van de experimenten onder strakke regie van de IvD plaatsvindt.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academisch Ziekenhuis Leiden
Dhr. Leids Universitair Medisch Centrum
Postbus 9600
2300 RC 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
AVD116002017858
Bijlagen
2

Datum 11 mei 2017
Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer ,

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 11 mei 2017. Het gaat om uw project "Onderzoek naar de rol en therapeutische potentie van elementen van de Transforming Growth Factor-R signaaltransductie route in progressie en metastasering van solide tumoren". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD116002017858. 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:

11 mei 2017

Aanvraagnummer:

AVD116002017858

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
11 mei 2017
Aanvraagnummer:
AVD116002017858

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 11600
Naam instelling of organisatie: Academisch Ziekenhuis Leiden
KvK-nummer: 27366422
Straat en huisnummer: Albinusdreef 2
Postbus: 9600
Postcode en plaats: 2300 RC LEIDEN
IBAN: NLIIDEUTQ451001400
Tenaamstelling van het rekeningnummer: LUMC

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam:
Functie:
Afdeling:
Telefoonnummer:
E-mailadres:



Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u?

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

Datum:

11 mei 2017

Aanvraagnummer:

DEC16002017858

Over uw project

Geplande startdatum:

1 augustus 2017

Geplande einddatum:

1 augustus 2022

Titel project:

Onderzoek naar de rol en therapeutische potentie van elementen van de Transforming Growth Factor-R signaaltransductie route in progressie en metastasering van solide tumoren

Titel niet-technische samenvatting:

Identificeren van nieuwe therapeutische aangrijpingspunten om tumor groei en uitzaaiingen te verminderen

Naam DEC:

DEC Leiden

Postadres DEC:

Postbus 9600 [REDACTED] LUMC 2300 RC Leiden

E-mailadres DEC:

[REDACTED]

Betaalgegevens

De leges bedragen:

€ 1.827,-

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:

Gemandateerd vergunninghouder

Plaats:

Gemandateerd vergunninghouder

Datum:

8 mei 2017



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academisch Ziekenhuis Leiden
Leids Universitair Medisch Centrum
Postbus 9600
2300 RC 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
AVD116002017858
Bijlagen
2

Datum 11 mei 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 11 mei 2017
Vervaldatum: 10 juni 2017
Factuurnummer: 170858

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD116002017858	€ 1.827,00

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.

Geachte [REDACTED]
 Hartelijke dank voor de evaluatie van onze aanvraag. We hebben uw vragen onderstaand beantwoord en de documenten overeenkomstig aangepast. De wijzigingen zijn hierbij in rood aangegeven.

-U geeft in uw aanvraag aan meerdere onderzoeksvragen te gaan onderzoeken ten behoeve van twee verschillende doelstelling.

Dat is correct, maar de experimenten die vereist zijn om deze 2 doelstellingen te kunnen bereiken vertonen veel overlap. Een voorbeeld daarvan is het volgende: als we de therapeutische efficiency testen van een [REDACTED] neutraliserend antilichaam, zoals we dat in eerdere gepubliceerde studies hebben gedaan, is een van de belangrijke controles om een (celtype specifiek) knockout dier te gebruiken. Dat zou een studie op zich kunnen zijn, maar deze dieren leveren ook directe informatie mbt doelstelling 1, want we leren meer over wat [REDACTED] doet op deze specifieke cellen. Hierdoor is de hoeveelheid dieren die we nodig hebben minder, aangezien we deze vraagstellingen kunnen combineren in 1 experiment. Vandaar dat wij van mening zijn dat beide doelstellingen vallen onder 1 centrale vraag en dat combineren belangrijk voordeel oplevert, zowel wetenschappelijk als ethisch, aangezien minder dieren noodzakelijk zijn. We hebben in onze schattingen van het aantal te gebruiken dieren hier al rekening mee gehouden.

U geeft bovendien aan dat er sprake is van een gefaseerde uitvoering. Uit uw aanvraag wordt de fasering echter niet geheel duidelijk. In de in het projectvoorstel opgenomen flowchart 1 geeft u bijvoorbeeld aan dat afhankelijk van de respons cellen gedepleteerd worden, neutraliserende antilichamen gebruikt worden en dat er transplantatie studies worden uitgevoerd. Uit uw aanvraag wordt niet duidelijk of deze 3 type experimenten parallel zullen worden uitgevoerd of dat ook hier fasering in wordt aangebracht.

Deze studies zullen niet parallel plaatsvinden en hoogstwaarschijnlijk zal slechts 1 van de methodes gebruikt worden (tenzij dit geen sluitend bewijs oplevert). Afhankelijk van het fenotype dat we observeren zullen we kiezen voor 1 van de mogelijkheden. Stel we zien dat een bepaald effectortype cel een belangrijke rol lijkt te spelen (bijv verhoogde [REDACTED] infiltratie na celtype specifieke deletie van een receptor) zullen we [REDACTED] depletieren in een vervollexperiment. Daarentegen als we een upregulatie van [REDACTED] zien, zullen we neutraliserende antilichamen tegen [REDACTED] gebruiken etc. We zullen de keuze vooraf met de IVD bespreken en met eerdere resultaten onderbouwen.

Hetzelfde geldt voor de in het projectvoorstel opgenomen flowchart 2 waarin u aangeeft dat afhankelijk van de respons cellen gedepleteerd worden, er gebruik gemaakt zal worden van knockout muizen en dat er transplantatie studies worden uitgevoerd.

Hier geldt eigenlijk hetzelfde voor als hierboven beschreven. In het geval dat we therapeutische activiteit zien van een antilichaam dat een immuun [REDACTED] reactie kan opwekken, is een belangrijke vervolgstap om de effectorcellen te depletieren en te onderzoeken of daarmee het therapeutische effect verdwijnt. Dit geeft veel informatie over het onderliggende mechanisme en geeft wederom aan dat de twee doelstellingen van dit project sterk onderling verbonden zijn. Dus ook hier zullen de depletie-transplantatie- of knockout studies niet parallel plaatsvinden en in overleg met de IVD gepland worden.

Tot slot geldt dit ook voor de experimenten waarin combinatietherapie getest wordt. Worden experimenten met [REDACTED] parallel of gefaseerd uitgevoerd? U wordt verzocht dit toe te lichten. Indien er sprake is van fasering wordt u ook verzocht toe te lichten op basis van welke criteria besloten zal worden en vervollexperiment te starten.

De combinatiestudies kunnen wel parallel uitgevoerd worden, aangezien het mechanisme waarop synergie verwacht wordt bij combinatie met [REDACTED] anders is en beide andere informatie gaat verschaffen. [REDACTED]

[REDACTED] De experimenten die verder beschreven staan (depletie-transplantatie-knockout) geldt hetzelfde als boven, die worden niet parallel uitgevoerd, maar gebaseerd op de bevindingen wordt de beste methode gekozen om het bewijs sluitend te krijgen.

-Het is daarnaast niet voldoende duidelijk op basis van welke criteria besloten wordt een bepaald type experiment wel/niet uit te voeren. U wordt verzocht de keuzemomenten en de criteria op basis waarvan besluiten worden genomen te beschrijven. Het gaat hierbij om zowel de keuzemomenten binnen als tussen de twee doelstellingen. U wordt verzocht in elk geval in te gaan op de volgende keuzemomenten:

De twee doelstellingen vinden niet parallel plaats voor 1 target, maar op basis van bevindingen uit doelstelling-1 of eerdere bevindingen worden therapeutische studies in doelstelling-2 gestart. Dat is een doorlopend proces en deels een vervolg van de lopende projecten op onze afdeling. Binnen een doelstelling is onze primaire focus nu op [REDACTED] maar anderen kunnen noodzakelijk zijn, zoals hieronder beargumenteerd. We zullen de argumentatie voor de keuzes altijd eerst aan de IVD voorleggen alvorens de experimenten te starten.

-Selectiecriteria voor specifieke TGF β receptoren en liganden

We gaan in eerste instantie kijken naar [REDACTED] op basis van de bevindingen in de huidige lopende experimenten. Aangezien deze receptoren deel uitmaken van de TGF β familie, waarin 7 type-I, 4 type-II en 2 coreceptoren beschreven zijn, die allemaal in verschillende receptor complexen voor kunnen komen, kunnen we niet exact aangeven welke andere receptor, of op welk celtype, we die moeten uitknocken om onze doelstelling te kunnen behalen. Dit zal dus bepaald moeten worden op basis van de bevindingen uit de afgeronde experimenten. Ter achtergrond; er verschijnen dagelijks 11 artikelen over de TGF- β superfamily, wat de complexiteit van dit onderzoek aangeeft. We zullen de keuze beargumenteerd aan de IVD voorleggen.

-Selectiecriteria voor specifieke therapieën (zowel mono als combinatie)

De monotherapie zullen we slechts testen als we duidelijke aanwijzingen hebben op basis van expressiepatroon en rol in tumorprogressie en metastasering (humane samples, huidige experimenten en/of bevindingen uit doelstelling-1). Zoals aangegeven in de flowchart zullen we combinatie-therapieën slechts testen bij milde tot gemiddelde respons op de monotherapie. Bij sterke respons is geen combinatie nodig en wordt dit niet getest.

-Keuze voor orthotope en subcutane modellen

Deze keuze is gebaseerd op de specifieke vraagstelling. Wanneer we kijken naar interactie met host cellen (bijvoorbeeld fibroblasten) zijn orthotope modellen noodzakelijk. Wanneer we een het effect op primaire epitheliale tumorgroei willen bekijken of bijvoorbeeld immuuninfiltratie is een model dat eenvoudig en met weinig ongerief te volgen is (subcutaan) een goede keuze.

-Keuze voor specifieke tumoren

Op dit moment hebben we projecten lopen om te kijken naar de TGF β receptoren en liganden in darm- en pancreastumoren en zijn we recent gestart met een project naar levertumoren. In al deze projecten bestuderen we receptoren uit dezelfde familie, maar zijn de experimenten in verschillende fasen van onderzoek.

-Keuze uitvoering orthotope resectie modellen

Deze modellen zullen we uitsluitend gebruiken wanneer we willen kijken naar de effecten van adjuvante behandeling en metastasering, wanneer dit onvoldoende plaatsvindt als de primaire tumor nog aanwezig is. We zullen dit voorafgaand met de IVD overleggen.

-Keuze experimenten fibrose inductie

Deze experimenten vinden plaats zodra wij overtuigend bewijs hebben *in vitro* en in patiënten of eerder verkregen muisweefsel dat de receptor waar we interesse in hebben (bijvoorbeeld [REDACTED]) verhoogd tot expressie komt in leverfibrose, en daarmee het voorstadium van hepatocellulaire tumoren.

-Keuze voor experimenten met levermetastasen

Deze experimenten worden alleen uitgevoerd om de directe effecten van een ligand of receptor te bekijken op engraftment in de lever, en dus niet de andere fasen van metastasering zoals intra- en extravasatie en overleving in de circulatie.

Het gaat hier dus niet om een onderbouwing van de keuze voor specifieke type experimenten, maar om de onderbouwing op basis waarvan u besluit dergelijke experimenten daadwerkelijk uit te voeren en op basis waarvan u bepaalt hoe deze uitgevoerd gaan worden. Indien er sprake is fasering in de uitvoering wordt u verzocht dit ook aan te geven.

-Uit uw aanvraag (bijlagen 3.4.4.1 en 3.4.4.2) wordt niet duidelijk hoeveel dieren licht en hoeveel dieren matig ongerief ondergaan. U wordt verzocht dit te specificeren.

Voor bijlage-1 is toegevoegd dat 825 muizen licht en 825 muizen maximaal matig ongerief ondergaan. Voor bijlage-2 is dat 100 muizen licht ongerief en 3165 muizen maximaal matig ongerief.

-U geeft aan in bijlagen 3.4.4.1 en 3.4.4.5 geen pijnbestrijding te kunnen toepassen, terwijl dieren wel pijn kunnen ondergaan. U geeft aan dieren die pijn ervaren uit de proef te halen volgens de humane eindpunten. Het is onduidelijk hoe lang de dieren dan pijn zullen ervaren voordat de dieren gedood zullen worden. U wordt verzocht dit toe te lichten.

In onze eerdere experimenten hebben we geen tekenen van pijn bij de muizen waargenomen, maar wij kunnen dat het optreden van pijn ten gevolge van de ontsteking of groei van metastasen niet op voorhand uitsluiten. Daartoe worden de muizen gedurende de DSS cycli dagelijks gemonitord (gewicht en algemene conditie, tekenen van pijn zoals met bolle rug zitten) en daarna minimaal 2 keer per week. Op basis van eerdere experimenten met de metastase modellen verwachten we geen pijn voordat het experiment afgerond is, maar kunnen dit ook hier niet uitsluiten. Daarom monitoren wij toch met behulp van een score om signalen van pijn op tijd te kunnen herkennen (in overleg met IvD en dierenarts). Bij iedere uiting van pijn zullen wij het experiment beëindigen voor dat dier. Buiten dat worden de dieren dagelijks gecontroleerd door de dierversorgers en de onderzoeker wordt op de hoogte gebracht wanneer de dieren afwijkend gedrag vertonen.

In bijlage 3.4.4.1 geeft u wel een onderbouwing waarom pijnbestrijding niet mogelijk is. Een dergelijke onderbouwing ontbreekt in bijlage 3.4.4.5. U wordt verzocht deze onderbouwing alsnog te geven.

De argumentatie is toegevoegd in bijlage-5.

-In bijlagen 3.4.4.3, 3.4.4.4 en 3.4.4.5 wordt bij de vraag over de 3V's niet toegelicht waarom de doelstellingen niet behaald kunnen worden zonder het gebruik van proefdieren. U wordt verzocht deze informatie alsnog in de desbetreffende bijlagen op te nemen.

Deze informatie is opgenomen in de betreffende bijlagen.

-Door de aanvraag heen worden verschillende criteria voor humane eindpunten benoemd die niet worden beschreven bij de vraag over de humane eindpunten. U wordt, voor de volledigheid en navolgbaarheid, verzocht te vragen over de humane eindpunten daarmee aan te vullen.

We hebben de overige criteria die gebruikt worden om het experiment te monitoren of aan te passen tevens opgenomen in de humane eindpunten.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academisch Ziekenhuis Leiden
Dhr. Leids Universitair Medisch Centrum
Postbus 9600
2300 RC 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
AVD116002017858
Bijlagen
1

Datum 3 juli 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer ,

Op 11 mei 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Onderzoek naar de rol en therapeutische potentie van elementen van de Transforming Growth Factor-R signaaltransductie route in progressie en metastasering van solide tumoren" met aanvraagnummer AVD116002017858. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 15 juni 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Op ons verzoek heeft u uw doelstelling, gefaseerde uitvoering, go- no go criteria, selectiecriteria, keuzemomenten, ongeriefsclassificatie, pijn bij de dieren en afwezigheid van pijnbestrijding, vervanging en humane eindpunten verduidelijkt.

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 "Onderzoek naar de rol en therapeutische potentie van elementen van de Transforming Growth Factor-R signaaltransductie route in progressie en metastasering van solide tumoren" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 augustus 2017 tot en met 31 juli 2022. Deze termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat een vergunning niet voor langer dan 5 jaar mag worden afgegeven.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Leiden gevoegd. Dit advies is opgesteld op 11 mei 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).

Datum:

3 juli 2017

Aanvraagnummer:

AVD116002017858

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



Datum:
3 juli 2017
Aanvraagnummer:
AVD116002017858

Bijlagen:

- Vergunning
- Hiervan deel uitmakend:
- DEC-advies
 - Weergave wet- en regelgeving



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Academisch Ziekenhuis Leiden

Adres: Postbus 9600

Postcode en plaats: 2300 RC LEIDEN

Deelnemersnummer: 11600

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 augustus 2017 tot en met 31 juli 2022, voor het project "Onderzoek naar de rol en therapeutische potentie van elementen van de Transforming Growth Factor-R signaaltransductie route in progressie en metastasering van solide tumoren" met aanvraagnummer AVD116002017858, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Leiden. 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 11 mei 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 15 juni 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 15 juni 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 11 mei 2017, ontvangen op 11 mei 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 15 juni 2017

Aanvraagnummer:
AVD116002017858

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1. Spontane en chemisch geïnduceerde tumor modellen				
	Muizen (Mus musculus) /	1.650	50% Matig 50% Licht	
3.4.4.2. Orthotope tumormodellen				
	Muizen (Mus musculus) /	3.265	97% Matig 3% Licht	
3.4.4.3. Subcutane tumor modellen				
	Muizen (Mus musculus) /	1.280	100% Licht	
3.4.4.4. Orthotoop, fibrose gerelateerd hepatocellulair kanker model				
	Muizen (Mus musculus) /	831	100% Matig	
3.4.4.5. Modellen voor experimentele metastasen				
	Muizen (Mus musculus) /	600	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:
AVD116002017858

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:
AVD116002017858

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:
AVD116002017858

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 W17-12										
nr.	document NTS 2017887	wordt verstrekt				weigeringsgronden				
		reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1	
1	Origineel aanvraagformulier				x		x	x		
2	NTS	x								
3	Projectvoorstel				x		x	x		
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1				x		x	x		
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2				x		x	x		
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3				x		x	x		
7	Tabel				x		x	x		
8	DEC-advies				x		x	x		
9	Ontvangstbevestiging				x		x	x		
10	Verzoek om aanvullende informatie				x		x	x		
11	Reactie DEC op verzoek om aanvullende informatie				x		x	x		
12	Antwoord op verzoek om aanvullende informatie				x		x	x		
13	Verzoek om aanvullende informatie				x		x	x		
14	Adviesnota CCD		x							x
15	Beschikking en vergunning				x		x	x		

887

27 JUNI 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	10600
		<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	Universiteit Leiden
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]
		KvK-nummer	27 36 89 29
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	Rapenburg 70
		Postbus	9502
		Postcode en plaats	2300 RA Leiden
		IBAN	NL78RABO0102468869
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Leiden / [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	[REDACTED]
		Afdeling	[REDACTED]
		Telefoonnummer	[REDACTED]
		E-mailadres	[REDACTED]
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED] <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.
		Functie	[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 - 9 - 2017
- Einddatum | 31 - 8 - 2022
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Ontwikkeling van therapie tegen atherosclerose door middel van immuun modulatie
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Ontwikkeling van therapie tegen atherosclerose door middel van immuun modulatie
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC | DEC Leiden
- Postadres | [REDACTED] LUMC
Postbus 9600
2300 RC Leiden
- E-mailadres | [REDACTED]

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1541,- 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 Gemandateerd vergunninghouder

Plaats Leiden

Datum - - 01-6-2017

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.

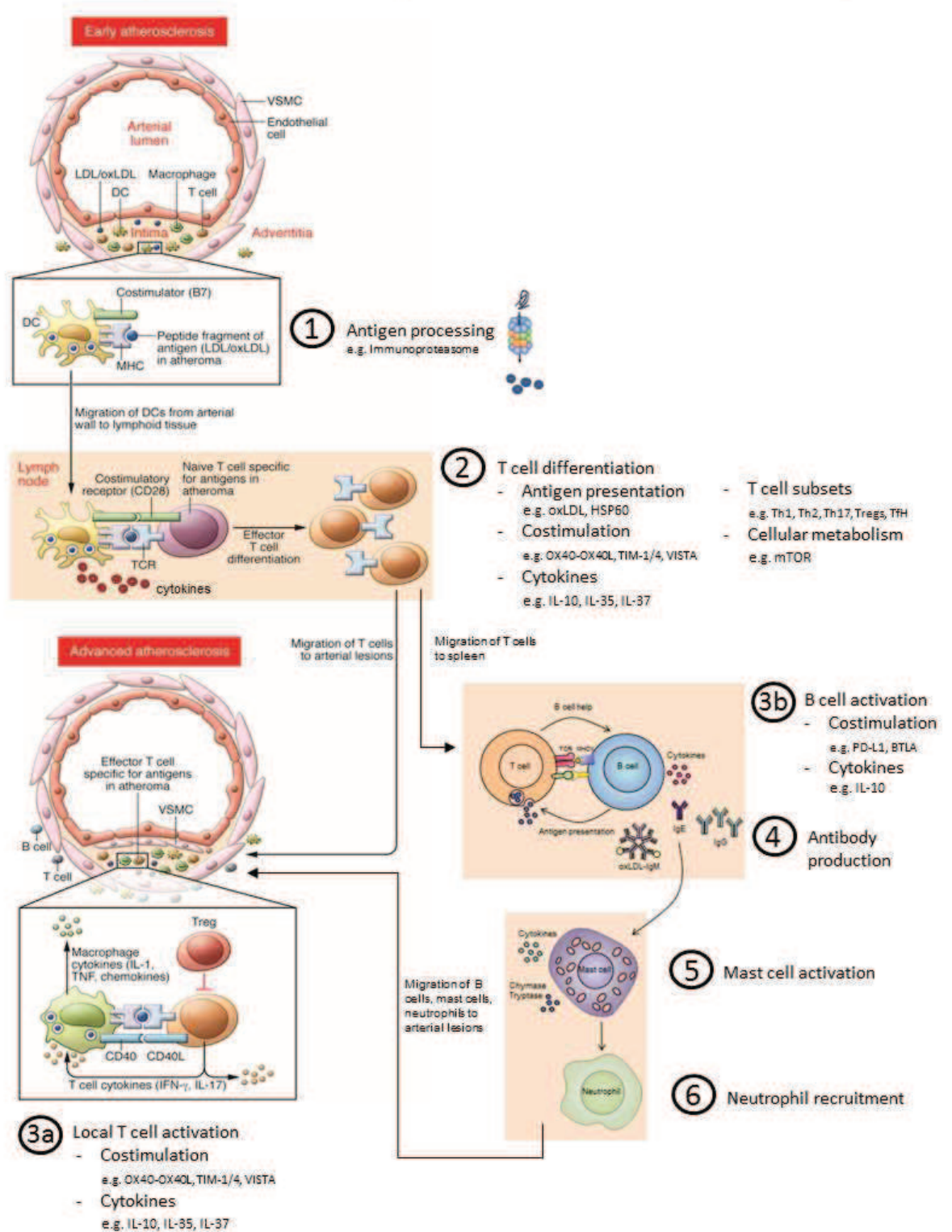
- Geef in geval van 'wettelijk vereiste dierproeven' aan welke wettelijke eisen (in relatie tot beoogd gebruik en markttoelating) van toepassing zijn.
- Geef in geval van 'routinematige productie' aan welk(e) product(en) het betreft en voor welke toepassing(en).
- Geef in geval van 'hogere onderwijs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

Hart- en vaatziekten zijn nog steeds een van de belangrijkste doodsoorzaken in de Westerse wereld en Nederland alleen al telt ruim 1 miljoen hart- en vaatpatiënten (www.hartstichting.nl/hartvaten/cijfers). Het proces van vernauwing van de slagaders, aderverkalking of atherosclerose, is de belangrijkste oorzaak voor het ontstaan van deze hart- en vaatziekten. Acute cardiovasculaire syndromen, zoals hartinfarcten of beroertes, kunnen optreden als een dergelijke plaque scheurt, waardoor een stolsel gevormd wordt dat de slagader afsluit. Atherosclerose is enerzijds het gevolg van een ontsporing van het cholesterol metabolisme, wat leidt tot ophoping van cholesterol in de vaatwand en anderzijds het gevolg van een ontstekingsreactie, die optreedt door de verhoogde cholesterolniveaus. Het behandelen van hart- en vaatziekten met behulp van cholesterol verlagende geneesmiddelen zoals statines is een succesvolle behandelingsmethode voor atherosclerose en statines verminderen het risico op het krijgen van cardiovasculaire complicaties met ongeveer 30%. Dit betekent echter dat een zeer groot gedeelte van de hart- en vaatziekten patiënten geen baat hebben bij de huidige therapieën, en dat er een dringende noodzaak is om nieuwe therapeutische strategieën ontwikkelen. Het aantal patiënten dat overlijdt aan hart- en vaatziekten zou verder verlaagd kunnen worden door naast het verhoogde cholesterolniveau ook de chronische ontsteking, gedreven door het immuunsysteem, in de plaques te remmen en daarmee de ontwikkeling van atherosclerose tegen te gaan.

In de eerste fase van atherosclerose migreren monocytën vanuit het bloed naar de vaatwand waar het cholesterol vervoerende deeltje Lage Dichtheids Lipoproteïne (LDL) zich ophoopt en wordt geoxideerd tot oxLDL. Vervolgens differentiëren monocytën naar macrofagen en foamcellen. Deze foamcellen produceren cytokines die er voor zorgen dat vele andere immuuncellen zoals dendritische cellen naar de atherosclerotische plaque migreren. De activatie van het adaptieve immuun systeem is essentieel voor de ontwikkeling van atherosclerose en kan worden opgesplitst in de volgende processen die allemaal nauw met elkaar verbonden zijn (zie **Figuur 1**):

- (1) Antigen processing: antigenen aanwezig in de plaque worden opgenomen door antigen presenterende cellen zoals dendritische cellen. De antigen presenterende cellen migreren van de vaatwand naar de dichtstbijzijnde drainerende lymfeknoop alwaar ze een interactie aangaan met naïeve T cellen.
- (2) T cel differentiatie: activatie en expansie van naïeve T cellen is afhankelijk van drie signalen. Ten eerste is er een antigen specifiek signaal nodig dat wordt geleverd als de T cel receptor van de T cel een antigen kan herkennen dat op MHC-I of op MHC-II van de antigen presenterende cel wordt gepresenteerd. Ten tweede moet de antigen presenterende cel een activatie signaal afgeven door middel van costimulatorische routes, en ten derde moet er een cytokine signaal afgegeven worden dat de differentiatie van de T cel bepaalt.

Het immuunsysteem in atherosclerose



(3) De effector T cellen kunnen vervolgens twee richtingen op:

(3A): effector T cellen kunnen naar de plaque migreren alwaar ze weer geactiveerd kunnen worden door antigen presenterende cellen middels costimulatoire moleculen en cytokines. Ze dragen bij aan de lokale ontsteking en zorgen zo voor een chronische ontstekingsreactie.

- (3B): effector T cellen kunnen naar de milt migreren waar ze B cellen kunnen activeren. Verschillende B cell subtypes kunnen het immuunsysteem beïnvloeden middels cytokine productie en cel-cel interactie via costimulatoire moleculen. Antilichaam productie: rijpe (mature) B cellen kunnen differentiëren tot plasmacellen die IgG, IgM en IgE produceren. Mastcell activatie: de mastcell laat granules los die allerlei pro-inflammatoire mediators bevatten zoals cytokines en chymase/tryptase. Verhoogde activiteit van mastcellen is gecorreleerd met versnelde vaatvernauwing en destabilisatie van de atherosclerotische plaque.
- (4) Neutrofiel activatie: de pro-inflammatoire mediators die mastcellen uitscheiden leiden tot de activatie van neutrofielen die vervolgens weer bijdragen aan de progressie van atherosclerose.

De immunoreactie die dus ten grondslag ligt aan atherosclerose heeft vele aspecten en de processen dragen gezamenlijk bij aan de ontwikkeling en progressie van atherosclerose. Indien we één van de afzonderlijke processen in de immunoreactie remmen kan dit dus leiden tot het ontregelen van het gehele immuun proces en daardoor het proces van atherosclerose gunstig beïnvloeden. Regulatie van het immuunsysteem middels een immunologische interventie vormt daarom een veelbelovende therapie om hart- en vaatziekten te voorkomen. Binnen de huidige proefopzet wordt daarom gekeken naar verschillende manieren om de ontstekingsreactie tijdens atherosclerose te verminderen door pro-inflammatoire processen te remmen en door anti-inflammatoire cellen en processen te stimuleren.

Ingrijpen in deze processen, geeft niet alleen nieuwe fundamentele informatie over de bijdrage van de immunoreactie aan de ontwikkeling van atherosclerose, maar kan ook direct nieuwe therapieën opleveren, die het aantal hart- en vaatpatiënten kan verminderen.

Omdat bovengenoemde processen zeer sterk met elkaar samenhangen, is het van belang dat interventies op elk niveau onderzocht worden: van activatie van de verschillende immuuncellen tot de mate van atherosclerose, maar ook effecten op de lipidenhuishouding zullen worden onderzocht. Door de diversiteit in cardiovasculaire patiëntengroepen is het noodzakelijk om op verschillende niveaus in te kunnen grijpen, zodat er uiteindelijk per groep patiënten een passende behandeling kan worden toegepast. Er is dan ook meer kennis nodig op het gebied van specifieke immunologische aangrijpingspunten en over mogelijke combinatietherapieën, die op dit moment nog niet onderzocht zijn.

_____ wordt gewerkt aan het ontrafelen van de mechanismen, die ten grondslag liggen aan de ontwikkeling van atherosclerose, en er wordt met name gewerkt aan de rol van het immuunsysteem in dit proces. Ons onderzoek richt zich op een aantal mogelijke strategieën om in te grijpen in het ontwikkelingsproces van atherosclerose. Zo kunnen we verschillende componenten van het immuunsysteem uitschakelen of remmen (zie figuur). We hebben bijvoorbeeld laten zien dat activatie van de mastcell de plaque kan destabiliseren, en dat het remmen van deze cel dit voorkomt⁶. Aan de andere kant kunnen we het immuunsysteem zodanig moduleren, dat de specifieke ontsteking in de atherosclerotische plaque wordt geremd. Zo hebben _____ plaquevorming kan remmen⁷, en dat het induceren van de ontstekingsremmende regulatoire T cellen (Tregs) beschermt tegen de ontwikkeling en progressie van atherosclerose⁸. Recentelijk hebben we ook aangetoond dat cellulaire therapie veel therapeutische potentie heeft. Het toedienen van _____ kan zorgen voor een remming van atherosclerose¹⁰.

Ons experimentele onderzoek richt zich op translatie naar de patiënt. Zo is er bijvoorbeeld in samenwerking met het _____ van de mastcell in humane plaques, en het aantal mastcellen bleek een sterke voorspellende waarde te hebben voor het krijgen van een _____. Er wordt daarnaast op dit moment binnen een EU-consortium gewerkt aan een vaccinatiestrategie, die recent (april 2016) heeft geleid tot een eerste klinische trial waarin patiënten worden gevaccineerd met als doel beschermende antilichamen tegen het cholesterol vervoerende LDL deeltje op te wekken. Deze trial wordt uitgevoerd door het Center for Human Drug Research (CHDR) en er wordt nu met specifieke muismodellen gewerkt aan een vervolgstudie (start

eind 2017). Dit onderschrijft het sterk translationele karakter van het onderzoek binnen onze afdeling.

De speerpunten van ons onderzoek zijn:

- Het identificeren van specifieke ontstekingsgenen en ontstekingseiwitten in het proces van atherosclerose (middels fundamenteel onderzoek), die gebruikt kunnen worden als target voor de ontwikkeling van geneesmiddelen.
- Therapieën ontwikkelen om plaques te stabiliseren en om plaque regressie te realiseren door de bovenstaande geneesmiddel targets te remmen/stimuleren.
- Het ontwikkelen van een therapeutisch vaccin tegen atherosclerose gebaseerd op fundamenteel onderzoek naar de rol van het immuunsysteem in het proces van atherosclerose.

Om het uiteindelijke doel van humane therapie te realiseren vormt proefdieronderzoek een noodzakelijke stap en willen we verschillende behandelingsstrategieën combineren om een maximale verbetering in de uitkomst van atherosclerose te realiseren. Deze vergunningaanvraag is dan ook modulair opgebouwd om combinaties van therapieën in adequate diermodellen voor hart- en vaatziekten te onderzoeken.

Referenties:

1) Libby P et al. Inflammation and immunity in diseases of the arterial tree: players and layers. *Circ Res.* 2015;116:307-311.

2) Tsiantoulas D et al. Targeting B cells in atherosclerosis: closing the gap from bench to bedside. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015;35:296-302.

4) Ridker PM et al. Interleukin-1 β inhibition and the prevention of recurrent cardiovascular events: rationale and design of the Canakinumab Anti-inflammatory Thrombosis Outcomes Study (CANTOS). *Am Heart J.* 2011;162:597-605.

5) Everett BM et al. Rationale and design of the Cardiovascular Inflammation Reduction Trial: a test of the inflammatory hypothesis of atherothrombosis. *Am Heart J.* 2013;166:199-207.

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?

Ons hoofddoel is nieuwe immuuntherapieën te ontwikkelen, die de vorming van atherosclerotische plaques tegengaat en mogelijk de bestaande plaques stabiliseren of zelfs verkleinen (plaque regressie). Deze vergunningaanvraag richt zich in eerste instantie op drie therapievormen, die van belang zijn voor

de verdere ontwikkeling van een immuuntherapie voor de behandeling van atherosclerose. Dankzij nieuwe, fundamentele inzichten in de rol van het immuunsysteem bij de ontwikkeling van atherosclerose, verkregen uit deze experimenten en uit de literatuur, zullen wij in staat zijn om deze therapievormen verder te ontwikkelen richting een "first-in-humans" klinische trial. Dit onderzoek is ingekaderd in de langlopende onderzoekslijn van de vakgroep [REDACTED]

De drie centrale vormen van de ontwikkeling van een experimentele (combinatie)therapie voor atherosclerose, die de komende vijf jaar centraal staan, zijn hieronder uitgewerkt.

1. Immunotherapie tegen atherosclerose:

De ontwikkeling van atherosclerose is het gevolg van een ontspoorde immuunreactie in de vaatwand. Remming van de excessieve reactie van het immuunsysteem kan een beschermende werking hebben op de vorming van een atherosclerotische plaque. Het primaire doel van deze experimenten is daarom om de functie van immuun-modulerende stoffen, zoals antilichamen, "small molecules", siRNAs en cytokines, in de initiatie, progressie en regressie van atherosclerose te bepalen. Wij willen bestuderen of deze stoffen de basis kunnen vormen voor de verdere ontwikkeling van een therapie die het immuunsysteem gunstig beïnvloedt ter behandeling van hart- en vaatziekten.

2. Ontwikkelen van vaccins tegen atherosclerose:

Door middel van vaccinatiestrategieën kan het immuunsysteem op een specifieke manier worden gemoduleerd, waardoor de vorming van een atherosclerotische plaque geremd wordt of de plaque zelfs afgebroken wordt. Deze therapeutische vaccins behelzen het testen van de effectiviteit van vaccins tegen atherosclerose en hebben als primaire doel om de reactie van de T cel tegen eiwitten die betrokken zijn bij atherosclerose te moduleren. Mogelijke, werkzame onderdelen van een vaccin zijn gedeeltes van het apoB100 eiwit in het lage-dichtheids lipoproteïne (LDL), heat shock eiwitten (HSP60) en pro-inflammatoire cytokines. Het ontwikkelen van een vaccin tegen atherosclerose kan een langdurige bescherming opleveren voor een hart- en vaatziekten patiënt.

3. Ontwikkelen van cellulaire therapie:

Therapie met (stam)cellen is een therapeutische strategie die steeds meer aandacht krijgt, aangezien veelal met lichaamseigen cellen een behandeling van ziektes kan worden gestart. Deze experimenten hebben als doel om cellulaire therapieën te testen op hun effectiviteit om het ontstaan van atherosclerotische plaques het verminderen of al aanwezige atherosclerotische plaques te verkleinen (regressie). De verkregen resultaten kunnen leiden tot mogelijke cellulaire therapieën ter voorkoming of genezing van atherosclerose.

Haalbaarheid:

Wij achten de doelstellingen zoals hierboven beschreven als haalbaar. Deze doelstellingen zijn gebaseerd op ons huidige onderzoek, en met de ervaren personen en de middelen aanwezig in onze onderzoeksgroep zullen we in staat zijn de gestelde doelen te behalen en immuuntherapie voor atherosclerose verder te ontwikkelen. De proefdiermodellen die wij daarvoor zullen gebruiken zijn reeds opgezet. In onze onderzoeksgroep zullen we daarom ook in staat zijn om het juiste onderzoeksmodel te kiezen bij de specifieke onderzoeksvraag. De financiële ondersteuning van dit onderzoek komt uit fondsen voor wetenschappelijk onderzoek, zoals van de Hartstichting, NWO en van EU. Onze projectaanvragen zijn door internationale reviewers op kwaliteit en relevantie zeer positief beoordeeld en daarbij ook op haalbaarheid gescoord. Voor de komende vijf jaar hebben wij voldoende middelen ter beschikking om de voorgestelde onderzoeksprojecten uit te voeren.

Wij publiceren ons onderzoek de afgelopen jaren in wetenschappelijke internationale tijdschriften, waaronder *Circulation*, *Circulation Research*, *ATVB*, *Atherosclerosis*, *Annals of Surgery*, *Cardiovascular Research*, *Journal of Internal Medicine* en *Journal of Immunology*.

Ook is het dit jaar haalbaar gebleken om vele jaren preklinisch onderzoek te vertalen naar een klinische trial, waarin we onderzoeken of een vaccinatie tegen een lipide, zoals aanwezig in geoxideerd LDL, in

staat is om antilichamen die beschermen tegen atherosclerose zoals anti-PC-IgM te induceren (CHDR april 2016-mei 2017).

3.3 Belang

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

Medisch belang:

Hart- en vaatziekten vormen de belangrijkste doodsoorzaak in Westerse landen en ook Nederland telt ruim 1 miljoen hart- en vaatpatiënten (www.hartstichting.nl/hartvaten/cijfers). In de loop der jaren is door een verbeterde behandeling van de acute gevolgen van hart- en vaatziekten (infarcten) het aantal acute sterfgevallen ten gevolge van hart- en vaatziekten sterk gedaald. Toch ondervinden nog steeds veel mensen grote nadelige gevolgen van hart- en vaatziekten, zoals pijn op de borst (angina pectoris), problemen met het lopen (etalagebenen) en tijdelijk verminderde doorbloeding van de hersenen (TIA's). Deze uitingen van hart- en vaatziekten zijn voor ruim 70% het gevolg van atherosclerose en worden standaard behandeld met cholesterolsynthese remmers (statines), die leiden tot een daling van het plasma cholesterol niveau. Deze behandeling heeft echter een beperkt klinisch effect en kan het risico op cardiovasculaire complicaties met slechts 30% verminderen. Daarnaast wordt het succes van preventieve verwijdering van de plaque (dotteren, atherectomie) of van het aangedane bloedvatsegment in de praktijk verkleind door de geringe voorspelbaarheid van het tijdstip van een trombotische complicatie. De algemene opinie is dat ook de chronische ontsteking gedurende atherosclerose, die de ziekte mede veroorzaakt, moet worden aangepakt om tot genezing van atherosclerose te komen. Door de chronische ontsteking te bestuderen in muismodellen voor atherosclerose, en essentiële componenten en mechanismen van het immuunsysteem te identificeren, die leiden tot een vermindering van de ontsteking, kunnen naar nieuwe targets voor behandelingen gezocht worden. Door naar de initiatie, progressie en regressie van atherosclerose te kijken kunnen respectievelijk preventieve en behandelingsmethoden gevonden worden.

Maatschappelijk belang:

Hart- en vaatziekten vormen in Nederland een belangrijk medisch en dus maatschappelijk probleem. Naast de klachten bij de patiënt, leiden hart- en vaatziekten tot hoge kosten in de gezondheidszorg door medicijngebruik en operatief ingrijpen, maar ook door ziekteverzuim en arbeidsongeschiktheid. De hoge incidentie van hart- en vaatziekten betekent daarom een zware belasting voor de gezondheidszorg, de patiënt en de maatschappij (beperking in arbeidsinzet). Gegeven de grote impact die hart- en vaatziekten hebben dus hebben op de maatschappij, is de ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen voor deze patiënten van zeer groot belang. De hier beschreven experimenten zouden mogelijk kunnen leiden tot alternatieve therapieën en kunnen een aanzienlijke reductie mogelijk maken van de bovengenoemde niet-medische en paramedische uitgaven aan hart- en vaatziekten.

Wetenschappelijk belang:

Gezien de hoge incidentie van het hart- en herseninfarct in de Westerse wereld, de grote klinische impact van een infarct en de nog beperkte inzichten in de processen verantwoordelijk voor het ontstaan en het scheuren van de plaque, is het te begrijpen dat wetenschappelijk onderzoek naar het ontstaan van atherosclerose en daaropvolgende plaqueruptuur hoge prioriteit bezit. Het verkrijgen van nieuwe fundamentele inzichten in de rol het immuunsysteem bij de ontwikkeling van atherosclerose, en de destabilisatie van een atherosclerotische plaque, maakt het mogelijk om nieuwe aangrijpingspunten te ontdekken, die van therapeutisch belang kunnen zijn, wat uiteindelijk ook maatschappelijk zeer relevant is. De resultaten verkregen uit ons onderzoek zullen gepubliceerd worden in peer-reviewed wetenschappelijke tijdschriften, zodat de opgedane kennis en inzichten openbaar gemaakt worden.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

Deze aanvraag focust zich op het ontwikkelen van een immuuntherapie, waarbij er drie therapeutische mogelijkheden zullen worden onderzocht; (1) ingrijpen in de immuunrespons (immunomodulatie) ter

behandeling van atherosclerose, (2) ontwikkelen van vaccins tegen atherosclerose, (3) ontwikkelen van een cellulaire therapie. Waar nodig zullen wij deze drie centrale therapievormen willen combineren, omdat suppressie van het immuunsysteem een therapie kan vereisen die de interactie tussen immuuncellen via meerdere signalen, zoals antigen presentatie, cytokines en costimulatoire moleculen beïnvloedt. Modulatie van deze signalen door bijvoorbeeld blokkerende antilichamen in combinatie met een cellulaire therapie kan essentieel zijn om een effectieve immuuntherapie voor atherosclerose te ontwikkelen. De dierexperimenten zoals beschreven in deze aanvraag zijn op dusdanige manier opgebouwd dat ze de mogelijkheid bieden om de experimentele therapieën te combineren zijn. Om bovengenoemde therapievormen te onderzoeken is het nodig om atherosclerose te induceren in proefdieren.

Voor deze experimenten zullen wij gebruik maken van genetisch gemodificeerde muizenlijnen, die door het voeren van een hoog vet en hoog cholesterol dieet (Westers-type dieet met 0.25% cholesterol) spontaan atherosclerotische plaques ontwikkelen. Dit zijn bijvoorbeeld de LDL receptor deficiënte ($LDLr^{-/-}$) muis en de apolipoproteïne E deficiënte ($apoE^{-/-}$) muis, maar ook meer gehumaniseerde muismodellen die humaan LDL en een humaan immuunsysteem bezitten zullen worden gebruikt. Deze muismodellen worden wereldwijd veelvuldig gebruikt en reeds beschikbaar in ons laboratorium, en net als bij hart- en vaatziekten patiënten leidt een verhoging van het bloed cholesterol gehalte door het geven van cholesterol-rijk voer tot het ontstaan van atherosclerotische plaques in de slagaders. Het is meermaals aangetoond dat de muismodellen, die wij gebruiken in deze studies, een goed beeld geven van de ontstekingsprocessen die ook in mensen worden gevonden. Bovendien is de samenstelling van de atherosclerotische laesie in de muis ook gekenmerkt door de aanwezigheid van foamcellen en andere immuuncellen zoals diverse soorten T cellen, B en dendritische cellen en mestcellen (Applications and Limitations of Mouse Models for Understanding Human Atherosclerosis Scheidt...Lusis, Cell Metabolism, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2016.11.001>).

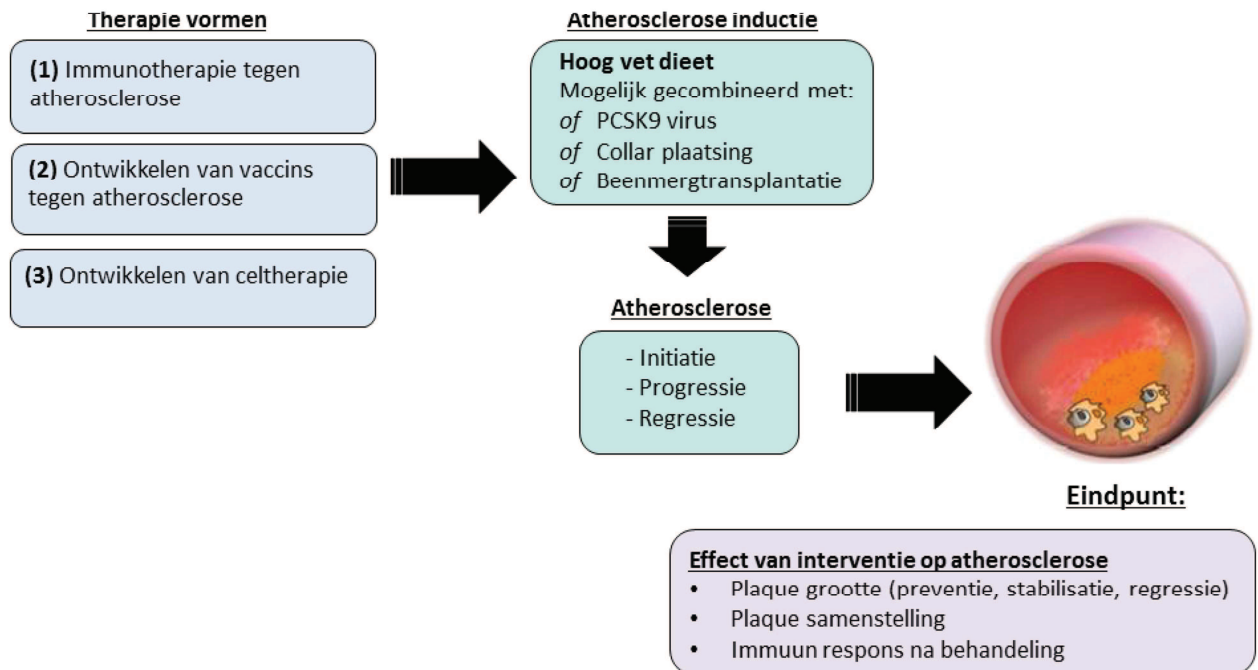
Onze algemene onderzoeksstrategie hebben we weergegeven in het onderstaande figuur. In eerste instantie zullen we immuuntherapieën individueel uittesten en alleen de succesvolle strategieën zullen we combineren met succesvolle protocollen uit de andere delen. Wij hebben in de afgelopen jaren nauwkeurig onderzocht wat het minimale aantal muizen per groep is om statistisch significantie remming (minimaal 20%) van atherosclerotische plaquevorming en regressie door therapeutisch ingrijpen aan te tonen.

In specifieke gevallen (waarschijnlijk maximaal 5% van de experimenten) zal een andere aanpak worden gebruikt om atherosclerose te induceren. We kunnen door middel van een virus dat codeert voor het enzym PCSK9 (mPCSK9-rAAV) atherosclerose induceren in wildtype muizen (C57Bl6). PCSK9 is het enzym dat betrokken is bij de afbraak van de LDL receptor in de lever. Een enkele injectie met het PCSK9 virus leidt in wildtype muizen tot op zijn minst 80 dagen na injectie een verhoogde expressie van mutant PCSK9 in de lever. Dit resulteert in een sterk verminderde expressie van de LDL receptor wat leidt tot een verhoogd plasma cholesterol gehalte. Hierdoor worden de wildtype muizen vergelijkbaar met een LDL receptor knockout muis en ontwikkelen ze atherosclerose (Bjorklund et al. Circ Res. 2014;114:1684-1689, 2014). Omdat muizen met een deficiëntie in immuun-gerelateerde genen voornamelijk beschikbaar zijn op een C57Bl/6 achtergrond was het tot voor kort nodig om dubbel knockout muizen te fokken, die deficiënt zijn voor het ontstekingsgen van interesse en voor de LDL receptor om atherosclerose-studies uit te voeren. Overexpressie van PCSK9 bespaart in dit geval veel muizen omdat het uitgebreide fokprotocol niet meer nodig zal zijn.

Afhankelijk van het te onderzoeken aangrijpingspunt en de gebruikte therapie kan er daarnaast voor gekozen worden om een versnelde vorm van atherosclerose te induceren door het plaatsen van een siliconen "collar" om de halsslagaders van de muis

█ Dit model heeft als voordeel dat een atherosclerotische plaque zich relatief snel vormt, en dat daarmee de behandelingstijd verkort kan worden. Daarnaast kan middels beenmergtransplantatie (BMT) technieken, die al vele jaren binnen onze vakgroep toegepast worden, specifiek de rol van vooraf bepaalde targets in het immuunsysteem onderzocht worden. Deze verschillende therapeutische strategieën en bijbehorende experimentele modellen zijn in detail beschreven in de betreffende bijlagen.

Onderzoeksstrategie: ontwikkeling van therapie tegen atherosclerose door middel van immuunmodulatie



De immuuntherapieën zullen worden getest in modellen van initiatie, progressie en regressie van atherosclerose. Hierdoor kunnen we onderzoeken of onze therapieën atherosclerose ontwikkeling kunnen remmen, of klinisch zeer relevant, bestaande atherosclerotische plaques kunnen stabiliseren of verminderen. Atherosclerotische parameters zoals plaque grootte, plaque samenstelling (immunohistochemie, soorten immuuncellen, ontstekingsmarkers) en serum lipide en cholesterol levels zullen worden bepaald. Daarnaast wordt het effect van de immuuntherapie op het immuunsysteem in lymfoïde organen en lokaal in de plaque uitgebreid bestudeerd door een keur aan verschillende analyses (bijv. multiplex assay voor cytokine bepalingen, T cel proliferatie assay), flow cytometry. Tijdens de experimenten zal via bloedafname vanuit de staartvene het cholesterol niveau en de immuunstatus in het bloed geanalyseerd worden, door bepaling van de verschillende T cel subklassen en de cytokine niveaus. Alvorens proefdier experimenten gestart worden, optimaliseren we de desbetreffende therapie in vitro zoals beschreven in 3.4.2. Met deze onderzoeksstrategie zullen we stap-voor-stap de onderzoeksvragen beantwoorden zonder verspilling van proefdieren.

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

Om tot een immuuntherapie te komen zullen drie verschillende experimenteel therapeutische benaderingen worden onderzocht, en mogelijk gecombineerd.

1. Immunotherapie

Het doel van deze therapie is door gebruik te maken van immuun-modulerende stoffen, zoals antilichamen, small molecules, siRNAs en cytokines, het immuunsysteem tijdens atherosclerose te zodanig te beïnvloeden dat de uitkomst van atherosclerose verbeterd wordt. Door de werking van bepaalde moleculen of cellen te stimuleren of te remmen willen wij inzicht verkrijgen in de immuunprocessen die atherosclerose veroorzaken en kunnen wij een effectieve pre-klinische immuuntherapie ontwikkelen. Wij zullen gebruik maken van immuun-modulerende stoffen zoals

antilichamen die co-stimulatoire routes moduleren (anti-OX40L, anti-PD-1, anti-PD-L1, anti-Tim-1, anti-Tim-4, anti-BTLA), van chemokine receptor antagonisten (CCR2, CCR5, CXCR4 antagonisten), immunoproteasoom remmers (om antigeen presentatie te remmen) en recombinante cytokines (IL-35, IL-37) die intraperitoneaal, intraveneus of intramusculair toegediend worden. Alvorens experimenten met proefdieren worden ingezet, zal de werking van de immuun-modulerende stoffen in vitro bepaald worden. Zo zullen we voorafgaand aan een dierexperiment bepalen of bijvoorbeeld blokkerende antilichamen tegen costimulatoire moleculen zoals OX40L daadwerkelijk de signalering van deze cascade remmen in gekweekte immuuncellen. Vervolgens zal de optimale dosering vastgesteld worden aan de hand van beschikbare literatuur, informatie uit samenwerkingsverbanden of middels een doseringsstudie. Uitsluitend die therapeutica die in staat zijn om in vitro hun beoogde effect te bewerkstelligen, zullen gebruikt worden in atherosclerose experimenten. Deze stapsgewijze opbouw zorgt voor het beperken van het gebruik van proefdieren.

2. Vaccinatie tegen atherosclerose

Met behulp van vaccinaties kan een zeer gerichte, langdurige immuunrespons opgewekt worden om atherosclerose te verminderen. Verschillende vaccins zullen worden getest, zoals geïsoleerde of gesynthetiseerde eiwitten/peptiden geformuleerd in nanodeeltjes (liposomen) of verpakt in verzwakte (live-attenuated) bacteriën of virussen. De aangrijpingspunten (antigenen) waarmee T cel responsen gemoduleerd kunnen worden, zijn bijvoorbeeld peptiden gebaseerd op het apoB100 eiwit dat zich op het oppervlak van het lage-dichtheids lipoproteïne (LDL) bevindt en specifieke pro-inflammatoire cytokines (interleukines of chemokines), maar ook andere apolipoproteïnen en heat shock eiwitten. Daarnaast zullen we kijken welke vaccinatiestrategie daarbij het beste werkt. We zullen daarbij kijken naar vaccinatie strategieën die B cellen induceren, of die CD4 of CD8 T cel responsen opwekken. De vaccins zullen, afhankelijk van de gewenste werking, door middel van intramusculaire, intraperitoneale, intraveneuze, orale of subcutane injectie toegediend worden. De werkzaamheid van de vaccin formulering zal enerzijds in vitro getest worden door het antigeen te vervangen door het model antigeen ovalbumine en te testen of de gewenste T cel reactie wordt geïnduceerd, terwijl anderzijds zal worden getest of de gebruikte antigenen kunnen binden aan de T cel receptor. Na een positief in vitro resultaat, zal een atherosclerose antigeen in deze vaccin formulering geplaatst worden en in vivo worden getest, waardoor het proefdier gebruik geminimaliseerd wordt.

3. Celtherapie

In atherosclerose hebben pro-inflammatoire cellen de overhand en leidt een chronische ontsteking tot verdere ontwikkeling van atherosclerotische plaques. Middels celtherapie kan het immuunsysteem dusdanig worden gemoduleerd dat de pro-inflammatoire cellen afgeremd worden. Wij zullen hiervoor verschillende celtypen zoals bijvoorbeeld regulatoire T cellen, dendritische cellen, myeloid-derived suppressor cellen of mesenchymale stamcellen via een adoptieve transfer intraveneus toedienen aan muizen die atherosclerose ontwikkelen. Door op verschillende momenten tijdens het proces van atherosclerose, deze adoptieve cel transfer toe te passen, kunnen wij het effect van deze cellen op de ontwikkeling, progressie en regressie van atherosclerose beoordelen. We zullen gebruik maken van zowel in vitro gekweekte cellen, zoals bijvoorbeeld dendritische cellen, macrofagen, myeloid-derived suppressor cellen en mestcellen, als van cellen direct geïsoleerd uit donormuizen, zoals regulatoire T, NKT en B cellen. Door gebruik te maken van donormuizen deficiënt voor bepaalde genen die coderen voor immuun-relevante eiwitten, verkrijgen we meer inzicht in het werkingsmechanisme van immuuncellen in atherosclerose.

Voor alle onderdelen geldt dat we ook nog onbekende aangrijpingspunten in het immuunsysteem zullen onderzoeken die we in de komende 5 jaar ontdekken (zowel uit eigen experimenten als de literatuur).

Om de verschillende therapievormen te testen zullen wij voornamelijk gebruik maken van de LDL receptor deficiënte (LDLr^{-/-}) muis en de apolipoproteïne E deficiënte (apoE^{-/-}) muis. Deze genetisch gemodificeerde muizen ontwikkelen door het voeren van een dieet rijk aan vet en cholesterol (Westers-type dieet met 0.25% cholesterol) atherosclerotische plaques. Daarnaast zullen ook meer

gehumaniseerde muismodellen worden gebruikt die naast hun atherosclerotische achtergrond humaan LDL en een humaan immuunsysteem bezitten.

In specifieke gevallen (maximaal 5% van de experimenten) zal een andere aanpak worden gebruikt om atherosclerose te induceren. Muizen met een deficiëntie in immuun-gerelateerde genen zijn voornamelijk beschikbaar op een C57Bl6/wildtype achtergrond. Om atherosclerose te induceren in wildtype muizen (C57Bl6) kan er gebruik gemaakt worden van een mPCSK9-rAAV. Dit virus codeert voor het enzym PCSK9 (mPCSK9-rAAV) wildtype muizen (C57Bl6) en muizen deficiënt voor een immuun LDL receptor knockout maken omdat het PCSK9 enzym er voor zorgt dat de LDL receptor wordt afgebroken. In de muizen kunnen we dus door een enkele intraveneuze injectie van het rAAV8-D377Y-mPCSK9 gevolgd door een Westers type dieet hypercholesterolemie induceren, wat leidt tot de ontwikkeling van atherosclerose. Afhankelijk van het experiment zullen muizen gedurende 4 tot 20 weken op dit Western-type dieet blijven staan om te kijken naar initiatie, progressie en regressie van atherosclerose. Het gebruik van dit PCSK9 virus zal de benodigde hoeveelheid muizen aanzienlijk verminderen aangezien muizen met een deficiëntie in immuun-gerelateerde genen niet meer naar een LDL receptor deficiënte achtergrond gefokt hoeven te worden.

Om atherosclerotische plaques te versneld te induceren in de halsslagaders zal we gebruik worden gemaakt van het collar-model dat is ontwikkeld in ons eigen laboratorium (Circulation, 103:1164-1179 (2001)). In LDLr^{-/-} of apoE^{-/-} muizen op een cholesterolrijk dieet zullen onder algehele anesthesie siliconen manchetten (collars) proximaal van de bifurcatie rond beide halsslagaders worden geplaatst. Deze collars zorgen voor een versnelde plaque vorming, waardoor 4-6 weken na de collar plaatsing plaques in een vergevorderd stadium bestudeerd kunnen worden. Specifiek kunnen we dit model gebruiken voor geneesmiddelen die we lokaal op de plaats van de plaque willen toedienen. In dat geval brengen we direct na collar plaatsing een pluronic gel met een specifiek immuun-modulerende stof aan de halsslagader aan de proximale zijde van de collar.

In bepaalde gevallen zal het wenselijk zijn om genen in beenmerg afgeleide cellen te bestuderen voor hun effect op atherosclerose. Door middel van een beenmergtransplantatie (BMT) techniek kunnen we chimere muizen creëren door beenmerg van genetische gemodificeerde muizen, die selectief het gen van interesse in de beenmerg-afgeleide cellen missen, naar acceptor LDLr^{-/-} muizen te transplanteren. Vervolgens wordt door het voeren van een Westers-type dieet de ontwikkeling van atherosclerose geïnduceerd.

De keuze voor een bepaalde techniek hangt af van het te onderzoeken aangrijpingspunt, de manier van ingrijpen en de duur van de toe te passen behandeling.

Zoals beschreven onder 3.4.1 zullen we in alle modellen aan het einde van het experiment het effect van een gekozen behadeling op atherosclerose bepalen, waarbij we niet alleen de mate van atherosclerose maar ook de plaque samenstelling, mate van ontsteking in de plaque, immuuncel populaties in lymfeknopen, bloed en milt; cholesterol en triglyceride niveaus. Door zo veel mogelijk data van elke muis te verzamelen krijgen we een goed beeld van de effectiviteit van de therapie en het beperkt het aantal benodigde proefdieren.

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.

Zoals vermeld, zullen we voordat we dierproef 1, 2 of 3 gaan uitvoeren in eerste instantie de werking van de immuun-modulerende stoffen, vaccins en desbetreffende cellen in *in vitro* systemen bevestigen en waar nodig optimaliseren. Alleen bij succesvolle, significante *in vitro* immuuntherapeutische protocollen met voldoende power zullen we vervolgens de dierproeven uitvoeren.

Als er geen effect is van de behandeling bij deze *in vitro* experimenten, zal er dus geen dierproef worden gestart.

Alle onderdelen beschreven in 3.4.2 zijn gericht op het ontwikkelen van een immuuntherapie voor de behandeling van atherosclerose en hangen dus nauw met elkaar samen. Voor elk individueel experiment dat onder de drie centrale therapievormen valt (immunotherapie (1), vaccinatie (2), celtherapie (3)) zal bepaald worden welke techniek van atherosclerose inductie wordt toegepast (hoog vet dieet, PCSK9 opregulatie, collars, BMT). De keuze voor een bepaalde techniek hangt af van het te onderzoeken

aangrijpingspunt, de manier van ingrijpen en de duur van de toe te passen behandeling. De primaire uitleesparameter van al deze dierproeven is de grootte en samenstelling van de atherosclerotische plaque. Door de experimentele variatie in deze parameters is het niet mogelijk om eerst een pilot experiment met een klein aantal dieren uit te voeren, omdat dit geen statistisch betrouwbare indicatie zal geven.

We zullen na elk experiment in dierproef 1, 2 en 3 evalueren of het gewenste effect op het immuunsysteem bereikt is en of dit leidt tot remming van atherosclerose of stabilisatie van de plaque. De immuunrespons zal in kaart gebracht worden door het meten van de frequentie en activatiestatus van allerlei immuuncellen zoals T cellen, macrofagen, B cellen in bloed, lymfoïde organen en lokaal in de plaque. Mocht een behandeling geen effect hebben op de primaire uitleesparameters (plaquegrootte en samenstelling), dan zal het onderzoek naar deze immunotherapeutische behandeling niet worden gecontinueerd of verder ontwikkeld, en zal ook niet in een combinatietherapie worden gebruikt.

Als een immunotherapie wel succesvol blijkt door een significante reductie in de atherosclerose, kunnen indien nodig vervolggexperimenten worden ingezet om de behandeling te optimaliseren, of kan deze gecombineerd worden met succesvolle (cel)therapieën om een zo effectief mogelijke behandeling voor atherosclerose te ontwikkelen.

Mijlpalen per experiment zijn eenduidig omschreven in ieder individueel protocol: we kunnen plaque ontwikkeling middels plaque grootte, samenstelling en immunologische parameters nauwkeurig meten en statistische significante verschillen tussen de groepen kunnen berekenen.

Mijlpalen voor de projectonderdelen zijn:

1. Ontwikkelen van een immunotherapie tegen atherosclerose die plaque ontwikkeling en bestaande plaques kan reduceren door het ingrijpen in het immuunsysteem.
2. Ontwikkelen van vaccins tegen atherosclerose die een zeer gerichte immuunrespons opwekken waardoor atherosclerose vermindert wordt
3. Ontwikkelen van een celtherapie die pro-inflammatoire immuun responsen in atherosclerose afremt en zo atherosclerose ontwikkeling vermindert.

De voorgestelde experimenten uit dit project zullen parallel aan elkaar lopen en zullen binnen de voorgestelde tijd van 5 jaar afgerond kunnen worden. De verzamelde kennis uit ons onderzoeksproject zal bijdragen aan meer inzicht in de relatie tussen het immuunsysteem en atherosclerose. Deze kennis is nodig om tot rationeel ontworpen vormen van immunotherapie te komen die krachtig genoeg zijn om in de kliniek te testen, een traject dat we als onderzoeksgroep reeds doorlopen hebben.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Immunotherapie tegen atherosclerose
2	Vaccinatie tegen atherosclerose
3	Cellulaire therapie ter behandeling van atherosclerose
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.	10600	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Universiteit Leiden	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		1	Effect van immunotherapie op atherosclerose

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 primaire doel van de experimenten beschreven in deze bijlage is het therapeutische effect van immuunmodulerende stoffen, zoals antilichamen, small molecules, siRNAs en cytokines, op de initiatie, progressie en regressie van atherosclerose te bepalen. Wij zullen bestuderen of deze stoffen de basis kunnen vormen voor de ontwikkeling van geneesmiddelen ter behandeling van hart- en vaatziekten.

Wat betreft immuunmodulerende antilichamen zal de nadruk voornamelijk liggen op het testen van antilichamen tegen costimulatorische eiwitten zoals OX40L, CD40 en checkpoint inhibitors zoals PD-1/PD-L1 en Tim eiwitten en het blokkeren van inflammatoire cytokines zoals IL-12 en IL-23 door antilichamen. We zullen ook antilichamen gebruiken die bepaalde typen immuuncellen kunnen depletieren, zoals anti-CD19 antilichamen die B cellen depletieren en anti-CD8 en anti-CD4 antilichamen die T cel subsets depletieren.

Naast antilichamen zullen we ook small molecules zoals proteasoom remmers en chemokine receptor antagonisten gebruiken om de antigen-specifieke activatie van ontstekingscellen en hun rekrutering naar de vaatwand te blokkeren. Een andere mogelijkheid om de expressie van ontstekings-eiwitten te remmen is het gebruik van specifieke siRNAs, die het mRNA coderend voor deze ontstekings-eiwitten destabiliseert en daardoor hun expressie verlaagt. De rol van cytokines in atherosclerose zal niet alleen bestudeerd worden door antilichamen die de cytokines blokkeren, maar ook door de expressie van anti-inflammatoire cytokines (bijv. IL-35 en IL-37) te verhogen. We kunnen dit bewerkstelligen door injectie van recombinante cytokines of door overexpressie van het desbetreffende cytokine waarbij we gebruik maken van een adeno-associated of lentivirus of door elektroporatie van interleukine coderende plasmides in de dijbeenspier.

In het grootste gedeelte van het onderzoek (80-90%) zullen voor deze experimenten LDL receptor deficiënte (LDLr^{-/-}) muizen, apolipoproteïne E deficiënte (apoE^{-/-}) muizen of LDLr deficiënte muizen die het humane ApoB100 tot overexpressie brengen (LDLr^{-/-}/hapoB100^{tg}) worden gebruikt. De muizen zullen voor een bepaalde tijd (tussen 6 weken (initiële atherosclerose) en 26 weken (zeer vergevorderde atherosclerose)) op een Westers-type dieet worden geplaatst om het plasma cholesterolniveau te verhogen en spontane atherosclerose in het driekleppen gebied van de aorta (= waar de aorta het hart verlaat) en de

rest van de aorta te induceren. Gedurende de ontwikkeling van deze spontane atherosclerose zal de behandeling worden gegeven. Tevens kunnen bovenstaande behandelingen worden toegepast om het effect van de behandeling in latere stadia van atherosclerose te meten.

In enkele specifieke gevallen (elk maximaal 5%) kan, naast de inductie van atherosclerose door het voeren met een westers type dieet, gekozen worden voor een van de hieronder gespecificeerde experimentele benaderingen (A, B of C):

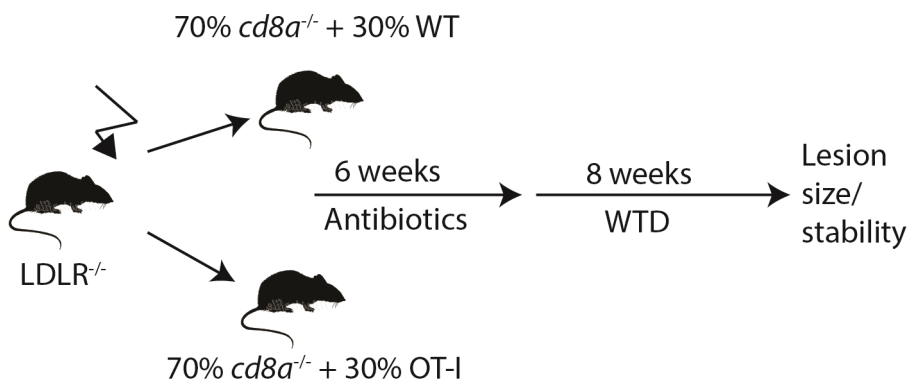
A) Teneinde versneld atherosclerotische plaques te ontwikkelen in de halsslagaders, kan gebruik worden gemaakt van het zogeheten collar-model. Dit model voor versnelde ontwikkeling van atherosclerotische plaques in de halsslagader van hyperlipidemische muizen ($LDLR^{-/-}$, $LDLR^{-/-}/hApoB100tg$ of $apoE^{-/-}$ muizen) is binnen ons laboratorium ontwikkeld en beschreven door [REDACTED]

[REDACTED]. De plaques die op deze manier geïnduceerd worden vormen een relevant model voor humane plaques, aangezien de plaques op een sterk vergelijkbare wijze zijn opgebouwd. Atherosclerotische plaques zullen versneld vormen, waarbij na 4 weken wordt gekeken naar zogeheten plaque progressie, en na 6 weken naar vergevorderde plaques, afhankelijk van de toepassing. Dit model zal worden gebruikt om het therapeutisch effect te bepalen van bijvoorbeeld small molecules, siRNAs of antilichamen, die systemisch zullen worden toegediend zoals beschreven in de aanvraag.

Dit model zal met name gekozen worden als er maar een relatief korte behandelingsduur mogelijk is. Dit model heeft daarnaast als groot voordeel dat de vaatwand lokaal behandeld kan worden, zonder systemische bijeffecten, waardoor het directe effect op de atherosclerotische plaque bepaald kan worden. In sommige gevallen zullen genen kunnen lokaal tot overexpressie worden gebracht middels virale transductietechnieken (adenoviraal; GGO nummer 02038, lentiviraal; GGO nummer 02235, of AAV; GGO nummer 08013).

B) Muizen met een deficiëntie in immuun-gerelateerde genen zijn voornamelijk beschikbaar op een C57Bl6/wildtype achtergrond. Om atherosclerose te induceren in wildtype muizen (C57Bl6) kan er gebruik gemaakt worden van een mPCSK9-rAAV. PCSK9 is een enzym dat door binding aan de LDL receptor de afbraak van de LDL receptor in de lever versnelt. Middels een enkele injectie van het rAAV8-D377Y-mPCSK9 (GGO nr. IG-08013), dat codeert voor een gemuteerde vorm van het muis PCSK9 enzym (lever-specifiek), hebben wildtype muizen tot ten minste 80 dagen na injectie een verhoogde expressie van mutant PCSK9 in de lever. Dit resulteert in een zeer sterke downregulatie van de LDL receptor in de lever en dit leidt tot een verhoogd plasma cholesterol waardoor C57Bl6 muizen atherosclerose ontwikkelen (Bjørklund et al. Circ Res. 2014;114:1684-9). Door dit ook toe te passen op muizen deficiënt voor immuun genen kunnen we de rol van deze immuun genen vast stellen zonder de muizen terug te kruisen op een $LDLR^{-/-}$ of $apoE^{-/-}$ achtergrond.

C) Om de rol van specifieke leukocyt populaties op de ontwikkeling van atherosclerose te bepalen kan gebruik gemaakt worden van een beenmerg transplantatie. De muizen worden hierbij bestraald met 2x4.5 Gray gamma straling, waardoor het beenmerg van deze dieren uitgeschakeld wordt (onze afdeling heeft meer dan 20 jaar ervaring met deze methode). De volgende dag ontvangen de dieren beenmerg van donor muizen (zie figuur 1). In de weken na de beenmerg transplantatie zal dit donor beenmerg uitgroeien en het complete hematopoietische systeem van de ontvanger muis vervangen. Hierdoor ontstaat een chimere muis, waarbij het fenotype van de leukocyten afhankelijk is van het donor beenmerg. In het voorbeeld van figuur 1 ontvangen de muizen een mix van beenmerg van $CD8^{-/-}$ donoren en wildtype of OT-I transgene muizen. Het resultaat van een dergelijk beenmerg transplantatie is dat de ontvangers van de $CD8^{-/-}$:OT-I mix geen cytotoxische T cellen heeft, die specifiek zijn voor antigenen betrokken bij atherosclerose. Door deze dieren na de complete reconstitutie van het beenmerg een Westers type dieet te voeren kunnen we de invloed van deze groep CD8 T cellen op de pathogenese van atherosclerose bestuderen.



Figuur 1: Voorbeeld proefopzet voor het bepalen van de rol van antigeen specifieke T-cellen in atherosclerose. Door het OT-I beenmerg te vervangen met andere soorten beenmerg, kunnen andere type T-cellen worden onderzocht.

De primaire uitkomstparameters van alle hierboven beschreven experimentele aanpakken zijn de effecten van de immuun-modulerende behandeling (immunotherapie) op:

- atherosclerose: de plaquegrootte in het hart, in de aorta en in de halsslagaders (in geval van collar plaatsing) wordt exact gekwantificeerd (in μm^2) en de plaque samenstelling wordt bepaald op parameters als aantallen immuuncellen, collageengehalte en oppervlak necrotische kern.
- activatie status van immuuncellen in bloed, organen en lokaal in de plaque (expressie van bepaalde activatiemoleculen door de verschillende celtypen bepaald middels flow cytometrie)
- cholesterol en triglycerideniveaus in bloed
- cytokine niveau en expressie in bloed en weefsels (lymfeklieren, milt, lever, beenmerg)

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.

Afhankelijk van het aangrijpingspunt van de studie (zie hoofdvraag) en de mogelijkheden van interferentie (bijvoorbeeld de beschikbaarheid van blokkerende antilichamen, small molecules, siRNA) zal er gekozen worden voor een bepaalde manier van ingrijpen. Dit kan zijn door het toedienen van antilichamen of recombinant eiwitten, small molecules, siRNAs of door overexpressie van cytokines. De verschillende mogelijkheden van toediening zijn hieronder beschreven:

Toedienen van antilichamen of recombinante eiwitten:

- Intraperitoneaal (maximaal 100 microliter per injectie, injectie frequentie verschilt per antilichaam/eiwit normaliter 2-3x per week)
- Intraveneus (maximaal 100 microliter per injectie, injectie frequentie verschilt per antilichaam/eiwit, normaliter 2-3x per week)

Toediening van small molecules:

- Intraperitoneaal (maximaal 100 microliter per injectie, injectie frequentie verschilt per molecuul, normaliter 2-3x per week)

Toediening van siRNAs:

- Intraveneus of intraperitoneaal, afhankelijk van de toepassing (maximaal 100 microliter (i.v./i.p) per injectie, frequentie verschilt per siRNA, normaliter eenmalig)

Overexpressie van cytokines of andere immuun gerelateerde eiwitten:

- Lentivirale overexpressie: het beïnvloeden van de expressie van cytokines willen we bewerkstelligen door gebruik te maken van overexpressie van de eiwitten zelf of overexpressie van zogeheten soluble receptoren die het interleukine neutraliseren. In de muizen wordt in de dijbeenspieren een leeg lentivirus of een lentivirus (10^7 virusdeeltjes in 30 μL , GGO IG-02235), dat codeert voor een interleukine, ingespoten.
- Overexpressie door electroporatie van een voor een interleukine coderend plasmide: een alternatief voor de virusinjecties is het injecteren van een plasmide, dat codeert voor het desbetreffende cytokine

gevolgd door een electroporatie van het plasmide in de dijbeenspier. De muizen krijgen eerst een injectie van 30 microliter hyaluronidase in de dijbeenspier. Na een uur worden de muizen met isofluraan verdoofd. Onder volledige anesthesie krijgen de muizen een injectie van 30 microliter in elke dijbeenspier die een plasmide coderend voor het desbetreffende cytokine opgelost in buffer bevat, direct gevolgd door de electroporatie. De electroporatie bestaat uit 8 pulsen met een lengte van 10 milliseconden en 200V/cm met een interval van 1 seconde.

Per experiment zal worden bepaald wat de meest optimale behandelingsmethode zal zijn op basis van literatuur en in vitro experimenten om het risico op een vals negatief resultaat te verminderen. De keuze zal worden toegelicht in het desbetreffende OZP.

Monster neming voor analyse gedurende experiment:

Afhankelijk van de onderzoeksvraag (plaque initiatie, plaque progressie, behandeling van vergevorderde plaques, plaque regressie) zal een experiment tussen de 6 en 26 weken duren. Elke twee weken zal bloed worden afgenomen via staartsnede (2 weken, 100 microliter per bloedafname) om de concentratie van de toegediende immuun modulerende stof of concentratie van het chimere eiwit te volgen. Ook zal in hetzelfde serum monster een set aan ontstekingsfactoren (bv TNF-alpha, IL-12, IL-4, IL-5, IL-6) worden bepaald middels een Luminex (ELISA) assay om ontstekingsreacties te bekijken.

Euthanasie ter beëindiging experiment:

Aan het einde van het experiment zullen voorafgaand aan het perfunderen van de weefsels de dieren een geschikte anesthesie toegediend krijgen, die voorkomt dat het dier ongemak zal ondervinden gedurende de perfusie met PBS. Na perfusie worden de weefsels van interesse en plasma/serum voor ex vivo/in vitro analyse naar het laboratorium gebracht voor verdere analyse.

Bij bepaalde experimenten zal gekozen worden voor een specifieke experimentele aanpak (A, B of C):

A) Collar-operatie:

- De muizen gedurende het gehele experiment op een speciaal cholesterol-rijk dieet geplaatst worden (vanaf 2 weken voor de operatie). Onder algehele adequate anesthesie zullen siliconen manchetten (zogenoemde collars) geplaatst worden rond beide halsslagaders van de hierboven beschreven muizen proximaal van de bifurcatie; na plaatsing zal de incisie gehecht worden met zijden hechtdraad en kunnen de muizen herstellen gedurende minimaal 24 uur waarbij de pijn verlicht zal worden door een subcutane injectie van buprenorphine (0.1 mg/kg).

- In geval van lokale behandeling zal blootstelling met bepaalde stoffen of virale transductie van de vaatwand via de adventitiële zijde plaatsvinden. Hierbij wordt direct na de collarplaatsing een pluronic gel (vloeibaar bij 4 graden C, stolt bij 37 graden C, 10 microliter per bloedvat) die het betreffende virus bevat, geplaatst op het bloedvat aan de proximale zijde van de collar.

B) PCSK9-AAV:

De muizen zullen middels 1 intraveneuze injectie 5 tot 10 x10¹¹ genome copies rAAV8-D377Y-mPCSK9 ontvangen in een volume van 100 microliter. 0 tot 7 dagen na injectie van het PCSK9 virus zullen de muizen op een speciaal cholesterol-rijk dieet geplaatst worden ter bevordering van atherosclerose ontwikkeling.

Muizen zullen afhankelijk per experiment gedurende 4 tot 26 weken op dit speciale cholesterol-rijke dieet blijven staan om verschillende stadia van atherosclerose te bestuderen.

C) Beenmergtransplantatie:

De dieren worden gehuisvest in gesteriliseerde IVC kooien en zullen een week voor aanvang van de beenmerg transplantatie antibiotica (83 mg/l ciprofloxacin, 67 mg/ polymyxine B sulfaat en 6.5 g/l suiker) in hun drinkwater krijgen om de kans op infecties te verkleinen. Het endogene beenmerg van de ontvanger zal worden uitgeschakeld volgens een geëvalueerd protocol. Hiertoe worden muizen 1 dag voor de transplantatie bestraald met 2x4.5 Gy (0.19 Gy/min, 200 kV, 4 mA) röntgenstraling, gebruik makende van een Andrex Smart 225 met een 6 mm aluminium filter. De volgende dag worden de muizen intraveneus geïnjecteerd via de staartvene met minimaal 5x10⁶ donorbeenmergcellen in 200 µl fysiologische zoutoplossing. Deze donor cellen worden geïsoleerd uit de tibia en femur van donoren nadat deze geëuthanaseerd zijn middels cervicale dislocatie. Na de transplantatie zullen de dieren nog 6 weken antibiotica in hun drinkwater krijgen. In het uitzonderlijke geval dat de dieren na transplantatie verzwakt zijn, zullen de dieren gedurende 2 weken na de transplantatie naast het standaardvoer een papje worden aangeboden. Na 8 weken zal bloed afgenomen worden via staartsnede om te bepalen of de transplantatie succesvol is geweest. Vervolgens krijgen de dieren een westers type dieet voeding gedurende 8 tot

maximaal 26 weken.

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

In alle studies die wij zullen uitvoeren is de mate van atherosclerose (plaquegrootte) de belangrijkste uitleesparameter en dit blijkt ook de parameter met de grootste standaard afwijking (25%). Onderstaande parameters zijn gebaseerd op eigen jarenlang onderzoek en geven aan dat een groepsgrootte van 15 muizen gebruikt kan worden om betrouwbare statistische resultaten te verkrijgen.

Statistische parameters:

Onbetrouwbaarheidsdrempel 5%

Onderscheidend vermogen 80%

Coëfficiënt (tweezijdig toetsen) 21

Verificatienorm 10%

Meetbaar effect 35%

Standaard afwijking 25%

Het aantal benodigde dieren (n) per groep volgens de formule $n = 2 \left[\frac{(Z_{\alpha/2} - Z_p)(VC/100)m_1}{(m_1 - 100)} \right]^2$ is: $2 \left[\frac{(1.96 - (-0.855))(25/100)135}{135 - 100} \right]^2 = 2 \left[\frac{(2.815 \times 0.25 \times 135)}{35} \right]^2 = 14.7$. Dit betekent 15 muizen per groep.

Experimenten bestaan doorgaans uit twee groepen (een controle groep en een groep die de immuunmodulerende stof ontvangt) of drie groepen (controle groep met PBS behandeld, controle antilichaam en blokkerend antilichaam), waardoor een standaard experiment uit 30-45 muizen bestaat. Indien mogelijk worden experimenten gecombineerd om het aantal controle groepen te reduceren.

B. De dieren

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

Muizen op een C57Bl6 achtergrond zijn verkregen via Jackson Laboratories of via samenwerking. Dit betreft LDLr^{-/-}, LDLr^{-/-}/hApoB100tg en apoE^{-/-} muizen, en daarnaast muizen met een deficiëntie van het gen van interesse op een C57Bl6 of hyperlipidemische achtergrond, met bijbehorende controle muizen. De voor deze proeven vereiste muizen zullen worden verkregen uit eigen fok in het [REDACTED] te Leiden.

Voor deze experimenten zullen we LDL receptor of ApoE deficiënte dieren gebruiken die op een Westers type dieet (0.25% cholesterol) atherosclerose ontwikkelen. Ook meer gehumaniseerde muizenstammen zullen worden gebruikt die humaan apoB100 tot overexpressie brengen in combinatie met humaan antigen presenterende moleculen (HLA-DR). Wij zullen voor ons onderzoek zowel mannelijke als vrouwelijke muizen gebruiken.

Per experiment, na overweging van de resultaten van eerdere experimenten, wordt bepaald welke groepen er nodig zullen zijn en hoeveel dieren er nodig zijn. Voor aanvang van de experimenten zullen protocollen geschreven worden, ter beoordeling van de IVD, die groepsgroottes bevatten bepaald op basis van jarenlange ervaring gecombineerd met statistische berekeningen (15 dieren per groep, zie bovenstaande statistiek). We zullen daarbij volwassen dieren gebruiken (8-12 weken oud).

Zoals aangegeven in de hoofdvraag zijn er een aantal processen in het immuunsysteem, die een effect kunnen hebben op de ontwikkeling van atherosclerose. In elk van deze processen kan ingrijpen noodzakelijk zijn om het proces van atherosclerose gunstig te beïnvloeden. De aangrijpingspunten die onderzocht zullen worden zijn: CD40, OX40L, checkpoint inhibitors PD-1/PD-L1, Tim eiwitten, BTLA, Fcγ en Fcε receptoren, CD19, mestcel activatoren, chemokine receptoren zoals CCR2 en CCR5, miRNAs 494 en 329, en cytokines zoals IL-35 en IL-37. Daarnaast zullen ook tot op heden onbekende aangrijpingspunten in het immuunsysteem onderzocht worden.

De immunologie is een zeer dynamisch onderzoeksveld, waarin in de komende 5 jaar een naar verwachting aanzienlijk aantal nieuwe moleculen en regelsystemen ontdekt zal worden. Wij verwachten daarom dat wij in 5 jaar ongeveer 70 experimenten zullen doen, van gemiddeld 2 groepen (controle en behandeling), wat neerkomt op 15 muizen per groep x 2 groepen = 30 muizen per experiment x 70 experimenten = maximaal 2100 muizen.

Bij een beenmergtransplantatie-experiment zal beenmerg worden geïsoleerd uit donormuizen. Uit ervaring weten we dat we per 5 ontvangermuizen 1 donormuis nodig zullen hebben. Dit zal uitkomen op 42 donoren

(~7 experimenten met BMT=7 x 30 dieren=210 dieren/5=42).
Dit maakt het totaal 2142 muizen.

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.

Om aan te tonen dat de genoemde immuun modulerende stoffen een effect hebben op de verschillende stadia van atherosclerose zijn *in vivo* modellen nog steeds noodzakelijk. Atherosclerose (en met name plaqueruptuur) is het pathologisch resultaat van een veranderde samenstelling van de vaatwand en een verstoorde communicatie tussen een groot aantal verschillende celtypen. De complexiteit van onderliggende mechanismen (ontsteking in de plaque en in de lymfoïde organen, apoptose, matrixremodelling), het onderlinge samenspel van de verschillende celtypen aanwezig in een atherosclerotische plaque en de bijdrage van componenten in de bloedsomloop aan de pathofysiologie impliceren dat *in vitro* studies (en met name single cell systemen), en daarmee vervanging van proefdieren, slechts op zeer beperkte schaal mogelijk zijn.

Vervanging: Wij hebben human plaques beschikbaar waarin we de aanwezigheid van specifieke immuuncellen kunnen aantonen, en met deze cellen kunnen immuunmodulerende stoffen *in vitro* worden getest. Waar mogelijk zullen ook *in vitro* experimenten worden gedaan in assays (zoals migratieassay met transwell systemen) gebaseerd op de volgende cellijnen: RAW264.7 cellen (muis macrofaag cellijn), H5V cellen (endotheel cellijn), gladde spiercellen en MC9/G8 cellen (muis mestcellijn). Atherosclerose is echter een complexe ziekte die tot stand komt door een combinatie van voeding, cholesterol homeostase in de lever en cholesterol afvoer via de gal, ontstekingsreacties in lymfoïde organen en de migratie van immuuncellen vanuit beenmerg en lymfoïde organen naar de plaques in de slagader. Effecten van door ons te onderzoeken stoffen die dit complexe proces beïnvloeden zijn daarom niet volledig te testen in uitsluitend *in vitro* modellen. Het blijft daarom noodzakelijk om het effect van experimentele geneesmiddelen op het complexe proces van atherosclerose te onderzoeken via *in vivo* experimenten.

Vermindering: Om atherosclerose-studies in muizen met een deficiëntie in immuun-gerelateerde genen uit te voeren moesten deze muizen tot op heden teruggekruist worden naar een LDL-receptor deficiënte achtergrond wat veel muizen en tijd kost. De rAAV8-D377Y-mPCSK9 vector zoals beschreven zal gebruikt worden om de ontwikkeling van atherosclerose in muizen op een C57Bl6 achtergrond te stimuleren als alternatief voor het terugkruisen op een LDLr deficiënte achtergrond en zo de hoeveelheid muizen nodig voor atherosclerose onderzoek aanzienlijk verminderen. Door uit te gaan van humane plaques kunnen we de relevante targets voor immunotherapie in de mens definiëren en voorkomen we dat we targets gaan testen die alleen in het proefdier relevant zijn. Dit model zal alleen worden toegepast als het om een gen-deficiënte muis gaat, en zal niet worden toegepast voor interventiestudies.

Verfijning: het experimentele protocol is zodanig geoptimaliseerd, dat er met een minimaal aantal dieren volstaan kan worden: uit de ervaring van de divisie ██████████ op het gebied van hart- en vaatziekten is gebleken dat er een bepaald aantal dieren nodig is om in de vaatwand een meetbaar effect van een behandeling significant te kunnen waarnemen. Voor de optimale dosering van antilichamen en small molecule drugs zullen *in vivo* pilots uitgevoerd worden om het experimentele protocol verder te verfijnen. Voor aanvang van de dierexperimenten waarbij overexpressie van immuun gerelateerde eiwitten/cytokines wordt onderzocht, zal voor elk construct *in vitro* worden bepaald of er daadwerkelijk functionele cytokines/receptoren worden gemaakt. Constructen zullen *in vitro* tot overexpressie worden gebracht en worden getest op hun functionaliteit door middel van bio-assays.

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.

Om angst bij de dieren tot een minimum te beperken zullen muizen niet alleen gehuisvest worden, maar altijd met meerdere muizen in aanwezigheid van kooiverrijking (kartonnen rol, papier en bijthoutje). Teneinde ongerief/pijn te verminderen zal direct na de microchirurgische handelingen gedurende tenminste 24 uur pijnbestrijding worden toegepast middels een subcutane injectie van buprenorphine (100 µL, 0.1 mg/kg, 2 maal met 12 uur interval). Daarnaast zullen muizen, die met het PCSK9-AAV behandeld worden, gehuisvest worden in de DM-II faciliteit, waarna bij het verschonen het afval ter destructie wordt afgevoerd zodat het niet in het milieu terecht komt.

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.

n.v.t.

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.

Teneinde het ongerief te verminderen zal direct na de microchirurgische handelingen gedurende minimaal 24 uur pijnbestrijding worden toegepast middels een subcutane injectie van buprenorfine (100 µL, 0.1 mg/kg, 2 maal met 12 uur interval). Mochten er langer kenmerken van pijn waarneembaar zijn wordt deze

pijnbestrijding gecontinueerd zolang nodig.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Bij een operatie voor collar plaatsing kan de plaatsing van de ligatuur kan incidenteel het syndroom van Horner tot gevolg hebben door beschadiging van de perivasculaire sympathische zenuwen, waarbij partiële ptosis van het ooglid kan ontstaan. Het zicht wordt hierdoor matig belemmerd. In het geval van een beenmergtransplantatie kan in enkele gevallen gewichtsverlies en intestinale problemen (diarree, bloeding) voorkomen.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Collar: De plaatsing van het ligatuur kan incidenteel het syndroom van Horner tot gevolg hebben. BMT: Het donor beenmerg kan afgestoten worden (host versus graft disease) of het donor beenmerg kan Een immuun reactie voorzaken (graft versus host disease). Doordat wij uitsluitend kiezen voor een beenmergdonor (graft) en acceptor (host) op een zelfde C57Bl6 achtergrond wordt dit probleem vrijwel geheel voorkomen.

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

De muizen worden dagelijks gemonitord door de onderzoeker en de dierversorgers en wanneer deze symptomen (syndroom van Horner, sterk gewichtsverlies, intestinale problemen) worden geconstateerd zal het desbetreffende dier worden geëuthanaseerd.

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.

Een dier zal voortijdig worden geëuthanaseerd indien de volgende gezondheidsproblemen zich voordoen om het ongerief voor het betreffende dier te beperken:

- meer dan 15% gewichtsverlies in 2 dagen of meer dan 20% gewichtsverlies ten opzichte van het begin van het experiment. Het gewicht van de muizen zal daarom om de dag worden gemeten in de eerste dagen na een collar-operatie en na een beenmergtransplantatie.
- Zichtbaar lijden (trillen/apathie/verwondingen door kooigenoten etc.)

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

Uit ervaring uit soortgelijke experimenten is gebleken dat minder dan 3% van de dieren voldoet aan deze criteria in een experiment zonder chirurgische handelingen. In geval van het plaatsen van een collar of het ondergaan van een beenmergtransplantatie zal ongeveer 10% van de dieren een van deze criteria 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.

ongerief ingeschat op matig. De dieren in totaal 9 gray röntgenstraling ontvangen met een daarop volgende, tijdelijke immundeprivatie. Hoewel uitzonderlijk, bestaat de kans dat het beenmerg na de transplantatie niet aanslaat. Dit gaat in de meeste gevallen samen met een gewichtsafname van de muizen (>20% in twee dagen) en in dat geval zal tot voortijdige euthanasie worden besloten. De dieren zullen daarom ook in de eerste twee weken zeer regelmatig gewogen worden(om de dag), en na deze twee weken elke week. We verwachten dat we in ongeveer 10% van het totaal aantal benodigde dieren een BMT zullen gaan uitvoeren (~7 experimenten met BMT=7 x 30 dieren=210 dieren).

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.

Om te bepalen of behandeling met immuun-modulerende stoffen de mate van atherosclerose ontwikkeling vermindert en dus gebruikt kan worden als potentiële immunotherapie om hart- en vaatziekten te voorkomen of verminderen, is het essentieel om het hart, de aorta en immuun gerelateerde organen (milt, lymfeknopen) te verkrijgen voor analyse.

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.	10600	
1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Universiteit Leiden	
1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
	2	Vaccinatie tegen atherosclerose

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 experimenten hebben ten doel om de effectiviteit van vaccins tegen atherosclerose te testen. Bij het testen van vaccins is het gebruik maken van diermodellen onontbeerlijk, aangezien er geen bestaande *in vitro* modellen van atherosclerose zijn en de complexe interacties van immuuncellen, die ontstaan na toediening van een vaccin evenmin na te bootsen zijn *in vitro*. Wij zullen daarom gebruik maken muismodellen voor atherosclerose. Wanneer deze muizen gevoerd worden met een dieet met een verhoogde hoeveelheid vetten en cholesterol (Westers Type Dieet, WTD), ontwikkelen deze dieren binnen enkele weken atherosclerotische plaques in het hart en de grote slagaderen zoals de aorta. De locatie van de plaques en de samenstelling van de plaques is vergelijkbaar met de menselijke situatie. Door deze dieren op verschillende momenten gedurende de ontwikkeling van atherosclerose een vaccin toe te dienen kunnen wij het effect van vaccinatie op atherosclerose beoordelen.

In het grootste gedeelte van het onderzoek (80-90%) zullen voor deze experimenten LDL receptor deficiënte (LDLr^{-/-}) muizen, apolipoproteïne E deficiënte (apoE^{-/-}) muizen of LDLr^{-/-} deficiënte muizen die het humane ApoB100 tot overexpressie brengen (LDLr^{-/-}/hApoB100^{tg}). De muizen zullen voor een bepaalde tijd (tussen 6 (initiële atherosclerose) en 16 weken (vergevoerde atherosclerose)) op een Westers-type dieet worden geplaatst om spontane atherosclerose in het hart en de aorta te induceren. Tegelijkertijd zal een vaccin worden toegediend om het effect van dit vaccin op de ontwikkeling van atherosclerose te bepalen.

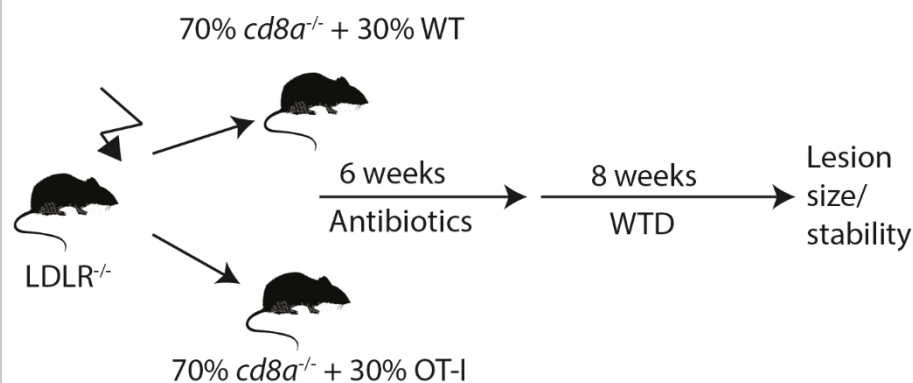
In enkele specifieke gevallen (elk maximaal 5%) kan, naast de inductie van atherosclerose door het voeren met een westers type dieet, gekozen worden voor een van de hieronder gespecificeerde experimentele benaderingen (A, B of C):

A) Teneinde versneld atherosclerotische plaques te ontwikkelen in de halsslagaders, kan gebruik worden gemaakt van het zogeheten collar model te gebruiken. Dit model voor versnelde ontwikkeling van atherosclerotische plaques in de halsslagader van hyperlipidemische muizen (LDLr^{-/-}, LDLr^{-/-}/hApoB100^{tg} of apoE^{-/-} muizen) is binnen ons laboratorium ontwikkeld en beschreven door [REDACTED]

De plaques die op deze manier geïnduceerd worden vormen een relevant model voor humane plaques, aangezien de plaques op dezelfde wijze zijn opgebouwd. Atherosclerotische plaques zullen versneld vormen, waarbij na 4 weken wordt gekeken naar zogeheten plaque progressie, en na 6 weken naar vergevorderde plaques, afhankelijk van de toepassing.

B) Muizen met een deficiëntie in immuun-gerelateerde genen zijn voornamelijk beschikbaar op een C57Bl6/wildtype achtergrond. Om atherosclerose te induceren in wildtype muizen (C57Bl6) kan er gebruik gemaakt worden van een mPCSK9-rAAV. PCSK9 is een enzym dat door binding aan de LDL receptor de afbraak van de LDL receptor in de lever versneld. Middels een enkele injectie van het rAAV8-D377Y-mPCSK9 (GGO nr. IG-08013), wat codeert voor een gemuteerde vorm van het muis PCSK9 enzym (lever-specifiek), hebben wildtype muizen tot ten minste 80 dagen na injectie een verhoogde expressie van mutant PCSK9 in de lever. Dit resulteert in de downregulatie van de LDL receptor in de lever en dit leidt tot verhoogd plasma cholesterol waardoor wildtype muizen atherosclerose zullen ontwikkelen (Bjørklund et al. Circ Res. 2014;114:1684-9).

C) Om de rol van specifieke leukocyt populaties op het effect van een vaccinatie en atherosclerose te bepalen kan gebruik gemaakt worden van een beenmerg transplantatie. De muizen worden hierbij bestraald met 2x4.5 Gray gamma straling, waardoor het beenmerg van deze dieren uitgeschakeld wordt. De volgende dag ontvangen de dieren beenmerg van donor muizen (zie figuur 1). In de weken na de BMT zal dit donor beenmerg uitgroeien en het complete hematopoietische systeem van de ontvanger muis vervangen. Hierdoor ontstaat een chimere muis, waarbij het fenotype van de leukocyten afhankelijk is van het donor beenmerg. In het voorbeeld van figuur 1 ontvangen de muizen een mix van beenmerg van $CD8^{-/-}$ donoren en wildtype of OT-I transgene muizen. Het resultaat van een dergelijk beenmerg transplantatie is dat de ontvangers van de $cd8^{-/-}$:OT-I mix geen cytotoxische T cellen heeft, die specifiek zijn voor antigenen betrokken bij atherosclerose. Door deze dieren na de complete reconstitutie van het beenmerg een Westers type dieet te voeren kunnen we de invloed van deze groep CD8 T cellen op de pathogenese van atherosclerose bestuderen.



Figuur 1: Voorbeeld proefopzet voor het bepalen van de rol van antigeen specifieke T-cellen in atherosclerose. Door het OT-I beenmerg te vervangen met andere soorten beenmerg, kunnen andere type T-cellen worden onderzocht.

De primaire uitkomstparameters van alle hierboven beschreven experimentele aanpakken zijn de effecten van de immuun-modulerende behandeling op:

- atherosclerose: de plaquegrootte wordt exact gekwantificeerd (in μm^2) en de plaque samenstelling wordt bepaald op parameters als aantallen immuuncellen, collageengehalte en oppervlak necrotische kern.
- activatie status van immuuncellen in bloed, organen en lokaal in de plaque (expressie van bepaalde activatiemoleculen door de verschillende celtypen bepaald middels flow cytometrie)
- antistof titers opgewekt door het toegediende vaccin
- cholesterol en triglycerideniveaus in bloed
- cytokine niveau en expressie in bloed en weefsels (lymfeklieren, milt, lever, beenmerg)

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.

Dieren zullen worden gevaccineerd door middel van een intramusculaire, intraperitoneale, intraveneuze of subcutane injectie of door orale toediening via een maagsonde. Verschillende vaccins zullen worden getest, zoals geïsoleerde of gesynthetiseerde eiwitten/peptide geformuleerd in nanodeeltjes of verzwakte bacteriën/virussen. De geïnjecteerde vaccins zullen maximaal 3x worden toegediend in een tijdsbestek van 6 weken na de eerste toediening, 1 week na elke toediening zal door middel van staartsnede bloed afgenomen worden om het effect van de immunisatie te bepalen. De orale toediening van een vaccin zal 4 keer plaatsvinden om de andere dag in een tijdsbestek van 8 dagen en het effect van deze vaccinatie zal onderzocht worden op 7 en 14 dagen na de laatste orale toediening in het bloed afgenomen door middel van staartsnede.

Om het preventieve effect van de verschillende vaccinaties te meten, zal na afloop van de laatste immunisatie gestart worden met het voeren van WTD voor een periode van maximaal 16 weken (profylaxis experiment). Als het therapeutisch effect van het vaccin bepaald dient te worden, wordt eerst atherosclerose geïnduceerd door het voeren van een WTD, waarna na 6 weken de eerste immunisatie zal worden toegediend volgens bovenstaande methodes. Voor aanvang van het experiment, voor de eerste immunisatie en 1 week na de immunisatie zal bloed afgenomen worden door middel van staartsnede (max 4x in 8 weken).

Na maximaal 16 weken van WTD zullen de dieren geëuthanaseerd worden door middel van het toediening van een overdosis geschikt anestheticum worden toegepast gevolgd door perfusie.

Bij bepaalde experimenten kan gekozen worden voor een specifieke experimentele aanpak (A, B of C):

A) Collar-operatie:

De muizen gedurende het gehele experiment op een speciaal cholesterol-rijk dieet geplaatst worden (vanaf 2 weken voor de operatie). Onder algehele adequate anesthesie zullen siliconen manchetten (zogenoemde collars) geplaatst worden rond beide halsslagers van de hierboven beschreven muizen proximaal van de bifurcatie; na plaatsing zal de incisie gehecht worden met zijden hecht draad en kunnen de muizen herstellen gedurende minimaal 24 uur waarbij de pijn verlicht zal worden door een subcutane injectie van buprenorphine (0.1 mg/kg).

B) PCSK9-AAV:

De muizen zullen middels 1 intraveneuze injectie 5 tot 10 $\times 10^{11}$ genome copies rAAV8-D377Y-mPCSK9 ontvangen in een volume van 100 microliter. 0 tot 7 dagen na injectie van het PCSK9 virus zullen de muizen op een speciaal cholesterol-rijk dieet geplaatst worden ter bevordering van atherosclerose ontwikkeling.

Muizen zullen afhankelijk per experiment gedurende 4 tot 16 weken op dit speciale cholesterol-rijke dieet blijven staan om verschillende stadia van atherosclerose te bestuderen.

C) Beenmergtransplantatie:

De dieren worden gehuisvest in gesteriliseerde IVC kooien en zullen een week voor aanvang van de beenmerg transplantatie antibiotica (83 mg/l ciprofloxacin, 67 mg/ polymyxine B sulfaat en 6.5 g/l suiker) in hun drinkwater krijgen om de kans of infecties te verkleinen. Het endogene beenmerg van de ontvanger zal worden uitgeschakeld volgens een geëvalueerd protocol. Hiertoe worden muizen 1 dag voor de transplantatie bestraald met 2x4.5 Gy (0.19 Gy/min, 200 kV, 4 mA) röntgenstraling, gebruik makende van een Andrex Smart 225 met een 6 mm aluminium filter. De volgende dag worden de muizen intraveneus geïnjecteerd via de staartvene met minimaal 5×10^6 donorbeenmergcellen in 200 μ l fysiologische zoutoplossing. Deze donor cellen worden geïsoleerd uit de tibia en femur van donoren nadat deze geëuthanaseerd zijn middels cervicale dislocatie. Na de transplantatie zullen de dieren nog 6 weken antibiotica in hun drinkwater krijgen. In het uitzonderlijke geval dat de dieren na transplantatie verzwakt zijn, zullen de dieren gedurende 2 weken na de transplantatie naast het standaardvoer een papje worden aangeboden. Na 8 weken zal bloed afgenomen worden via staartsnede om te bepalen of de transplantatie succesvol is geweest. Vervolgens krijgen de dieren een westers type dieet voeding gedurende 8 tot maximaal 16 weken.

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

Het primaire doel van dit experiment is om het effect van een vaccin op de grootte en samenstelling van de atherosclerotische laesie te bepalen. Daarvoor wordt één of meerdere vaccineerde groepen vergeleken met een ongevaccineerde groep. Uit afgelopen jaren is gebleken dat een groepsgrootte van 15 muizen gebruikt kan worden met betrouwbare statistische resultaten bij vergelijkbare dierproeven.

Statistische parameters:

Onbetrouwbaarheidsdrempel 5%
Onderscheidend vermogen 80%
Coëfficiënt (tweezijdig toetsen) 21
Verificatienorm 10%
Meetbaar effect 35%
Standaard afwijking 25%

Het aantal benodigde dieren (n) per groep volgens de formule $n = 2 \left[\frac{(Z_{\alpha/2} - Z_p)(VC/100)m_1}{(m_1 - 100)} \right] \exp 2$ is: $2 \left[\frac{(1.96 - (-0.855))(25/100)135}{135 - 100} \right] \exp 2 = 2 \left[\frac{(2.815 \times 0.25 \times 135)}{35} \right] \exp 2 = 14.7$. Dit betekent 15 muizen per groep.

B. De dieren

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

Muizen op een C57Bl6 achtergrond zijn verkregen via Jackson Laboratories of via samenwerking. Dit betreft LDLr-/-, LDLr-/-/hApoB100tg en apoE-/- muizen, en daarnaast muizen met een deficiëntie van het gen van interesse op een C57Bl6 of hyperlipidemische achtergrond, met bijbehorende controle muizen.

De voor deze proeven vereiste muizen zullen worden verkregen uit eigen fok in het [REDACTED] te Leiden.

Voor deze experimenten zullen we LDL receptor of ApoE deficiënte dieren gebruiken die op een Westers type dieet (0.25% cholesterol) atherosclerose ontwikkelen. Ook meer gehumaniseerde muizenstammen zullen worden gebruikt die humaan apoB100 tot overexpressie brengen in combinatie met humaan antigeen presenterende moleculen (HLA-DR). Wij zullen voor ons onderzoek zowel mannelijke als vrouwelijke muizen gebruiken.

Per experiment, na overweging van de resultaten van eerdere experimenten, wordt bepaald welke groepen er nodig zullen zijn en hoeveel dieren er nodig zijn. Voor aanvang van de experimenten zullen protocollen geschreven worden, ter beoordeling van de IVD, die groepsgroottes bevatten bepaald op basis van jarenlange ervaring gecombineerd met statistische berekeningen (15 dieren per groep, zie bovenstaande statistiek). We zullen daarbij volwassen dieren gebruiken (8-12 weken oud).

Vaccins zullen in eerste instantie gericht zijn tegen het LDL eiwit apoB100. Er zijn in onze onderzoeksgroep een aantal apoB100 afgeleide peptiden (nonameren, 9 aminozuren in lengte) geïdentificeerd, die via MHC I of MHC II worden gepresenteerd aan T cellen en daarom in een vaccin effectief kunnen zijn om de immuunrespons gedurende atherosclerose te beïnvloeden. Deze peptiden zullen in deze experimenten worden getest. Daarnaast zullen in de komende jaren nieuwe peptiden worden geïdentificeerd van eiwitten die eveneens betrokken zijn bij atherosclerose, zoals heat shock eiwitten, adhesie moleculen, apolipoproteïnen. Afhankelijk van het nagestreefde doel van de vaccinatie kunnen de vaccins op verschillende manieren worden toegediend. Voor het opwekken van antilichamen tegen het antigeen worden toegediend in combinatie met een adjuvant, voor de inductie van een CD8 respons zal gekozen worden voor een live-attenuated bacterie of virus en voor de inductie van tolerantie zal gekozen worden voor een orale toediening van het peptide. De vaccins zullen vaak in verschillende doseringen en/of toedieningsroutes worden getest op hun therapeutische werking. Indien succesvol, zal het desbetreffende vaccin ook profylactisch worden getest.

Wij verwachten dat wij in 5 jaar ongeveer 60 experimenten zullen doen, van gemiddeld 4 groepen (controle en vaccin in 3 concentraties), wat neerkomt op 15 muizen per groep x 4 groepen = 60 muizen per experiment x 30 experimenten = maximaal 1800 muizen.

Bij een beenmergtransplantatie-experiment zal beenmerg worden geïsoleerd uit donormuizen. Uit ervaring weten we dat we per 5 ontvangermuizen 1 donormuis nodig zullen hebben. Dit zal uitkomen op 36 donoren (~3 experimenten met BMT=3 x 60 dieren=180 dieren/5=36).

Dit maakt het totaal 1836 muizen.

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.

Om aan te tonen dat de genoemde vaccins een effect hebben op atherosclerose zijn *in vivo* modellen nog steeds noodzakelijk. Atherosclerose (en met name plaqueruptuur) is het pathologisch resultaat van een veranderde samenstelling van de vaatwand en een verstoorde communicatie tussen een groot aantal verschillende celtypen. De complexiteit van onderliggende mechanismen (ontsteking in de plaque en in de lymfoïde organen, apoptose, matrixremodelling), het onderlinge samenspel van de verschillende celtypen aanwezig in een atherosclerotische plaque en de bijdrage van componenten in de bloedsomloop aan de pathofysiologie impliceren dat *in vitro* studies (en met name single cell systemen), en daarmee vervanging van proefdieren, slechts op zeer beperkte schaal mogelijk zijn.

Vervanging: De werkzaamheid van de vaccin formulering kan *in vitro* getest worden door het antigen te vervangen met het model antigen Ovalbumine. Met behulp van dendritisch cellijnen en T cel lijnen kunnen wij *in vitro* testen of de ontworpen vaccin formulering de gewenste T cel reactie kan opwekken. We zullen de nonameren die de basis vormen voor de atherosclerose vaccins *in vitro* testen op cellijnen op hun capaciteit om T cellen te activeren na presentatie via dendritische cellen. Wanneer dit het geval is zal het atherosclerose antigeen in deze vaccinformulering geplaatst worden en *in vivo* getest worden. Atherosclerose is echter een complexe ziekte die tot stand komt door een combinatie van voeding, cholesterol homeostase in de lever en cholesterol afvoer via de gal, ontstekingsreacties in lymfoïde organen en de migratie van immuuncellen vanuit beenmerg en lymfoïde organen naar de plaques in de slagader. Effecten van door ons te onderzoeken stoffen die dit complexe proces beïnvloeden zijn daarom niet volledig te testen in uitsluitend *in vitro* modellen. Het blijft daarom noodzakelijk om het effect van experimentele geneesmiddelen op het complexe proces van atherosclerose te onderzoeken via *in vivo* experimenten.

Vermindering: De groepsgrootte kan worden verkleind door na elke immunisatie de T cel reactie in het bloed in plaats van de milt van de dieren te meten. Hierdoor kan een kinetisch profiel per muis worden vastgesteld zonder dat er extra muizen moeten worden gevaccineerd waarvan de milt moet worden geanalyseerd. Door zoveel mogelijk vaccins in 1 experiment te testen kan het aantal controle (onbehandelde groepen) beperkt worden. Tevens zullen we door de vaccins *in vitro* te screenen het aantal experimenten beperken, terwijl de vaccinaties alleen ontworpen zullen worden met vaccins die relevant zijn voor de humane situatie.

Verfijning: Ervaring onderzoekers zullen de de bloedafnames en vaccin injecties uitvoeren. Het experimentele protocol is zodanig geoptimaliseerd, dat er met een minimaal aantal dieren volstaan kan worden: uit de ervaring van de divisie ██████████ op het gebied van hart- en vaatziekten is gebleken dat er een bepaald aantal dieren nodig is om in de vaatwand een meetbaar effect van een behandeling significant te kunnen waarnemen.

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 dieren worden minstens tweemaal per week gemonitord door de onderzoeker. Daarnaast worden de muizen dagelijks bekeken door de proefdierversorgers, en eventuele onverwachte problemen worden direct doorgegeven aan de betreffende onderzoeker. Zo kan onverwacht lijden worden vastgesteld en onmiddellijk gestopt. Om angst bij de dieren tot een minimum te beperken zullen muizen niet alleen gehuisvest worden, maar altijd met meerdere muizen in aanwezigheid van kooiverrijking (kartonnen rol, papier en bijthoutje). Teneinde ongerief/pijn te verminderen zal direct na de microchirurgische handelingen gedurende minimaal 24 uur pijnbestrijding worden toegepast middels een subcutane injectie van buprenorphine (100 µL, 0.1 mg/kg, 2 maal met 12 uur interval). Daarnaast zullen muizen die met het PCSK9-AAV behandeld worden gehuisvest worden in de DM-II faciliteit, waarna bij verschonen het afval ter destructie wordt afgevoerd. Dieren die behandeld worden met een levende vaccin-vector worden in de DM-II faciliteit behandeld en gehuisvest teneinde eventuele verspreiding van dit micro-organisme en blootstelling van de onderzoeker tegen te gaan.

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.

n.v.t.

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.

Teneinde het ongerief te verminderen zal direct na een microchirurgische handelingen (collar-operatie) gedurende minimaal 24 uur pijnbestrijding worden toegepast middels een subcutane injectie van buphrenorphine (100 µL, 0.1 mg/kg, 2 maal met 12 uur interval). Mochten er langer kenmerken van pijn waarneembaar zijn wordt deze pijnbestrijding gecontinueerd zolang nodig.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Injectie en orale toediening van de vaccins en bloedafname kunnen tot stress en irritatie rond de injectie-

(~3 experimenten met BMT=3 x 60 dieren=180 dieren).

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.

Om te bepalen of een vaccin de mate van atherosclerose ontwikkeling vermindert en dus gebruikt kan worden als potentiële immunotherapie om hart- en vaatziekten te voorkomen of verminderen, is het essentieel om het hart, de aorta en immuun gerelateerde organen (milt, lymfeknopen) te verkrijgen voor analyse.

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.	10600	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Universiteit Leiden	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		3	Cellulaire therapie ter behandeling van atherosclerose

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 deze dierproeven is om het effect van cellulaire therapie op atherosclerose te onderzoeken. Dit zullen we doen door een adoptieve transfer van bijvoorbeeld stamcellen, dendritische cellen of T cellen uit te voeren en vervolgens vast te stellen hoe dit de immunresponse verandert in atherosclerose gevoelige muizen en vast te stellen wat het effect op atherosclerose is.

Afhankelijk van het aangrijpingspunt zal er gekozen worden voor een experimenteel muismodel voor atherosclerose. Over het algemeen zullen LDL receptor deficiënte (LDLr^{-/-}) muizen, apolipoproteïne E deficiënte (apoE^{-/-}) muizen of LDLr^{-/-} deficiënte muizen die het humane ApoB100 tot overexpressie brengen (LDLr^{-/-}/hapoB100^{tg}) worden gebruikt. De muizen zullen voor een bepaalde tijd (tussen 4 (initiële atherosclerose) en 26 weken (zeer vergevorderde atherosclerose)) op een Westers-type dieet worden geplaatst om het plasma cholesterolniveau te verhogen en spontane atherosclerose in het hart en de aorta te induceren. Tegelijkertijd zal een van de bovengenoemde behandelingen worden toegepast om het effect van de behandeling in verschillende stadia van atherosclerose te meten.

De verschillende celtypen die getest zullen worden zullen of *in vitro* uitgekweekt worden bijvoorbeeld uit (beenmerg) stamcellen (dendritische cellen, macrofagen, MDSCs, mest cellen) of zullen direct na isolatie uit donormuizen (o.a. T cel subtypes zoals regulatoire T cellen en NKT cellen, B cellen, MDSCs, neutrofielen, monocytten) worden toegediend aan de acceptor muizen. We zullen gebruik maken van verschillende knock-out modellen (cytokine deficiënte muizen, muizen deficiënt in bepaalde voor atherosclerose interessante receptoren en andere moleculen) als donoren die al dan niet een vetrijk dieet toegediend hebben gekregen voordat de cellen geïsoleerd zullen worden uit verschillende organen (zoals beenmerg, milt, bloed, peritoneum en lymfeknopen). Ook zullen we cellen isoleren uit donormuizen, die behandeld zijn met bepaalde biologics of small molecules, zoals beschreven in bijlage 1.

In enkele specifieke gevallen (elk maximaal 5% van de experimenten) kan, naast de inductie van atherosclerose door het voeren met een westers type dieet, gekozen worden voor een van de hieronder gespecificeerde experimentele benaderingen (A, B):

A) Teneinde versneld atherosclerotische plaques te ontwikkelen in de halsslagaders, kan gebruik worden gemaakt van het zogeheten collarmodel te gebruiken. Dit model voor versnelde ontwikkeling van atherosclerotische plaques in de halsslagader van hyperlipidemische muizen (LDLr^{-/-}, LDLr^{-/-}/hApoB100^{tg} of apoE^{-/-} muizen) is binnen ons laboratorium ontwikkeld en beschreven door [REDACTED]. De plaques die op deze manier geïnduceerd worden vormen een relevant model voor humane plaques, aangezien de plaques op sterk vergelijkbare wijze zijn opgebouwd. Atherosclerotische plaques zullen versneld gevormd worden, waarbij na 4 weken gekeken wordt naar zogeheten plaque progressie, en na 6 weken naar vergevorderde plaques, afhankelijk van het doel van de proef. Dit model zal worden gebruikt om het therapeutisch effect te bepalen van de cellulaire therapie en met name om het effect van cellulaire therapie op plaque stabiliteit te meten.

B) Muizen met een deficiëntie in immuun-gerelateerde genen zijn voornamelijk beschikbaar op een C57Bl6/wildtype achtergrond. Om atherosclerose te induceren in wildtype muizen (C57Bl6) kan er gebruik gemaakt worden van een adeno-associated virus dat codeert voor PCSK9 (mPCSK9-rAAV). PCSK9 is een enzym dat door binding aan de LDL receptor de afbraak van de LDL receptor in de lever versnelt. Middels een enkele injectie van het rAAV8-D377Y-mPCSK9 (GGO nr. IG-08013), wat codeert voor een gemuteerde vorm van het muis PCSK9 enzym (lever-specifiek), hebben wildtype muizen tot ten minste 80 dagen na injectie een verhoogde expressie van mutant PCSK9 in de lever. Dit resulteert in de downregulatie van de LDL receptor in de lever en dit leidt tot verhoogd plasma cholesterol waardoor wildtype muizen atherosclerose zullen ontwikkelen (Bjørklund et al. Circ Res. 2014;114:1684-1689, 2014). Deze methode wordt gebruikt om het mechanisme van bescherming geïnduceerd door de cellulaire therapie nader te onderzoeken.

De primaire uitkomstparameters van de modellen waarin we cellulaire therapie onderzoeken zijn:

- atherosclerose: de plaquegrootte in het hart, in de aorta en in de halsslagaders (in geval van collar plaatsing) wordt exact gekwantificeerd (in μm^2) en de plaque samenstelling wordt bepaald op parameters als aantallen en typen immuuncellen, collageengehalte en oppervlak van de necrotische kern.
- activatie status van immuuncellen in bloed, organen en lokaal in de plaque (expressie van bepaalde activatiemoleculen door de verschillende celtypen bepaald middels flow cytometrie)
- cholesterol en triglycerideniveaus in bloed
- cytokine niveau en expressie in bloed en 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.

Voor de cellulaire therapie is de eerste stap het isoleren en opwerken van de donorcellen uit donormuizen:

- De muizen zullen worden geëthanaseerd door middel van cervicale dislocatie waarna het orgaan van interesse zal worden verwijderd. Cellen zullen dan op verschillende wijzen worden geïsoleerd uit de donororganen (beenmerg, milt, lymfeklieren) en/of *in vitro* worden gedifferentieerd in kweek door gebruik van groeihormonen en gemoduleerd alvorens ze worden toegediend aan de acceptormuizen. Cellen kunnen *in vitro* worden vermeerderd en kunnen beladen worden met een antigeen om een specifieke immuunrespons te bewerkstelligen.

Toediening van cellen:

- Intraveneuze injectie, maximaal 200 microliter per injectie, van donorcellen in een steriele zoutoplossing.
- Frequentie van de injecties (eenmalig tot wekelijks) is afhankelijk van het gebruikte celtype en de duur van het experiment.
- Hoeveelheid cellen die geïnjecteerd wordt is afhankelijk van het celtype.
- Muizen zullen afhankelijk van het experiment gedurende 4 tot 26 weken het vetrijke (hoog cholesterol) dieet krijgen om zo de verschillende stadia van atherosclerose te bestuderen. Cellen zullen afhankelijk van het celtype worden toegediend voor of na de start van het voeren van het westers type dieet.

Monster neming en analyses:

- Voor de analyse van immunologische (cytokine niveaus, witte bloedcel aantallen en status) en atherosclerotische parameters (lipiden niveaus) zal bloed afgenomen worden via de staartvene (elke 2 tot 4 weken, maximaal 100 microliter per bloedafname tot een maximum van 200 microliter per maand)

- Voor het volgen van de geïnjecteerde cellen in de acceptormuizen zullen in losse experimenten fluorescent gelabelde cellen gebruikt worden. Imaging zal plaats vinden onder de IVIS onder isofluoraan anesthesie. Een analyse onder de IVIS duurt maximaal 15 minuten, en de muizen zullen maximaal drie keer per week geanalyseerd worden.

Aan het einde van het experiment zullen voorafgaand aan het perfunderen van de weefsels de dieren een geschikte anesthesie toegediend krijgen, die voorkomt dat het dier ongemak zal ondervinden gedurende de perfusie met PBS. Na perfusie worden de weefsels van interesse en plasma/serum voor ex vivo/in vitro analyse naar het laboratorium gebracht voor verdere analyse.

Bij bepaalde experimenten zal naast het gebruik van westers type dieet om atherosclerose te induceren, gekozen worden voor een specifieke experimentele aanpak (A of B):

A) Collar-operatie:

- De muizen worden gedurende het gehele experiment op een speciaal cholesterol-rijk dieet geplaatst worden (vanaf 2 weken voor de operatie). Onder algehele adequate anesthesie zullen siliconen manchetten (zogenoeten collars) geplaatst worden rond beide halsslagaders van de hierboven beschreven muizen proximaal van de bifurcatie; na plaatsing zal de incisie gehecht worden met zijden hechtdraad en kunnen de muizen herstellen gedurende minimaal 24 uur waarbij de pijn verlicht zal worden door een subcutane injectie van buprenorphine (0.1 mg/kg). Deze aanpak zal worden gecombineerd met een cellulair therapie.

B) PCSK9-AAV:

De muizen zullen middels 1 intraveneuze injectie 5 tot 10×10^{11} genome copies rAAV8-D377Y-mPCSK9 ontvangen in een volume van 100 microliter. 0 tot 7 dagen na injectie van het PCSK9 virus zullen de muizen op een speciaal cholesterol-rijk dieet geplaatst worden ter bevordering van atherosclerose ontwikkeling. Muizen zullen afhankelijk per experiment gedurende 4 tot 26 weken op dit speciale cholesterol-rijke dieet blijven staan om verschillende stadia van atherosclerose te bestuderen.

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

In alle studies die wij zullen uitvoeren is de mate van atherosclerose (plaquegrootte) de belangrijkste uitleesparameter en dit blijkt ook de parameter met de grootste standaard afwijking (25%). Onderstaande parameters zijn gebaseerd op eigen jarenlang onderzoek en geven aan dat een groepsgrootte van 15 muizen gebruikt kan worden om betrouwbare statistische resultaten te verkrijgen.

Statistische parameters:

Onbetrouwbaarheidsdrempel 5%
 Onderscheidend vermogen 80%
 Coëfficiënt (tweezijdig toetsen) 21
 Verificatienorm 10%
 Meetbaar effect 35%
 Standaard afwijking 25%

Het aantal benodigde dieren (n) per groep volgens de formule $n = 2 \left[\frac{(Z_{\alpha/2} - Z_p)(VC/100)m_1}{(m_1 - 100)} \right]^2$ is: $2 \left[\frac{(1.96 - (-0.855))(25/100)135}{135 - 100} \right]^2 = 2 \left[\frac{(2.815 \times 0.25 \times 135)}{35} \right]^2 = 14.7$. Dit betekent 15 muizen per groep.

Experimenten bestaan doorgaans uit drie behandelde groepen, maar dit kan afhankelijk van de opzet van de individuele experimenten veranderen:

- Controle muizen die behandeld zullen worden met een zoutoplossing (0.9% NaCl of PBS)
- Muizen die behandeld worden met controle cellen (onbehandelde cellen, niet immuun-deficiënte cellen)
- Muizen die behandeld worden met de cellen van interesse.

Hierdoor omvat een gemiddeld cel-therapie experiment 45 acceptor muizen. Afhankelijk van het celtype dat uit de donoren wordt geïsoleerd varieert het aantal donormuizen. Dit wordt gebaseerd op eerdere experimenten en de bestaande literatuur. Indien mogelijk worden experimenten gecombineerd om het aantal controle groepen te reduceren.

B. De dieren

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

Muizen op een C57Bl6 achtergrond zijn verkregen via Jackson Laboratories of via samenwerking. Dit betreft LDLr-/-, LDLr-/-/hApoB100tg en apoE-/- muizen, en daarnaast muizen met een deficiëntie van het gen van interesse op een C57Bl6 of hyperlipidemische achtergrond, met bijbehorende controle muizen.

De voor deze proeven vereiste muizen zullen worden verkregen uit eigen fok in het [REDACTED] te Leiden.

Voor deze experimenten zullen we LDL receptor of ApoE deficiënte dieren als acceptormuizen gebruiken die op een Westers type dieet (0.25% cholesterol) atherosclerose ontwikkelen. Ook meer gehumaniseerde muizenstammen zullen worden gebruikt die humaan apoB100 tot overexpressie brengen in combinatie met humaan antigen presenterende moleculen (HLA-DR). Wij zullen voor ons onderzoek zowel mannelijke als vrouwelijke muizen gebruiken.

Per experiment, na overweging van de resultaten van eerdere experimenten, wordt bepaald welke groepen er nodig zullen zijn en hoeveel dieren er nodig zijn. Voor aanvang van de experimenten zullen protocollen geschreven worden, ter beoordeling van de IVD, die groepsgroottes bevatten bepaald op basis van jarenlange ervaring gecombineerd met statistische berekeningen (15 dieren per groep, zie bovenstaande statistiek). We zullen daarbij volwassen dieren gebruiken (8-12 weken oud).

Als donormuizen zullen we dezelfde soorten gebruiken of zullen we muizen deficiënt in bepaalde voor atherosclerose interessante receptoren en moleculen gebruiken. Deze muizen zullen ook worden verkregen uit de eigen fok of zijn afkomstig via samenwerkingsverbanden.

De te onderzoeken celtypen zijn: regulatoire T cellen, dendritische cellen, mesenchymale stamcellen, mestcellen, innate lymfoïede cellen, CD8 T cellen, myeloid-derived suppressor cells en regulatoire B cellen. Van een aantal van deze cellen hebben wij gerapporteerd dat ze beschermend kunnen werken tegen atherosclerose en op basis van deze primaire gegevens willen we de experimentele therapie verder optimaliseren (Cardiovasc Res. 2016 Aug 1;111(3):252-61; Sci Rep. 2015 Oct 22;5:15559; Cardiovasc Res. 2010 Feb 1;85(3):622-30). Daarnaast zullen ook tot op heden onbekende cellulaire subsets in het immuunsysteem onderzocht worden. De immunologie is een zeer dynamisch onderzoeksveld, waarin in de komende 5 jaar een naar verwachting aanzienlijk aantal nieuwe regulerende immuuncel subsets ontdekt zal worden. Wij verwachten daarom dat wij in 5 jaar ongeveer 40 experimenten zullen doen, van gemiddeld 3 groepen, wat neerkomt op 15 muizen per groep x 3 groepen = 45 muizen per experiment x 40 experimenten = maximaal 1800 muizen. Daarnaast zullen we naar verwachting 200 donormuizen gebruiken om cellen uit te isoleren. Dit komt op een totaal van 2000 muizen.

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.

Om aan te tonen dat de genoemde celtherapie een effect heeft op de verschillende stadia van atherosclerose zijn in vivo modellen nog steeds noodzakelijk. Atherosclerose (en met name plaqueruptuur) is het pathologisch resultaat van een veranderde samenstelling van de vaatwand en een verstoorde communicatie tussen een groot aantal verschillende celtypen. De complexiteit van onderliggende mechanismen (ontsteking in de plaque en in de lymfoïde organen, apoptose, matrixremodelling), het onderlinge samenspel van de verschillende celtypen aanwezig in een atherosclerotische plaque en de bijdrage van componenten in de bloedsomloop aan de pathofysiologie impliceren dat in vitro studies (en met name single cell systemen), en daarmee vervanging van proefdieren, slechts op zeer beperkte schaal

mogelijk zijn.

Vervanging: Wij hebben human plaques beschikbaar waarin we de aanwezigheid van bepaalde immuuncellen kunnen aantonen, en met deze cellen kunnen cel-cel interacties in vitro worden getest. Waar mogelijk zullen ook in vitro experimenten worden gedaan in assays (zoals migratieassay met transwell systemen) gebaseerd op de volgende cellijnen: RAW264.7 cellen (muis macrofaag cellijn), H5V cellen (endotheel cellijn), gladde spiercellen en MC9/G8 cellen (muis mestcellijn). Atherosclerose is echter een complexe ziekte die tot stand komt door een combinatie van voeding, cholesterol homeostase in de lever en cholesterol afvoer via de gal, ontstekingsreacties in lymfoïde organen en de migratie van immuuncellen vanuit beenmerg en lymfoïde organen naar de plaques in de slagader. Effecten van door ons te onderzoeken stoffen die dit complexe proces beïnvloeden zijn daarom niet volledig te testen in uitsluitend *in vitro* modellen. Het blijft daarom noodzakelijk om het effect van experimentele geneesmiddelen op het complexe proces van atherosclerose te onderzoeken via *in vivo* experimenten.

Vermindering: Om atherosclerose-studies in muizen met een deficiëntie in immuun-gerelateerde genen uit te voeren moesten deze muizen tot op heden teruggekruist worden naar een LDL-receptor deficiënte achtergrond wat veel muizen en tijd kost. De rAAV8-D377Y-mPCSK9 vector zoals beschreven zal gebruikt worden om de ontwikkeling van atherosclerose in muizen op een C57Bl6 achtergrond te stimuleren als alternatief voor het terugkruisen op een LDLr deficiënte achtergrond en zo de hoeveelheid muizen nodig voor atherosclerose onderzoek aanzienlijk verminderen. Dit model zal alleen worden toegepast als het om een gen-deficiënte muis gaat, en zal niet worden toegepast voor interventiestudies.

Verfijning: het experimentele protocol is zodanig geoptimaliseerd, dat er met een minimaal aantal dieren volstaan kan worden: uit de ervaring van de divisie ██████████ op het gebied van hart- en vaatziekten is gebleken dat er een bepaald aantal dieren nodig is om in de vaatwand een meetbaar effect van een behandeling significant te kunnen waarnemen. Voor de optimale dosering van de cellulaire therapie zullen in vivo pilots uitgevoerd worden om het experimentele protocol verder te verfijnen.

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.

Om angst bij de dieren tot een minimum te beperken zullen muizen niet alleen gehuisvest worden, maar altijd met meerdere muizen in aanwezigheid van kooiverrijking. Teneinde ongerief/pijn te verminderen zal direct na de microchirurgische handelingen gedurende minimaal 24 uur pijnbestrijding worden toegepast middels een subcutane injectie van buprenorphine (100 µL, 0.1 mg/kg, 2 maal met 12 uur interval). Mochten er langer kenmerken van pijn waarneembaar zijn wordt deze pijnbestrijding gecontinueerd zolang nodig. Daarnaast zullen muizen die met het PCSK9-AAV behandeld worden gehuisvest worden in de DM-II faciliteit, waarna bij verschonen het afval ter destructie wordt afgevoerd.

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.

N.v.t.

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.

Teneinde het ongerief te verminderen zal direct na de microchirurgische handelingen gedurende minimaal 24 uur pijnbestrijding worden toegepast middels een subcutane injectie van buprenorfine (100 µL, 0.1 mg/kg, 2 maal met 12 uur interval).

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Er zijn geen andere vormen van welzijnsaantasting te verwachten door de celtherapie. Bij een eventuele collaroperatie kan de plaatsing van de ligatuur kan incidenteel het syndroom van Horner tot gevolg hebben door beschadiging van de perivasculaire sympathische zenuwen, waarbij partiele ptosis van het ooglid kan ontstaan. Het zicht wordt hierdoor matig belemmerd.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Collar: De plaatsing van het ligatuur kan incidenteel het syndroom van Horner tot gevolg hebben.

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

De muizen worden dagelijks gemonitord door de onderzoeker en de diervverzorgers en wanneer deze symptomen (syndroom van Horner) worden geconstateerd zal het desbetreffende dier worden geëuthanaseerd.

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.

Een dier zal voortijdig worden geëuthanaseerd indien de volgende kwesties zich voordoen om het ongerief voor het betreffende dier te beperken:

- 15% gewichtsverlies in 2 dagen of 20% gewichtsverlies ten opzichte van het begin van het experiment. Het gewicht van de muizen zal daarom om de dag worden gemeten, vooral in de eerste dagen na een collar-operatie.
- Zichtbaar lijden (trillen/apathie/aanvallen door kooigenoten etc.)

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

Uit ervaring uit soortgelijke experimenten is gebleken dat <5% van de dieren deze criteria haalt in een celtherapie-experiment zonder chirurgische handelingen. In geval van het plaatsen van een collar zal maximaal 10% van de dieren een van deze criteria 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.

Het cumulatieve ongerief zal afhankelijk van het experiment maximaal oplopen tot 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.

Om de mate van atherosclerose ontwikkeling te bepalen, en dus ook om te kijken of een bepaalde cellulaire therapie effectief is om een vermindering in atherosclerotische plaque ontwikkeling te verkrijgen, is het essentieel om aan het einde van het experiment het hart, de aorta en immuun gerelateerde organen (milt, lymfeknopen) te verkrijgen.

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

DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: AVD106002017887
2. Titel van het project: Ontwikkeling van therapie tegen atherosclerose door middel van immuunmodulatie.
3. Titel van de NTS: Ontwikkeling van therapie tegen atherosclerose door middel van immuun modulatie.
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
 - wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: DEC Leiden
 - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
 - e-mailadres contactpersoon [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: 16-03-2017
 - aanvraag compleet: 20-03-2017
 - in vergadering besproken: 30-03-2017 & 18-05-2017
 - anderszins behandeld: via emailronde
 - termijnonderbreking(en) van 11-04-2017 t/m 08-05-2017 & 23-05-2017 t/m 29-05-2017
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 08-05-2017 & 29-05-2017
 - advies aan CCD: 06-06-2017
7. De IvD geeft aan dat de aanvrager de aanvraag 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
 - Datum: 11-04-2017
 - Strekking van de gestelde vragen:
De DEC heeft bij de aanvrager aanvullende informatie ingewonnen met betrekking tot de achtergrond, het ontbreken van go/no-go momenten, de gekozen strategie, vermindering en het ongerief.
 - Naar aanleiding van deze vragen is het projectvoorstel inclusief bijlages herschreven.
 - Datum: 23-05-2017
 - Strekking van de gestelde vragen:
De DEC heeft naar aanleiding van de herschreven aanvraag bij de aanvrager aanvullende informatie ingewonnen met betrekking tot het ongerief en de humane eindpunten. Zij heeft tevens gevraagd een tabel met daarin de dieraantallen per

categorie, met specifieke dierkenmerken en het voor deze categorie te verwachten ongerief toe te voegen.

- Naar aanleiding van deze vragen is het projectvoorstel inclusief bijlages en de NTS naar tevredenheid door de aanvrager aangepast.

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

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 over deze projectaanvraag te adviseren. De benodigde expertise op dit wetenschappelijke terrein is aanwezig binnen de DEC.
4. Geen van de DEC leden is betrokken bij het betreffende project.

C. Beoordeling (inhoud)

1. Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. De aanvraag komt overeen met 4B uit de handreiking 'Wat is een project': De verschillende subdoelen zijn niet uitkomstafhankelijk van elkaar maar zijn allemaal noodzakelijk om de hoofddoelstelling te behalen. De immunoreactie die ten grondslag ligt aan atherosclerose heeft vele aspecten en de processen dragen gezamenlijk bij aan de ontwikkeling en progressie van atherosclerose. Binnen de beschreven proefopzet worden drie therapeutische mogelijkheden onderzocht: (1) ingrijpen in de immunorespons ter behandeling van atherosclerose, (2) ontwikkelen van vaccins tegen atherosclerose en (3) ontwikkelen van een cellulaire therapie. Waar nodig zullen deze drie centrale therapievormen worden gecombineerd, omdat suppressie van het immuunsysteem een therapie kan vereisen die de interactie tussen immuuncellen via meerdere signalen beïnvloedt. De voorgestelde experimenten uit dit project zullen parallel aan elkaar worden uitgevoerd en de verzamelde kennis hieruit zal bijdragen aan meer inzicht in de relatie tussen de verschillende aspecten van het immuunsysteem en atherosclerose. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De DEC is er van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.
2. Voor zover de DEC kan beoordelen is er geen sprake van tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van dit project is 3 ledig:
 - a) Het identificeren van specifieke ontstekingsgenen en ontstekingseiwitten in het proces van atherosclerose, die gebruikt kunnen worden als target voor de ontwikkeling van geneesmiddelen.

- b) Therapieën ontwikkelen om plaques te stabiliseren en om plaque regressie te realiseren door de bovenstaande geneesmiddel targets te remmen/stimuleren.
- c) Het ontwikkelen van een therapeutisch vaccin tegen atherosclerose gebaseerd op fundamenteel onderzoek naar de rol van het immuunsysteem in het proces van atherosclerose.

Het uiteindelijke doel is het ontwikkelen van nieuwe immuuntherapieën die de vorming van atherosclerotische plaques tegengaat en mogelijk de bestaande plaques stabiliseren of zelfs verkleinen.

De DEC is van mening dat er een duidelijke relatie is tussen het directe en uiteindelijk doel. De aanvrager heeft helder gemaakt wat de status is van het onderzoeksveld en wat de bijdrage van dit project aan het onderzoeksveld zal zijn. Het behandelen van hart- en vaatziekten met behulp van cholesterol verlagende geneesmiddelen zoals statines is de meest toegepaste behandelingsmethode voor atherosclerose echter statines verminderen het risico op het krijgen van cardiovasculaire complicaties slechts met ongeveer 30%. Dit betekent dat een zeer groot gedeelte van de hart- en vaatziekten patiënten geen baat heeft bij deze therapie en dat er een dringende noodzaak is om nieuwe therapeutische strategieën ontwikkelen. Er is hiervoor meer kennis nodig op het gebied van specifieke immunologische aangrijpingspunten en over mogelijke combinatietherapieën. De DEC is van mening dat het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld.

- 5. De belangrijkste belanghebbenden in dit project dat gericht is op het ontwikkelen van een immuuntherapie voor de behandeling van atherosclerose zijn de proefdieren, de onderzoekers, de patiënt en de maatschappij.
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 pijn ondergaan.
Waarden die voor de onderzoekers bevorderd worden: De wetenschappers zullen kennis verkrijgen. Ook zullen de carrière mogelijkheden van de wetenschappers verbeteren door publicaties.
Waarden die voor de patiënten bevorderd worden: Meer kennis over de initiatie, progressie en regressie van atherosclerose kan leiden tot preventieve of nieuwe behandelingsmethoden voor atherosclerose.
Waarden die voor de maatschappij bevorderd worden: nieuwe therapieën kunnen leiden tot een aanzienlijke reductie van de hoge kosten in de gezondheidszorg door medicijngebruik en operatief ingrijpen, maar ook door ziekteverzuim en arbeidsongeschiktheid.
- 6. Dieren die behandeld worden met een levende vaccin-vector worden in de DM-II faciliteit behandeld en gehuisvest teneinde eventuele verspreiding van dit micro-organisme en blootstelling van de onderzoeker tegen te gaan. Tevens worden de muizen die met het PCSK9-AAV behandeld worden gehuisvest in de DM-II faciliteit, waarna bij het verschonen het afval ter destructie wordt afgevoerd zodat het niet in het milieu terecht komt. Voor zover de DEC kan beoordelen is er geen sprake van substantiële milieueffecten.

Proefopzet en haalbaarheid

- 7. Naar de overtuiging van de DEC beschikt de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen om de projectdoelstelling met de gekozen strategie binnen de gevraagde termijn te realiseren. Het project bouwt verder op langlopend onderzoek dat wordt uitgevoerd door de onderzoeksgroep met een internationaal erkende expertise. De onderzoeksgroep heeft veel expertise op het gebied van dierexperimenteel onderzoek met betrekking tot immuuntherapie voor atherosclerose. In de afgelopen jaren zijn volgens vergelijkbare strategieën en aanpak belangrijke wetenschappelijke resultaten behaald resulterend in een groot

aantal publicaties in internationaal gerenommeerde wetenschappelijke tijdschriften. Daarnaast zijn er belangrijke subsidies voor dit onderzoek binnen gehaald.

8. 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 binnen de looptijd van het project.

Welzijn dieren

9. Alle dieren worden gefokt bij een geregistreerd fokbedrijf voor het gebruik in dierproeven, er is geen sprake van afwijkende huisvesting en/of hergebruik. Er is geen sprake van bedreigde diersoorten, niet-menselijke primaten, zwefdieren en/of dieren uit het wild. De toegepaste methoden voor anesthesie, analgesie en euthanasie zijn conform de Richtlijn.
10. De DEC is ervan overtuigd dat de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de richtlijn. Het proefdiercentrum van het LUMC beschikt over uitstekende faciliteiten en uitsluitend bevoegd en competent personeel zal zorg dragen voor de verzorging van de dieren en de uitvoering van de dierproeven.
11. 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. Naar inziens van de DEC ondervindt het merendeel van de muizen mild ongerief als gevolg van de injecties. Indien de muizen in combinatie met de injecties electroporatie, een collaroperatie of een beenmergtransplantatie ondergaan schat de DEC dat het cumulatief ongerief maximaal matig zal zijn. De muizen die gebruikt worden voor de cel isolatie worden zonder voorafgaande handelingen gedood. Deze inschatting is in overeenstemming met het niveau van het ongerief ingeschat door de onderzoekers.
12. De integriteit van dieren wordt fysiek aangetast doordat de dieren genetisch gemodificeerd zijn. Tevens zal er bij de meeste muizen atherosclerose geïnduceerd worden. De integriteit zal ook gedragsmatig worden aangetast. Gedurende het project worden de dieren namelijk beperkt in hun bewegingsvrijheid. Hierdoor zullen de dieren minder natuurlijk gedrag kunnen vertonen.
13. Naar mening van de DEC zijn de humane eindpunten zorgvuldig beschreven en is de inschatting van de incidentie met betrekking tot het bereiken van een humaan eindpunt eveneens zorgvuldig beschreven in de projectaanvraag.

3V's

14. In het project wordt de keuze voor de diermodellen duidelijk onderbouwd. De betrokken dieren en het gekozen diermodel zijn het meest geschikt voor deze studieopzet. Het muismodel dat door een deficiëntie in specifieke genen gevoelig is voor atherosclerose vormt al jaren een zeer goed en gevalideerd diermodel voor atherosclerose. Plaque locatie en opbouw zijn sterk vergelijkbaar met de humane situatie. Van vele genen die geïdentificeerd zijn in humane genetische atherosclerose studies is de rol in de muis vergelijkbaar, wat de kracht van het muismodel onderschrijft. De desbetreffende dierproef berokkent de dieren het minste pijn, lijden, angst of blijvende schade. Atherosclerose is het pathologisch resultaat van een

veranderde samenstelling van de vaatwand en een verstoorde communicatie tussen een groot aantal verschillende celtypen. Door de complexiteit van onderliggende mechanismen, het onderlinge samenspel van de verschillende celtypen aanwezig in een atherosclerotische plaque en de bijdrage van componenten in de bloedsomloop aan de pathofysiologie zijn *in vivo* modellen noodzakelijk. De DEC is ervan overtuigd dat er geen alternatieven beschikbaar zijn voor het voorgestelde gebruik van intacte dieren om de doelstelling van dit project te realiseren.

15. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereisten van vermindering van dierproeven. Alvorens experimenten met proefdieren worden ingezet zal in eerste instantie de werking van de immuun-modulerende stoffen, vaccins en desbetreffende cellen in *in vitro* systemen worden bevestigd en waar nodig geoptimaliseerd. Uitsluitend die therapeutica die in staat zijn om *in vitro* hun beoogde effect te bewerkstelligen, zullen gebruikt worden in atherosclerose experimenten. Naar inziens van de DEC zijn er geen echte go/no-go momenten, zij heeft er echter alle vertrouwen in dat er een goede afstemming zal plaatsvinden met de IvD, waardoor er geen onnodig onderzoek zal worden uitgevoerd. De DEC is ervan overtuigd dat het onderzoek ethisch verantwoord zal worden uitgevoerd. De DEC acht het maximale aantal te gebruiken dieren realistisch geschat.
16. De uitvoering van het project is in overeenstemming met de vereisten van verfijning van dierproeven en is zo opgezet dat de dierproeven met zo min mogelijk ongerief worden uitgevoerd. Bij de opzet van dit onderzoek wordt rekening gehouden met dierenwelzijn door het gebruik van adequate anesthesie en analgesie waar nodig. De DEC is ervan overtuigd dat de beschreven dierproeven zo humaan mogelijk zullen worden uitgevoerd.
17. Het betreft hier geen wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Voor de experimenten wordt gebruik gemaakt van zowel mannelijke als vrouwelijke muizen.
19. Om te bepalen of behandeling met immuun-modulerende stoffen de mate van atherosclerose ontwikkeling vermindert en dus gebruikt kan worden als potentiële immunotherapie om hart- en vaatziekten te voorkomen of verminderen, is het essentieel om het hart, de aorta en immuun gerelateerde organen te verkrijgen voor analyse. Het doden van de dieren gebeurt volgens een voor de diersoort passende dodingsmethode die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU.
20. Er worden voor dit projectvoorstel geen niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren gebruikt.

NTS

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

D. Ethische afweging

1. Rechtvaardigt (a) het identificeren van specifieke ontstekingsgenen en ontstekingseiwitten in het proces van atherosclerose, die gebruikt kunnen worden als target voor de ontwikkeling van geneesmiddelen, (b) het ontwikkelen van therapieën

om plaques te stabiliseren en om plaque regressie te realiseren door de bovenstaande geneesmiddel targets te remmen/stimuleren en (c) het ontwikkelen van een therapeutisch vaccin tegen atherosclerose gebaseerd op fundamenteel onderzoek naar de rol van het immuunsysteem in het proces van atherosclerose met als uiteindelijke doel het ontwikkelen van nieuwe immunotherapieën die de vorming van atherosclerotische plaques tegengaat en mogelijk de bestaande plaques stabiliseren of zelfs verkleinen het ongerief dat de dieren wordt aangedaan?

2. Project gericht op het ontwikkelen van een immunotherapie voor de behandeling van atherosclerose.

Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: matig nadeel.

Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: gering voordeel.

Waarden die voor de patiënten (incl. de maatschappij) bevorderd worden: groot voordeel.

De DEC is van mening dat de belangen van de samenleving in het algemeen en de patiënten in het bijzonder in dit project zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de proefdieren.

Hart- en vaatziekten zijn één van de belangrijkste doodsoorzaken in de Westerse wereld en Nederland alleen al telt ruim 1 miljoen hart- en vaatpatiënten. Het proces van vernauwing van de slagaders, aderverkalking of atherosclerose, is de belangrijkste oorzaak voor het ontstaan van deze hart- en vaatziekten. In de loop der jaren is door een verbeterde behandeling van de acute gevolgen van hart- en vaatziekten het aantal acute sterfgevallen ten gevolge van hart- en vaatziekten sterk gedaald. Toch ondervinden nog steeds veel mensen grote nadelige gevolgen van hart- en vaatziekten, zoals pijn op de borst, problemen met het lopen en tijdelijk verminderde doorbloeding van de hersenen. Conventionele behandeling heeft echter een beperkt klinisch effect en kan het risico op cardiovasculaire complicaties met slechts 30% verminderen. Daarnaast wordt het succes van preventieve verwijdering van de plaque of van het aangedane bloedvatsegment in de praktijk verkleind door de geringe voorspelbaarheid. De DEC acht het ontrafelen van de mechanismen die ten grondslag liggen aan de ontwikkeling van atherosclerose, en met name aan de rol van het immuunsysteem in dit proces van essentieel belang voor de ontwikkeling van nieuwe (preventieve) behandelingsmethoden voor atherosclerose. Het is aannemelijk dat de doelstelling behaald zal worden. Hiertoe zullen dieren worden gebruikt. De onderzoekers doen er echter alles aan om het lijden van de dieren te beperken, waardoor het ongerief van de dieren zo veel mogelijk beperkt blijft.

3. De DEC is overtuigd van het belang van de doelstelling van dit project. De DEC is van mening dat de waarden die voor de doelgroep bevorderd kunnen worden zwaarder wegen dan de waarden die voor de proefdieren in het geding zijn. Het project is goed opgezet. De DEC is bovendien 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. De DEC is er verder van overtuigd dat de onderzoeksgroep voldoende ervaring heeft met de gekozen onderzoeksstrategie en met de voorgestelde dierproeven om de doelstelling te behalen en dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om zowel het ongerief van de dieren alsmede het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken. De DEC onderschrijft dat de doelstelling niet zonder het gebruik van proefdieren behaald kunnen worden en acht het gebruik van het aantal dieren en het daarmee samenhangende ongerief bij de dieren 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

Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.

Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist

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

De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

De vaststelling dat het project niet vergunning plichtig is om de volgende redenen:...

De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...

De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

3. Er zijn tijdens de beoordeling van dit projectvoorstel geen echte knelpunten en of duidelijke dilemma's naar voren gekomen.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Leiden



Postbus 9502

2300 RA 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
AVD106002017887

Bijlagen

2

Datum 23 juni 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 23 juni 2017. Het gaat om uw project "Ontwikkeling van therapie tegen atherosclerose door middel van immuun modulatie". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD106002017887. 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 juni 2017

Aanvraagnummer:

AVD106002017887

Datum:
23 juni 2017
Aanvraagnummer:
AVD106002017887

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10600
Naam instelling of organisatie: Universiteit Leiden
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: 
KvK-nummer: 27 36 89 29
Straat en huisnummer: Rapenburg 70
Postbus: 9502
Postcode en plaats: 2300 RA LEIDEN
IBAN: NL78RAB00102468869
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: Universiteit Leiden 

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam:
Functie:
Afdeling:
Telefoonnummer:
E-mailadres:



Datum:
23 juni 2017
Aanvraagnummer:
AVD106002017887

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam:
Functie:
Afdeling:
Telefoonnummer:
E-mailadres:



Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u?

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

Over uw project

Geplande startdatum:
Geplande einddatum:
Titel project:

1 september 2017
31 augustus 2022
Ontwikkeling van therapie tegen atherosclerose door middel van immuun modulatie

Titel niet-technische samenvatting:

Ontwikkeling van therapie tegen atherosclerose door middel van immuun modulatie

Naam DEC:

DEC Leiden

Postadres DEC:

 LUMC, Postbus 9600, 2300 RC Leiden

E-mailadres DEC:



Betaalgegevens

De leges bedragen:
De leges voldoet u:

€ 1.541,-
na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen


Verplichte bijlagen:

- Projectvoorstel
- Beschrijving Dierproeven
- Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen:

DEC-advies

Ondertekening

Naam: 
Functie: Gemandateerd vergunninghouder
Plaats: Leiden
Datum: 8 juni 2017

Datum:
23 juni 2017
Aanvraagnummer:
AVD106002017887



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Leiden

Postbus 9502

2300 RA 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
AVD106002017887

Bijlagen

2

Datum 23 juni 2017

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 23 juni 2017

Vervaldatum: 23 juli 2017

Factuurnummer: 170887

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD106002017887	€ 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

Universiteit Leiden

Postbus 9502

2300 RA 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
AVD106002017887

Datum 4 juli 2017

Betreft aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 23 juni 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Ontwikkeling van therapie tegen atherosclerose door middel van immuun modulatie" met aanvraagnummer AVD106002017887. 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

Kunt u een nieuwe NTS sturen, waarin u 'collar operatie' uitlegt of vervangt door andere woorden? Kunt u daarnaast 3.2 en 4.1 aanpassen zodat dit minder technisch wordt en begrijpelijk voor een leek?

Is voor Bijlage Dierproeven 3.4.4.1 en 3.4.4.2 het aantal donordieren meegenomen in de aantallen? Zo niet, kunt u dit aanpassen in nieuwe Bijlagen Dierproeven?

Kunt u voor alle Bijlagen aangeven welke geslachten u wilt gebruiken en indien dit één geslacht betreft wetenschappelijk onderbouwen waarom? Als onvoldoende (wetenschappelijk) is onderbouwd waarom het gebruik van één geslacht nodig is, kan de CCD een voorwaarde opleggen dat beide geslachten in gelijke mate gebruikt moeten worden.

Voor alle Bijlagen Dierproeven geeft u aan dat u diverse vervangingsmogelijkheden heeft. Kunt u in een nieuwe Bijlage Dierproeven

aangeven waarom deze in vitro methodes niet mogelijk zijn en in vivo onderzoek noodzakelijk is?

Datum:
4 juli 2017
Aanvraagnummer:
AVD106002017887

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

[REDACTED]

Van: [REDACTED]
Verzonden: dinsdag 11 juli 2017 12:40
Aan: info@zbo-ccd.nl
Onderwerp: RE: Verzoek aanvullende informatie projectvergunningsaanvraag AVD106002017887

Categorieën: Dossier: [REDACTED]

Beste [REDACTED]

“De onderzoeker heeft in de tabel (05_AV106002017887_tabel) aangegeven dat het geslacht “unknown” is. De DEC heeft dit geïnterpreteerd als zijnde dat beide geslachten gebruikt zullen worden. Tevens is het zo dat wanneer in een projectaanvraag niet expliciet is aangegeven dat er uitsluitend mannelijke dan wel vrouwelijke dieren gebruikt worden, de DEC er van uit gaat dat er geen voorkeur is en dat beide geslachten (evenredig) gebruikt zullen worden”.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

From: info@zbo-ccd.nl [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]
Sent: dinsdag 4 juli 2017 13:13
To: [REDACTED]
Subject: Verzoek aanvullende informatie projectvergunningsaanvraag AVD106002017887

Geachte DEC Leiden,





Op 23-06-2017 hebben wij een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het gaat om het project 'Ontwikkeling van therapie tegen atherosclerose door middel van immuun modulatie' met aanvraagnummer AVD106002017887.

In uw advies geeft u onder C18 aan dat beide geslachten gebruikt zullen worden. Echter, deze informatie staat niet in de Bijlagen Dierproeven beschreven. Hoe bent u tot de conclusie gekomen dat beide geslachten gebruikt zullen worden?

Daarnaast wil ik u aangeven dat de aanvrager de volgende vragen zijn gesteld. Mocht u hierop willen reageren, wilt u dit dan binnen 14 dagen doen?

Kunt u een nieuwe NTS sturen, waarin u 'collar operatie' uitlegt of vervangt door andere woorden? Kunt u daarnaast 3.2 en 4.1 aanpassen zodat dit minder technisch wordt en begrijpelijk voor een leek?

Is voor Bijlage Dierproeven 3.4.4.1 en 3.4.4.2 het aantal donordieren meegenomen in de aantallen? Zo niet, kunt u dit aanpassen in nieuwe Bijlagen Dierproeven? Kunt u voor alle Bijlagen aangeven welke geslachten

u wilt gebruiken en indien dit   n geslacht betreft wetenschappelijk onderbouwen waarom? Als onvoldoende (wetenschappelijk) is onderbouwd waarom het gebruik van   n geslacht nodig is, kan de CCD een voorwaarde opleggen dat beide geslachten in gelijke mate gebruikt moeten worden.

Voor alle Bijlagen Dierproeven geeft u aan dat u diverse vervangingsmogelijkheden heeft. Kunt u in een nieuwe Bijlage Dierproeven aangeven waarom deze in vitro methodes niet mogelijk zijn en in vivo onderzoek noodzakelijk is?

Mocht u vragen hebben, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,


Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl

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

.....
T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl



E-mail: [REDACTED]

[REDACTED], the Netherlands

Aan: CCD
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag

Telephone: [REDACTED]

Reference: JK

Leiden, 6-7-2017

Geachte leden van de CCD,

Hartelijk dank voor het in behandeling nemen van onze aanvraag. Middels deze brief willen wij graag de onduidelijkheden verhelderen. In onderstaande reactie hebben we de individuele punten verder uitgelegd, en we hebben betreffende zaken aangepast in de herziene CCD aanvraag.

Onduidelijkheden

1) Kunt u een nieuwe NTS sturen, waarin u 'collar operatie' uitlegt of vervangt door andere woorden? Kunt u daarnaast 3.2 en 4.1 aanpassen zodat dit minder technisch wordt en begrijpelijk voor een leek?

We hebben de NTS aangepast door de tekst in 3.2. en 4.1 minder technisch te formuleren. Ook hebben wij "collar operatie" vervangen door "het plaatsen van een siliconen bandje rond de halsslagader om atherosclerose te induceren".

2) Is voor Bijlage Dierproeven 3.4.4.1 en 3.4.4.2 het aantal donordieren meegenomen in de aantallen? Zo niet, kunt u dit aanpassen in nieuwe Bijlagen Dierproeven?

Inderdaad waren de donoren nodig voor het uitvoeren van de beenmergtransplantatie-experimenten niet meegenomen in de berekening van het aantal dieren. Er zullen in totaal 78 donor muizen nodig zijn (42 muizen in bijlage 3.4.4.1 en 36 muizen in bijlage 3.4.4.2; deze dieren zullen gedood worden zonder interventie). We hebben dit in de betreffende bijlagen aangepast, waardoor het totaal aantal dieren in deze aanvraag op 5978 komt. Dit is ook aangepast in de NTS en in de bijgevoegde tabel.

3) Kunt u voor alle Bijlagen aangeven welke geslachten u wilt gebruiken en indien dit één geslacht betreft wetenschappelijk onderbouwen waarom? Als onvoldoende (wetenschappelijk) is onderbouwd waarom het gebruik van één geslacht nodig is, kan de CCD een voorwaarde opleggen dat beide geslachten in gelijke mate gebruikt moeten worden.

Atherosclerose is een proces dat in zowel mannen als vrouwen voorkomt, en ook in muizen ontwikkelen zowel mannen als vrouwen atherosclerose. Uit eerdere studies weten we ook dat we onze experimenten in zowel mannen als vrouwen kunnen uitvoeren. Wij zullen daarom voor dit project zowel mannen als vrouwen gebruiken, en we zullen per experiment bepalen welk geslacht we zullen gebruiken. Beschikbaarheid van dieren uit speelt hierbij een rol om zo min mogelijk surplus

dieren te hebben. We hebben de volgende zin toegevoegd aan alle bijlagen van ons project: "Wij zullen voor ons onderzoek zowel mannelijke als vrouwelijke muizen gebruiken." (in B: de dieren).

4) Voor alle Bijlagen Dierproeven geeft u aan dat u diverse vervangingsmogelijkheden heeft. Kunt u in een nieuwe Bijlage Dierproeven aangeven waarom deze in vitro methodes niet mogelijk zijn en in vivo onderzoek noodzakelijk is?

We hebben in de drie bijlagen bij het deel "vervanging" de volgende tekst toegevoegd:

"Atherosclerose is echter een complexe ziekte die tot stand komt door een combinatie van voeding, lipiden synthese in de lever, ontstekingsreacties in lymfoïde organen en de migratie van immuuncellen naar de plaque in de slagader. Effecten van stoffen die dit complexe proces beïnvloeden zijn daarom niet afdoende te onderzoeken in *in vitro* modellen en dus blijft in vivo onderzoek noodzakelijk."

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.

Wij hebben de verschuldigde leges betaald op 28-6-2017 van rekening [REDACTED] op naam van ondergetekende.

Hoogachtend,

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Leiden



Postbus 9502

2300 RA 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

AVD106002017887

Datum 14 juli 2017

Betreft Aanvulling aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 

Op 23 juni 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Ontwikkeling van therapie tegen atherosclerose door middel van immuun modulatie" met aanvraagnummer AVD106002017887. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

Wij hebben de volgende informatie van u nodig om uw aanvraag verder te kunnen beoordelen:

Niet technische samenvatting

In de NTS geeft u onder 3.5 aan dat 5% van de dieren 'geen ongerief' zal ondervinden. Deze dieren zullen zonder voorafgaande handeling worden gedood; dit valt onder 'licht ongerief'. Kunt u een nieuwe NTS sturen waarin u het ongerief hebt aangepast?

Kunt u daarnaast een nieuwe tabel sturen waarin de donor-dieren ook zijn meegeteld?

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.

Wanneer een beslissing

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

Datum:

14 juli 2017

Aanvraagnummer:

AVD106002017887

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
namens deze:

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Melding bijlagen
- Niet technische samenvatting



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Leiden

Postbus 9502

2300 RA 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

AVD106002017887

Bijlagen

1

Datum 20 juli 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 23 juni 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Ontwikkeling van therapie tegen atherosclerose door middel van immuun modulatie" met aanvraagnummer AVD106002017887. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 6 en 19 juli 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Dit betrof een nieuwe NTS, het aantal donordieren en het ongerief daarvan, de te gebruiken geslachten en de mogelijkheden tot vervanging.

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 "Ontwikkeling van therapie tegen atherosclerose door middel van immuun modulatie" 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 Leiden gevoegd. Dit advies is opgesteld op 6 juni 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:
20 juli 2017
Aanvraagnummer:
AVD106002017887

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 Leiden

Adres: Postbus 9502

Postcode en plaats: 2300 RA LEIDEN

Deelnemersnummer: 10600

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 september 2017 tot en met 31 augustus 2022, voor het project "Ontwikkeling van therapie tegen atherosclerose door middel van immuun modulatie" met aanvraagnummer AVD106002017887, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Leiden. 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 23 juni 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 23 juni 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 19 juli 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 6 juni 2017, ontvangen op 23 juni 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 6 en 19 juli 2017

Aanvraagnummer:
AVD106002017887

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Effect van immunotherapie op atherosclerose				waarvan 42 donordieren
	Muizen (Mus musculus) /	2.142	20% Matig 80% Licht	
3.4.4.2 Vaccinatie tegen atherosclerose				waarvan 36 donordieren
	Muizen (Mus musculus) /	1.836	23% Matig 77% Licht	
3.4.4.3 Cellulaire therapie ter behandeling van atherosclerose				
	Muizen (Mus musculus) /	2.000	9% Matig 91% 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:

AVD106002017887

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:

AVD106002017887

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 W17-12		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	documenten NTS20171067	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel			x					
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage beschrijving dierproeven			x					
5	DEC-advies				x		x	x	
6	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
7	Verzoek aanvulling aanvraag				x		x	x	
8	Reactie verzoek aanvulling				x		x	x	
9	Advies CCD		x						x
10	Beschikking en vergunning				x		x	x	



11 JULI 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 11600 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen																								
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table border="1"> <tr> <td>Naam instelling of organisatie</td> <td colspan="2">Academisch Ziekenhuis Leiden</td> </tr> <tr> <td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td> <td colspan="2">Leids Universitair Medisch Centrum</td> </tr> <tr> <td>KvK-nummer</td> <td>27366422</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Straat en huisnummer</td> <td>Albinusdreef</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>Postbus</td> <td colspan="2">9600</td> </tr> <tr> <td>Postcode en plaats</td> <td>2300 RC</td> <td>Leiden</td> </tr> <tr> <td>IBAN</td> <td colspan="2">NL11DEUT0451001400</td> </tr> <tr> <td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td> <td colspan="2">LUMC</td> </tr> </table>	Naam instelling of organisatie	Academisch Ziekenhuis Leiden		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	Leids Universitair Medisch Centrum		KvK-nummer	27366422		Straat en huisnummer	Albinusdreef	2	Postbus	9600		Postcode en plaats	2300 RC	Leiden	IBAN	NL11DEUT0451001400		Tenaamstelling van het rekeningnummer	LUMC	
Naam instelling of organisatie	Academisch Ziekenhuis Leiden																									
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	Leids Universitair Medisch Centrum																									
KvK-nummer	27366422																									
Straat en huisnummer	Albinusdreef	2																								
Postbus	9600																									
Postcode en plaats	2300 RC	Leiden																								
IBAN	NL11DEUT0451001400																									
Tenaamstelling van het rekeningnummer	LUMC																									
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	<table border="1"> <tr> <td>Postbus</td> <td colspan="2">9600</td> </tr> <tr> <td>Postcode en plaats</td> <td>2300 RC</td> <td>Leiden</td> </tr> <tr> <td>IBAN</td> <td colspan="2">NL11DEUT0451001400</td> </tr> <tr> <td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td> <td colspan="2">LUMC</td> </tr> </table>	Postbus	9600		Postcode en plaats	2300 RC	Leiden	IBAN	NL11DEUT0451001400		Tenaamstelling van het rekeningnummer	LUMC													
Postbus	9600																									
Postcode en plaats	2300 RC	Leiden																								
IBAN	NL11DEUT0451001400																									
Tenaamstelling van het rekeningnummer	LUMC																									
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1"> <tr> <td>(Titel) Naam en voorletters</td> <td rowspan="5" style="background-color: black;"></td> <td><input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters		<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.	Functie	Afdeling	Telefoonnummer	E-mailadres																	
(Titel) Naam en voorletters		<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.																								
Functie																										
Afdeling																										
Telefoonnummer																										
E-mailadres																										
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1"> <tr> <td>(Titel) Naam en voorletters</td> <td rowspan="5" style="background-color: black;"></td> <td><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters		<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie	Afdeling	Telefoonnummer	E-mailadres																	
(Titel) Naam en voorletters		<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.																								
Functie																										
Afdeling																										
Telefoonnummer																										
E-mailadres																										

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1035,- 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 Gemandateerd vergunninghouder

Plaats Leiden

Datum 30 - 6 - 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. Fundamenteel onderzoek
- U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.*
- 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.

Schistosomiasis (bilharzia) is een veel voorkomende worminfectie in de tropen en sub-tropen. Het aantal

geïnfecteerde mensen bedraagt meer dan 200 miljoen wereldwijd. Infectie treedt op door huidcontact met besmet water. De schistosoom larven zullen de huid penetreren en zich vervolgens gedurende een aantal weken in de bloedbaan verder ontwikkelen tot volwassen wormen. Hoewel volwassen wormen een zekere pathogene werking uitoefenen, zijn het vooral de eieren die de patiënt ernstige schade kunnen berokkenen. Deze schade is het gevolg van een opeenhoping van ontstekingscellen rondom parasieteneieren in organen. Het oorspronkelijke weefsel wordt als gevolg hiervan vernietigd en vervangen door bindweefsel. Uitgebreide bindweefselvorming in de darm, lever, longen en blaaswand belemmert de doorbloeding, met ernstige pathologie tot gevolg. Langdurige infecties met *Schistosoma haematobium*, naast *Schistosoma mansoni* de meest voorkomende soort, verhogen daarnaast het risico op kanker in de aangedane weefsels, met name de blaas.

Het afweersysteem kan de infectie met wormen niet opruimen en pas na een lange tijd kunnen mensen een vorm van resistentie tegen nieuwe worminfecties opbouwen. Dit proces wordt pas in gang gezet wanneer het afweersysteem in aanraking komt met wormen die doodgaan en uit elkaar vallen. Een verklaring hiervoor wordt gevonden in de hypothese dat wormen het afweersysteem om de tuin leiden en zelfs onderdrukken zodat geen effectieve afweerreactie gevormd kan worden. Hierdoor kunnen worm parasieten jarenlang in het menselijk lichaam overleven zonder vernietigd te worden. Het proces van immuniteit en resistentie kan wel enigszins versneld worden door chemotherapie tegen de volwassen wormen (dmv praziquantel). Echter in de endemische gebieden vindt over het algemeen een snelle herinfectie plaats. Pas na vele cycli van infectie, behandeling en herinfectie wordt enige resistentie tegen nieuwe worminfecties opgebouwd. Daarom is het zeer wenselijk om een vaccin te ontwikkelen tegen schistosomen parasieten.

Het misleiden of onderdrukken van het afweersysteem kan ook een gunstige bijwerking hebben: uit epidemiologische studies is gebleken dat mensen die geïnfecteerd zijn met schistosomen minder last hebben van typische ontstekingsziekten, zoals bv. auto-immuniteit, astma, allergien, multiple sclerose, colitis of type 2 diabetes. Het is daarom belangrijk om de moleculaire principes van de gastheer-parasiet interacties en de daarmee samenhangende immunologie in detail te ontraffelen, zodat parasiet moleculen geïdentificeerd kunnen worden, die geschikt zijn om in te zetten als immunotherapie tegen die bovengenoemde ontstekingsziekten.

Binnen het onderzoeksprogramma vinden tevens studies plaats die de relatie tussen levensstijl, infecties en ontstekingsziekten in kaart te brengen. Hiertoe is het belangrijk om verbeterde en nieuwe immunodiagnostische methodes voor *Schistosoma mansoni* en *S. haematobium* infecties te ontwikkelen. Dit doen we door specifieke antigenen van de parasiet te identificeren en de detectie daarvan in urine of plasma - of de detectie van antilichamen ertegen - te testen op gevoeligheid en specificiteit in verschillende settings (bv milde of hevige infecties, in kinderen dan wel volwassenen, en het meten in verschillende typen samples – serum, urine, faeces) in het laboratorium en in het veld.

Dit project omvat het onderhouden van de levenscyclus van *S. mansoni* en *S. haematobium* door middel van infectie van hamsters. Toegang tot de verschillende levensstadia van de twee parasieten maakt het mogelijk om fundamenteel onderzoek te doen naar de moleculaire interacties tussen parasiet (moleculen) en het afweersysteem. Het translationele aspect dat mede daaruit voortvloeit is het gebruik van parasietmoleculen als therapie voor ontstekingsziekten, en het gebruik van schistosoma antigenen in de ontwikkeling van diagnostiek en vaccinaties ter bestrijding van schistosomiasis, en de immunoepidemiologische studies die bovenstaand onderzoek ondersteunen.

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?

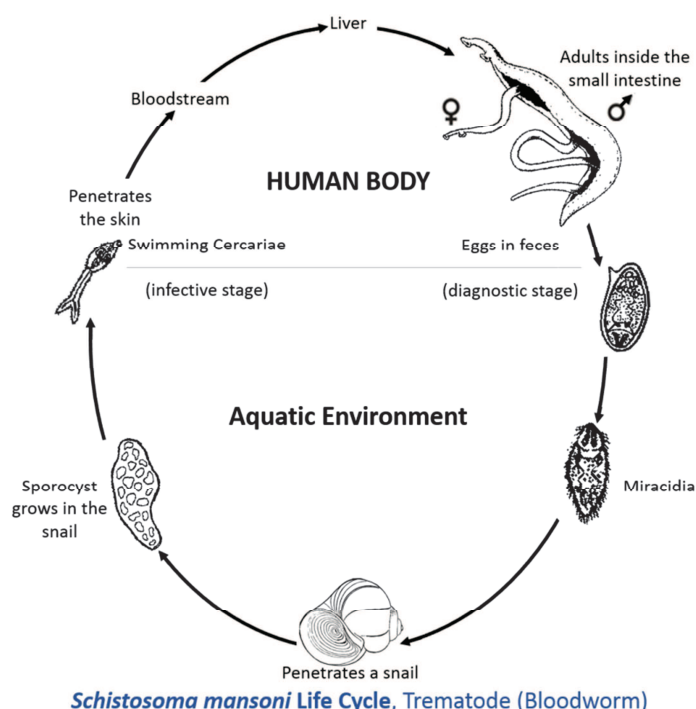
De hierboven beschreven studies in het kader van het onderzoeksprogramma Parasitologie op het LUMC worden geheel of gedeeltelijk mogelijk gemaakt door de beschikbaarheid van preparaten (levende parasieten, extracten, of geselecteerde moleculen) van *S. mansoni* en *S. haematobium*. De doelstelling van dit project is het beschikbaar maken van de parasiet en haar specifieke levensstadia die in de gastheer tot ontwikkeling komen.

De immunodiagnostische assays die gebruikt worden binnen de epidemiologische studies zijn gebaseerd op worm- of ei-moleculen die worden geïsoleerd uit schistosoma geïnfecteerde hamsters. Deze moleculen, in de vorm van ruwe of geavanceerd gezuiverde preparaten, vormen tevens de basis voor experimenten waarin de immunologische aspecten van de relatie tussen gastheer en parasiet worden onderzocht. Inzichten in deze aspecten zijn, zoals onder 3.1 beschreven, van essentieel belang als verklaring voor het opmerkelijke feit dat schistosoma wormen jarenlang in de bloedbaan van hun gastheer te kunnen overleven zonder vernietigd te worden. Om dit te kunnen begrijpen wordt er onderzoek gedaan naar antigeen presentatie, immunosuppressie en isotypische antilichaamreacties. Dit is interessant voor de ontwikkeling van nieuwe therapieën voor ontstekingsziekten en vaccins. Voor de uitvoering van dit onderzoek zijn wij ook afhankelijk van het verkrijgen van voldoende antigeenmateriaal (zie ook punt 3.3. Belang).

De parasiet kan niet in vitro gekweekt worden, en daarom is het noodzakelijk om de levenscyclus in zoogdieren te laten verlopen (zie onderstaande figuur). Hamsters worden met larven van de parasiet (cercariae) geïnfecteerd. Deze larven worden verkregen uit geïnfecteerde slakken (de tussengastheer). Zes tot 7 weken na infectie kunnen dan de volwassen wormen d.m.v. perfusie worden geïsoleerd. Eieren worden uit de lever en de darmen gehaald. Beide levensstadia worden gebruikt om schistosoom-specifieke moleculen te isoleren ten behoeve van het onderzoek.

Het project is erop gericht om de levenscyclus van *S. mansoni* en *S. haematobium*, twee soorten schistosoma, ieder doorlopend te onderhouden om parasiet materiaal beschikbaar te hebben voor het onderzoeksprogramma. De soorten onderscheiden zich wat betreft pathologie, epidemiologie, diagnostiek en de immunologisch actieve moleculen die ze maken.

Tot slot zijn levende eieren, met daarin de miracidia, cruciaal om slakken te infecteren, die weer op hun beurt cercariae - voor mens infectieuze larven - kunnen te produceren. Deze cercariae worden niet alleen gebruikt om hamsters te infecteren, maar deze zijn ook essentieel om om zgn monosexuele infecties te genereren. Deze mono-sexuele infecties (1 enkele larve die zich klonaal repliceert in een slak) worden gebruikt voor het 'controlled human infection' model dat binnen het LUCM is ontwikkeld. Het doel van dit model is in de toekomst het klinische onderzoek naar nieuwe diagnostica, medicijnen en vaccins voor schistosomen infectie in een gecontroleerde en kostenbesparende setting (t.o.v. de endemische gebieden) in mensen mogelijk te maken. De verwachting is dat deze inspanningen op termijn ook het gebruik van proefdieren voor vaccin-onderzoek zullen doen verminderen en minder noodzakelijk maken.



De verschillende doelstellingen hierboven beschreven - waarvoor materiaal van de parasiet noodzakelijk is - worden bekostigd door gelden van onderzoeksprojecten gefinancierd door ZonMW, het Longfonds, het Diabetes fonds en de EU. Het onderzoeksprogramma, wat al deze onderzoekslijnen omvat, neemt een omvangrijke plaats in binnen de afdeling Parasitologie en betreft het onderzoek van meerdere PI's. Gezien de overlappende doelstellingen (diagnostiek, vaccins tegen ontstekingsziekten en tegen de parasiet zelf), is er een hoge mate van samenwerking. De kosten en de personele inspanningen die het instandhouden van de levenscyclus van *S. mansoni* en *S. haematobium* met zich meebrengen, worden dan ook gezamenlijk en afdelingsbreed gedragen. Binnen de lopende derde geldstroomprojecten worden de benodigde gelden gebudgeteerd. Dit is tot op heden voldoende geweest. In het onwaarschijnlijke geval dat dit in de komende 5 jaar niet afdoende blijkt te zijn, dan zal de afdeling Parasitologie garant staan en zal het ontbrekende bedrag vanuit de eerste geldstroom aangevuld worden.

3.3 Belang

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

Dit project heeft tot doel *Schistosoma* parasieten in hamsters te kweken omdat de levenscyclus van deze parasiet *in vitro* niet voltooid kan worden. Verschillende levensstadia worden vervolgens gebruikt om *Schistosoma* moleculen te isoleren en te karakteriseren.

Deze moleculen zijn van essentieel belang voor de diagnostiek van schistosomen infecties, de bijdrage aan het ontwikkelen van een vaccin voor deze mondiaal zeer belangrijke parasitaire infectie waar geen bescherming tegen bestaat, en het onderzoek naar immunoregulerende therapeutica ter bestrijding van ontstekingsziekten. Het specifieke project heeft daarmee een zeer brede wetenschappelijke impact.

Daarnaast moet worden onderstreept dat het project zowel maatschappelijk belang dient in de schistoom-endemische gebieden in de wereld, met name Afrika, als in de ontwikkelde wereld waar ontstekingsziekten sterk in opkomst zijn. De ontwikkeling van een vaccin tegen schistosome infecties dat herinfectie met deze parasiet voorkomt is een effectieve, wellicht de meest effectieve manier om de morbiditeit van de infectie te ondervangen in tientallen miljoenen mensen. Vermindering van de morbiditeit die gepaard met groei en concentratiestoornissen in schoolkinderen zal leiden tot betere prestaties op school, een betere opleiding en daarmee verbetering van de welvaart in endemische gebieden. Mbt volwassen mensen die niet meer geïnfecteerd zullen zijn als gevolg van vaccinatie: zij zullen productiever zijn in de arbeidssfeer omdat hun algehele gezondheid verbeterd is. In het kader van immuunregulerende therapieën voor ontstekingsziekten, deze zullen grotschalig kunnen leiden tot een verbeterde kwaliteit van leven en arbeidsproductiviteit in grote delen van de wereld en specifiek in west-Europa. Een nog steeds groeiende groep van mensen lijdt aan één of meerdere vormen van ontstekingsziekten waarvoor nog geen of geen afdoende therapieën zijn ontwikkeld. Het gegenereerde parasiet materiaal zal onder anderen worden getest in modellen voor type-2 diabetes en allergische asthma, beide aandoeningen waarvoor urgente oplossingen worden gezocht.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

Om de levenscyclus van *S. mansoni* and *S. haematobium* in stand te kunnen houden en tevens voldoende materiaal van de verschillende levensstadia te verkrijgen om de bovengenoemde doelstellingen te kunnen onderzoeken, infecteren wij iedere 2 weken hamsters met larven van *S. mansoni* of *S. haematobium*. Na 6 tot 20 weken (afhankelijk van de wormsoort) infectie worden de hamsters geofferd en worden d.m.v. perfusie wormen verkregen. Uit de lever en darmen worden eieren geïsoleerd.

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

Infectie van *Schistosoma* kan plaats vinden wanneer infectieuze larven (cercariae) door de huid binnendringen. Deze larven worden geproduceerd door geïnfecteerde slakken. Eenmaal binnengedrongen, migreren de larven via het lymfestelsel naar de longen en vervolgen hun weg via het

bloed naar het portale en mesenteriale vaatstelsel (*S. mansoni*) of de blaaswand (*S. haematobium*). Tijdens deze reis ontwikkelen de larven zich tot volwassen wormen. Dit duurt ongeveer 5 weken. Vrouwtjes en mannetjes wormen vormen dan paartjes en gaan eieren produceren. Dit kan oplopen tot 300 eieren per paar per dag. Na 2 weken is dit proces goed op gang gekomen. Bij *S. haematobium* duurt het langer.

Om de levenscyclus mogelijk te maken, infecteren we hamsters met cercariae van *Schistosoma mansoni* of *Schistosoma haematobium* via penetratie van de huid. Geïnfecteerde hamsters worden na 7-10 weken (*S. mansoni*) of na 16-20 weken (*S. haematobium*) geëuthaniseerd. De volwassen wormen worden verkregen door middel van perfusie en zo uit de venen gespoeld. Tevens worden de lever en de darmen verwijderd om eieren te isoleren die deels gebruikt worden voor de infectie van nieuwe slakken met miracidia (bevinden zich in eieren) en deels voor de isolatie van parasietmoleculen.

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.

De levenscyclus van beiden wormparasieten worden parallel naast elkaar in stand gehouden en hebben geen onderling verband.

In het laboratorium worden slakken (*Biomphalaria glabrata* en *Bulinus truncatus*) gekweekt die geïnfecteerd worden met enerzijds miracidia van *S. mansoni* en anderzijds *S. haematobium* om zo infectieuze cercariae te verkrijgen die gebruikt worden voor de infectie van hamsters.

Mijlpalen binnen dit project zijn het verkrijgen van volwassen wormen d.m.v. perfusie en het verkrijgen van levende eieren om enerzijds moleculen uit te isoleren en anderzijds om nieuwe slakken mee te infecteren en zo de levenscyclus in stand te houden.

Het keuzemoment voor deze mijlpaal betreft het tijdstip van perfusie en euthanasie van de geïnfecteerde hamsters. Voor *S. mansoni* is dit na 7-10 weken en voor *S. haematobium* na 16-20 weken, afhankelijk van de ernst van de infectie.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Infectie met <i>Schistosoma</i> parasieten
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.	11600	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Leids Universitair Medisch Centrum	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		1	Infectie met <i>Schistosoma mansoni</i>

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 parasiet kan niet in vitro gekweekt worden, en daarom is het noodzakelijk om de levenscyclus in dieren te laten verlopen. Hamsters worden met larven van de parasiet (cercariae) geïnfecteerd. Deze larven worden verkregen uit geïnfecteerde slakken (tussengastheer). Zes weken na infectie kunnen dan de volwassen wormen d.m.v. perfusie worden geïsoleerd. Eieren worden uit de lever en de darmen gehaald. Wormen en eieren worden gebruikt om specifieke moleculen uit te isoleren ten behoeve van het onderzoek. Anderzijds worden de miracidia uit eieren gebruikt om slakken te infecteren en zo de levenscyclus te behouden.

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.

Infectie van de hamsters:

Infectie van hamsters met *S. mansoni* of *S. haematobium* geschiedt door de hamsters te plaatsen in een bak met een laagje water (ongeveer 1 centimeter hoog) met daarin ongeveer 1200 cercariae/per dier. Er worden maximaal 2 hamsters per bak geplaatst. Na 45 minuten zijn alle cercariae de huid binnengedrongen. Hierna worden de hamsters gedroogd en teruggeplaatst in hun huisvesting.

Perfusie van met schistosome geïnfecteerde hamsters:

Zeven tot tien weken na infectie met *S. mansoni*, of 16 – 20 weken na infectie met *S. haematobium*, worden de hamsters geëuthanaseerd door middel van een intraperitoneale injectie (0,5 mL) met een overdosis 20% Euthasol (pentobarbitalnatrium). Hierna wordt de hamster open geprepareerd, de poortader doorgesneden en de wormen door middel van perfusie (via de aorta dorsalis of via de hartkamer) uit de venen gespoeld. Na de spoeling worden de lever en de darmen verwijderd om eieren te isoleren die deels gebruikt worden voor de infectie van nieuwe slakken en deels voor de isolatie van antigeen preparaten.

De tijdsduur van infectie is afhankelijk van wanneer de hamsters klachten ontwikkelen zoals diarree, minder eten of gewichtsverlies.

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

In de afgelopen 2 jaar hebben we op het lab veel tijd geïnvesteerd in het opzetten van technieken en celsystemen (o.a. gebaseerd op planten) om het parasietafkomstige materiaal recombinant na te maken. Door gebruik te maken van het recombinant materiaal kunnen we veel besparen op het gebruik van het native materiaal verkregen van de geïnfecteerde hamsters en hiermee het benodigd aantal hamsters verminderen.

Door gebruik te maken van hamsters in plaats van ratten of muizen voor het in stand houden van de levenscyclus van *S. mansoni* en *S. haematobium*, hoeven we minder proefdieren te gebruiken omdat hamsters relatief zwaarder geïnfecteerd kunnen worden, zonder hier nadelige gevolgen te ondervinden. De opbrengst per proefdier is dan hoger, waardoor uiteindelijk minder dieren gebruikt hoeven te worden.

B. De dieren

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

Syrische hamsters komen van Janvier (Frankrijk).

Het aantal dieren is direct afhankelijk van de hoeveelheid parasitair materiaal wat noodzakelijk is voor het uitvoeren van immunologische experimenten binnen een aantal onderzoeksprojecten en het instandhouden van de cyclus. Momenteel zijn 6 groepen afhankelijk van dit materiaal voor het beantwoorden van hun vraagstellingen. Op grond van dit lopende onderzoek is een schatting gemaakt van het aantal benodigde aantal hamsters voor de komende 5 jaar. Voor de isolatie van wormen en eieren worden ieder 2 weken 12 hamsters geïnfecteerd: 10 hamsters met *S. mansoni* en 2 met *S. haematobium*. Het materiaal van *S. haematobium* wordt veel minder gebruikt dan van *S. mansoni*. Voor de komende 5 jaar zijn derhalve $5 \cdot (260 + 52) = 1560$ hamsters nodig. We gebruiken mannetjes van ongeveer 6-8 weken uit. Mannetjes hamsters vertonen minder ongerief van de infectie en worden minder snel ziek van de schistsome infectie.

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:

Wij zijn in staat om volwassen wormparen in vitro te kweken. Echter tot op heden kunnen wij deze kweken slechts gedurende enkele weken tot enkele maanden in stand houden. Ondanks intensive inspanningen kunnen wij niet de gehele levenscyclus in vitro nabootsen omdat de gekweekte wormen geen levensvatbare eieren kunnen leggen.

Afgezien van het feit dat we niet weten of de parasitaire moleculen, verkregen d.m.v. in vitro kweek systemen vergelijkbaar zijn het in vivo verkregen materiaal, zijn de in vitro kweken ook nog op dusdanig kleine schaal dat onvoldoende materiaal verkregen wordt voor de invulling in immunodiagnostische testen

en het onderzoek ten behoeve van de immunologische interacties tussen gastheer en parasiet. Ook hier speelt het probleem dat we niet in staat zijn levensvatbare eieren te verkrijgen van in vitro gekweekte wormen, terwijl juist mn de eieren zo'n belangrijke bron vormen van immuunregulerende moleculen.

De volwassen wormen zijn voor hun overleving afhankelijk van vers humaan bloed. De isolatie van worm- en ei-producten uit deze kweken is zeer lastig vanwege de contaminatie met menselijk bloedmateriaal. Nieuwe experimenten richten zich op vervangende kweektechnieken om het gebruik van menselijk materiaal voor het in stand houden van deze wormparen te voorkomen. Dit is een essentiële stap voordat het in vitro gekweekte materiaal bruikbaar is voor onderzoeksdoeleinden of diagnostiek. Dientengevolge zijn we nog aangewezen op het verkrijgen van voldoende parasitair materiaal en het in stand houden van de levenscyclus van de schistosoma wormen m.b.v. hamsters.

In de afgelopen 2 jaar hebben we op het lab veel tijd geïnvesteerd in het opzetten van technieken en celsystemen (o.a. gebaseerd op planten) om het parasietafkomstige materiaal recombinant na te maken. Dit is een essentiële stap om dit materiaal toegankelijk te maken voor therapie doeleinden. Het bijkomend voordeel is dat we voldoende materiaal van interessante moleculen kunnen genereren buiten de levenscyclus om, om deze te kunnen testen in bepaalde ziektemodellen. Deze experimenten vergen veel materiaal. Door gebruik te maken van het recombinant materiaal kunnen we veel besparen op het gebruik van het worm-afkomstige materiaal verkregen van de geïnficeerde hamsters. Momenteel gebruiken we alleen het worm-afkomstige materiaal voor initiële proof-of-principle experimenten en voor in vitro vergelijkingen met het recombinant materiaal.

Vermindering: Hamsters kunnen zwaarder geïnficeerd worden dan andere knaagdieren (bv muizen), waardoor relatief minder dieren nodig zijn om dezelfde hoeveelheid parasieten moleculen te verkrijgen.

Verfijning: We beperken ons tot het gebruik van hamster mannetjes voor de infectie. Onze ervaring is dat mannetjes minder (of later) last hebben van de infectie dan vrouwtjes. Vanaf 6 weken komt de eiproduktie op gang van de wormen en kunnen de dieren daar ongerief van ondervinden. Wanneer geconstateerd wordt dat de dieren vermageren, minder gaan eten en drinken, en last krijgen van bijkomende diarree, worden de dieren direct geëuthanaseerd. Hamsters hebben in vergelijking met andere knaagdieren minder last van de nadelige gevolgen van de parasitaire worminfecties.

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.

Vanaf 6 weken na infectie (het moment dat de ei productie op gang komt), zullen de hamsters drie keer per week gewogen worden. Wanneer geconstateerd wordt dat de dieren vermageren en minder gaan eten en drinken, worden de dieren binnen twee dagen geëuthanaseerd. Soms krijgen de hamsters bovendien last van diarree, In dat geval worden de dieren binnen 24 uur geëuthanaseerd.

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.

De dierproef heeft betrekking op het verkrijgen van voldoende materiaal van wormparasieten en hun eieren. Het in stand houden van de levenscyclus is op dit moment de enige manier om aan dit materiaal te komen en er zijn geen alternatieven voor handen.

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?

Dieren kunnen vanaf week 6 minder gaan eten, drinken en vermageren.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Vanaf week 6 komt de eiproductie op gang

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

We maken alleen gebruik van mannetjes, omdat onze ervaring is dat mannetjes minder snel last krijgen de infectie in vergelijking met vrouwtjes. Wanneer de volgende humane eindpunten bereikt worden, zullen de dieren direct worden gedood: zichtbare pijn (abnormale houding en beperkt bewegen), significant gewichtsverlies (meer dan 15% in 2 dagen of meer dan 20% tov de start van het experiment), abnormaal gedrag (isolatie, abnormale reactie op prikkels), opmerkelijke wondjes of diarree. Diarree is een direct gevolg van de eiproductie. Het moment van euthanasie is dusdanig ingepland dat in het enkele geval dat dieren hier last van krijgen, dat dit samenvalt met de dag van euthanasie.

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.

Wanneer de volgende humane eindpunten bereikt worden, zullen de dieren direct worden gedood: zichtbare pijn (abnormale houding en beperkt bewegen), significant gewichtsverlies (meer dan 15% in 2 dagen of meer dan 20% tov de start van het experiment), abnormaal gedrag (isolatie, abnormale reactie op prikkels), opmerkelijke wondjes, of diarree.

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

Dit is een heel klein percentage, retrospectief kunnen we constateren dat dit ongeveer in 3 dieren op jaarbasis heeft plaatsvinden (ongeveer 1 op 100 dieren). We proberen heel bewust dit moment voor te zijn en de dieren uit het experiment te nemen voordat deze klachten gaan optreden en de humane eindpunten behaald worden.

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.

Matig: De dieren ondervinden ongerief helemaal aan het begin van de proef tijdens de infectie (ze staan dan 20 min met hun pootjes in een laagje water) en helemaal op het einde wanneer de eiproductie op gang komt en ze hier last van ondervinden. Het moment van euthanasie en de beëindiging van de proef is dusdanig ingericht dat deze fase van ongerief heel kort is (max 1 dag) en samenvalt met de euthanasie. In het hele enkele geval dat de dieren toch eerder last krijgen van de eiproductie (zie ook de humane eindpunten), worden de dieren eerder en direct geëuthanaseerd. De tussenliggende periode van infectie verloopt asymptomatisch en hier ondervinden de dieren geen hinder van.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee

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

Dit is de enige manier om de wormen en eieren te kunnen isoleren

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.

x Ja

27-06-2017

DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: AVD1160020171067
2. Titel van het project: Moleculen van schistosoma wormen.
3. Titel van de NTS: Moleculen van schistosoma wormen.
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
 - wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: DEC Leiden
 - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
 - e-mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: 21-04-2017
 - aanvraag compleet: 21-04-2017
 - in vergadering besproken: 18-05-2017 & 22-06-2017
 - anderszins behandeld:
 - termijnonderbreking(en) van 23-05-2017 t/m 13-06-2017
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag:
 - advies aan CCD: 22-06-2017
7. De IvD geeft aan dat de aanvrager de aanvraag 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
 - Datum: 23-05-2017
 - Strekking van de gestelde vragen:
De DEC heeft bij de aanvrager aanvullende informatie ingewonnen met betrekking tot de haalbaarheid, het belang, de 3V's, de humane eindpunten en de NTS.
 - Naar aanleiding van deze vragen is het projectvoorstel inclusief bijlages en de NTS naar tevredenheid door de aanvrager aangepast
10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC)
N.v.t.

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 over deze projectaanvraag te adviseren. De benodigde expertise op dit wetenschappelijke terrein is aanwezig binnen de DEC.
4. Geen van de DEC leden is betrokken bij het betreffende project.

C. Beoordeling (inhoud)

1. Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. Dit project omvat het onderhouden van de levenscyclus van *S. mansoni* en *S. haematobium* door middel van infectie van hamsters. De levenscyclus van beiden wormparasieten worden parallel naast elkaar in stand gehouden en hebben geen onderling verband. De soorten onderscheiden zich wat betreft pathologie, epidemiologie, diagnostiek en de immunologisch actieve moleculen die ze maken. Toegang tot de verschillende levensstadia van de twee parasieten maakt het mogelijk om fundamenteel onderzoek te doen naar de moleculaire interacties tussen parasiet en het afweersysteem. De verzamelde kennis kan bijdragen aan gebruik van parasietmoleculen als therapie voor ontstekingsziekten, en het gebruik van schistosoma antigenen in de ontwikkeling van diagnostiek en vaccinaties ter bestrijding van schistosomiasis, en immuno-epidemiologische studies. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De DEC is er van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.
2. Voor zover de DEC kan beoordelen is er geen sprake van tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van dit project is het beschikbaar maken van de *Schistosoma mansoni* en de *Schistosoma haematobium* parasiet en haar specifieke levensstadia die in de gastheer tot ontwikkeling komen. Het uiteindelijke doel is het isoleren en karakteriseren van Schistosoma moleculen ten behoeve van de diagnostiek van schistosomen infecties, de bijdrage aan het ontwikkelen van een vaccin voor deze mondiaal zeer belangrijke parasitaire infectie waar geen bescherming tegen bestaat, en het onderzoek naar immunoregulerende therapeutica ter bestrijding van ontstekingsziekten. De DEC is van mening dat er een duidelijke relatie is tussen het directe en uiteindelijk doel. De aanvrager heeft helder gemaakt wat de status is van het onderzoeksveld en wat de bijdrage van dit project aan het onderzoeksveld zal zijn. Epidemiologische studies in het kader van het onderzoeksprogramma Parasitologie op het LUMC zijn gebaseerd op worm- of ei-moleculen die worden geïsoleerd uit schistosoma geïnfecteerde hamsters. Deze moleculen vormen tevens de basis voor experimenten waarin de immunologische aspecten van de relatie tussen gastheer en parasiet worden onderzocht. Ondanks intensive inspanningen is het op dit moment echter nog niet mogelijk om de gehele levenscyclus in vitro na te bootsen omdat de gekweekte wormen geen levensvatbare eieren kunnen leggen. Het is daarom noodzakelijk om de levenscyclus in zoogdieren te laten verlopen. De DEC is van mening dat het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld.

5. De belangrijkste belanghebbenden in dit project dat er op gericht is om de levenscyclus van *S. mansoni* en *S. haematobium*, twee soorten schistosoma, ieder doorlopend te onderhouden om parasiet materiaal beschikbaar te hebben voor het onderzoeksprogramma van de afdeling Parasitologie van het LUMC zijn de proefdieren, de onderzoekers, de patiënten in de wereldwijd schistoom-endemische gebieden en in de Westerse wereld waar ontstekingsziekten sterk in opkomst zijn en de maatschappij kan ook worden gezien als belanghebbende bij dit onderzoek.
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 en ongerief ondervinden.
Waarden die voor de onderzoekers bevorderd worden: De onderzoekers zullen materiaal van wormparasieten en hun eieren verkrijgen voor onderzoek. Ook zullen de carrièremogelijkheden van de wetenschappers verbeteren door publicaties.
Waarden die voor de patiënten bevorderd worden: door de beschikbaarheid van wormmateriaal kan onderzoek gedaan worden ten behoeve van de ontwikkeling van nieuwe immuun-regulerende therapieën voor ontstekingsziekten en deze parasitaire infecties.
Waarden die voor de maatschappij bevorderd worden: door de ontwikkeling van een vaccin zullen mensen niet meer geïnfecteerd worden. Doordat hun algehele gezondheid verbeterd zullen zij productiever zijn in de arbeidssfeer. In het kader van immuun-regulerende therapieën voor ontstekingsziekten, deze zullen grootschalig kunnen leiden tot een verbeterde kwaliteit van leven en hogere arbeidsproductiviteit in grote delen van de wereld.
6. Het LUMC beschikt over een biologische veiligheidsfunctionaris die nauw betrokken is bij alle DM3 werkzaamheden. Naar inziens van de DEC wordt de veiligheid hierdoor voldoende geborgd waardoor er geen sprake is van substantiële milieueffecten.

Proefopzet en haalbaarheid

7. Naar de overtuiging van de DEC beschikt de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen om de projectdoelstelling met de gekozen strategie binnen de gevraagde termijn te realiseren. De onderzoeksgroep heeft veel expertise op het gebied van worminfecties en verkrijgt het benodigde materiaal al jarenlang op de beschreven manier. Daarnaast wordt het onderzoeksprogramma gefinancierd vanuit toereikende, belangrijke subsidies.
8. 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 binnen de looptijd van het project.

Welzijn dieren

9. Alle dieren worden gefokt bij een geregistreerd fokbedrijf voor het gebruik in dierproeven, er is geen sprake van afwijkende huisvesting en/of hergebruik. Er is geen sprake van bedreigde diersoorten, niet-menselijke primaten, zwerfdieren en/of dieren uit het wild. De toegepaste methoden voor euthanasie zijn conform de Richtlijn.
10. De DEC is ervan overtuigd dat de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de richtlijn. Het proefdiercentrum van het LUMC beschikt over uitstekende faciliteiten en uitsluitend

bevoegd en competent personeel zal zorg dragen voor de verzorging van de dieren en de uitvoering van de dierproeven.

11. 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. Naar inziens van de DEC ondervinden de hamsters cumulatief maximaal matig ongerief als gevolg van de infectie. Deze inschatting is in overeenstemming met het niveau van het ongerief ingeschat door de onderzoekers.
12. De integriteit van dieren wordt fysiek aangetast doordat de dieren geïnfecteerd worden met parasieten. De integriteit zal ook gedragsmatig worden aangetast. Gedurende het project worden de dieren namelijk beperkt in hun bewegingsvrijheid. Hierdoor zullen de dieren minder natuurlijk gedrag kunnen vertonen.
13. Naar mening van de DEC zijn de humane eindpunten zorgvuldig beschreven en is de inschatting van de incidentie met betrekking tot het bereiken van een humaan eindpunt eveneens zorgvuldig beschreven in de projectaanvraag.

3V's

14. In het project wordt de keuze voor de diermodellen duidelijk onderbouwd. De betrokken dieren en het gekozen diermodel zijn het meest geschikt voor deze studieopzet. Hamsters kunnen relatief zwaarder geïnfecteerd worden, zonder hier nadelige gevolgen van te ondervinden. De desbetreffende dierproef berokkent de dieren het minste pijn, lijden, angst of blijvende schade. De DEC is ervan overtuigd dat er geen alternatieven beschikbaar zijn voor het voorgestelde gebruik van intacte dieren voor het in stand houden van de levenscyclus van wormparasieten.
15. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereisten van vermindering van dierproeven. Hamsters kunnen zwaarder geïnfecteerd worden dan andere knaagdieren (bv muizen), waardoor relatief minder dieren nodig zijn om dezelfde hoeveelheid parasieten moleculen te verkrijgen. De DEC is ervan overtuigd dat het onderzoek ethisch verantwoord zal worden uitgevoerd. De DEC acht het maximale aantal te gebruiken dieren realistisch geschat.
16. De uitvoering van het project is in overeenstemming met de vereisten van verfijning van dierproeven en is zo opgezet dat de dierproeven met zo min mogelijk ongerief worden uitgevoerd. Bij de opzet van dit onderzoek wordt rekening gehouden met dierenwelzijn door het gebruik van mannelijke hamsters voor de infectie. Uit eerder onderzoek is gebleken dat mannetjes hamsters minder ongerief van de infectie vertonen en minder snel ziek worden van de schitsome infectie. De DEC is ervan overtuigd dat de beschreven dierproeven zo humaan mogelijk zullen worden uitgevoerd.
17. Het betreft hier geen wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. De aanvrager zal in het project alleen mannelijke dieren gebruiken. De onderzoeker heeft dit naar mening van de DEC voldoende onderbouwd in de projectaanvraag.
19. De dieren worden in het kader van het project gedood. De volwassen wormen worden verkregen door middel van perfusie en zo uit de venen gespoeld. Tevens worden de lever en de darmen verwijderd om eieren te isoleren. Het doden van de dieren gebeurt volgens een voor de diersoort passende dodingsmethode die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU.

20. Er worden voor dit projectvoorstel geen niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren gebruikt.

NTS

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

D. Ethische afweging

1. Rechtvaardigt het beschikbaar maken van de *S. mansoni* en de *S. haematobium* parasiet en haar specifieke levensstadia die in de gastheer tot ontwikkeling komen met als uiteindelijke doel het isoleren en karakteriseren van Schistosoma moleculen het ongerief dat de dieren wordt aangedaan?
2. Project dat er op gericht is om de levenscyclus van *S. mansoni* en *S. haematobium*, twee soorten schistosoma, ieder doorlopend te onderhouden om parasiet materiaal beschikbaar te hebben voor het onderzoeksprogramma van de afdeling Parasitologie van het LUMC.

Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: matig nadeel.

Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: groot voordeel.

Waarden die voor de patiënten (incl. de maatschappij) bevorderd worden: groot voordeel.

De DEC is van mening dat de belangen van de onderzoekers en de samenleving in dit project zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de proefdieren.

Schistosomiasis is een veel voorkomende worminfectie in de tropen en sub-tropen. Het aantal geïnfecteerde mensen bedraagt meer dan 200 miljoen wereldwijd. Hoewel volwassen wormen een zekere pathogene werking uitoefenen, zijn het vooral de eieren die de patiënt ernstige schade kunnen berokkenen. Uitgebreide bindweefselvorming in de darm, lever, longen en blaaswand belemmert de doorbloeding, met ernstige pathologie tot gevolg. Langdurige infecties verhogen daarnaast het risico op kanker in de aangedane weefsels, met name de blaas. Pas na vele cycli van infectie, behandeling en her-infectie wordt enige resistentie tegen nieuwe worminfecties opgebouwd. Daarom is het zeer wenselijk om een vaccin te ontwikkelen tegen schistosomen parasieten. Daarnaast is uit epidemiologische studies gebleken dat mensen die geïnfecteerd zijn met schistosomen minder last hebben van typische ontstekingsziekten, zoals bv. auto-immuniteit, astma, allergieën, multiple sclerose, colitis of type 2 diabetes. Het ontrafelen van de gastheer-parasiet interacties en de daarmee samenhangende immunologie is nodig voor het identificeren van parasiet moleculen die geschikt zijn om in te zetten als immunotherapie tegen die deze ontstekingsziekten.

Naar inziens van de DEC is het beschikbaar zijn van parasietmateriaal van essentieel belang voor bovenstaand onderzoek. Hiertoe zullen dieren worden gebruikt. De onderzoekers doen er echter alles aan om het lijden van de dieren te beperken, waardoor het ongerief van de dieren zo veel mogelijk beperkt blijft.

3. De DEC is overtuigd van het belang van de doelstelling van dit project. De DEC is van mening dat de waarden die voor de doelgroep bevorderd kunnen worden zwaarder wegen dan de waarden die voor de proefdieren in het geding zijn. Het project is goed opgezet. De DEC is bovendien 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. De DEC is er verder van overtuigd

dat de onderzoeksgroep voldoende ervaring heeft met de gekozen onderzoeksstrategie en met de voorgestelde dierproeven om de doelstelling te behalen en dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om zowel het ongerief van de dieren alsmede het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken. De DEC onderschrijft dat de doelstelling niet zonder het gebruik van proefdieren behaald kunnen worden en acht het gebruik van het aantal dieren en het daarmee samenhangende ongerief bij de dieren 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
 - Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.
 - Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist
 - Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...
- De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
 - De vaststelling dat het project niet vergunning plichtig is om de volgende redenen:...
 - De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...
 - De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

3. Er zijn tijdens de beoordeling van dit projectvoorstel geen knelpunten en of duidelijke dilemma's naar voren gekomen.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academisch Ziekenhuis Leiden

Postbus 9600

2300 RC 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
AVD1160020171067

Bijlagen

2

Datum 7 juli 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 7 juli 2017. Het gaat om uw project "Moleculen van schistosoma wormen". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1160020171067. 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 juli 2017

Aanvraagnummer:

AVD1160020171067

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur






Datum:
7 juli 2017
Aanvraagnummer:
AVD1160020171067

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 11600
Naam instelling of organisatie: Academisch Ziekenhuis Leiden
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: 
KvK-nummer: 27366422
Straat en huisnummer: Albinusdreef 2
Postbus: 9600
Postcode en plaats: 2300 RC LEIDEN
IBAN: NL11DEUT0451001400
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: LUMC

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: 
Functie: 
Afdeling: 
Telefoonnummer: 
E-mailadres: 

Datum:

7 juli 2017

Aanvraagnummer:

AVD1160020171067

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam:

Functie:

Afdeling:

Telefoonnummer:

E-mailadres:

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u?

 Nieuwe aanvraag Wijziging op een (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn**Over uw project**

Geplande startdatum:

1 september 2017

Geplande einddatum:

31 augustus 2022

Titel project:

Moleculen van schistosoma wormen

Titel niet-technische samenvatting:

Moleculen van schistosoma wormen

Naam DEC:

DEC Leiden

Postadres DEC:

LUMC, Postbus 9600 2300 RC Leiden

E-mailadres DEC:

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: 
Functie: Gemandateerd vergunninghouder
Plaats: Leiden
Datum: 30 juni 2017

Datum:
7 juli 2017
Aanvraagnummer:
AVD1160020171067



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academisch Ziekenhuis Leiden

Postbus 9600

2300 RC 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
AVD1160020171067

Bijlagen

2

Datum 7 juli 2017

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 7 juli 2017

Vervaldatum: 6 augustus 2017

Factuurnummer: 171067

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD1160020171067	€ 1035,-

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academisch Ziekenhuis Leiden

Postbus 9600

2300 RC 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
AVD1160020171067

Datum 11 juli 2017

Betreft aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 7 juli 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Moleculen van schistosoma wormen" met aanvraagnummer AVD1160020171067. 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 is erg lang (meer dan 1300 woorden). Richtlijn voor de lengte van een NTS is 500 woorden. Gelieve deze in te korten en hierbij meer de nadruk te leggen op het directe doel.

Onduidelijkheden

- U geeft aan elke 2 weken 12 hamsters te willen infecteren. Gezien het feit dat er 52 weken in een jaar zitten (53 in 2020), zou dit leiden tot $5 \times (260 + 52) = 1560$ dieren. U vraagt 1680 dieren aan. Kunt u dit verhelderen of aanpassen (in de bijlage en in de NTS)?

- Het uiteindelijke doel van uw aanvraag betreft inderdaad "fundamenteel onderzoek". Het directe doel van uw aanvraag is echter eerder "routinematige productie" dan "fundamenteel onderzoek". Graag dit aanpassen in uw aanvraag en de NTS of onderbouwen waarom u ook het directe doel onder fundamenteel onderzoek schaaft.

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.

Datum:

11 juli 2017

Aanvraagnummer:

AVD1160020171067

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.

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

Geachte CCD,

12-07-2017

Naar aanleiding van de opmerkingen op het project "Moleculen van schistosoma wormen" met aanvraagnummer AVD1160020171067 (email 11-07-2017) hebben wij de volgende aanpassingen gemaakt:

- De NTS is erg lang (meer dan 1300 woorden). Richtlijn voor de lengte van een NTS is 500 woorden. Gelieve deze in te korten en hierbij meer de nadruk te leggen op het directe doel.

We hebben de NTS ingekort en meer nadruk gelegd op het direct doel.

- U geeft aan elke 2 weken 12 hamsters te willen infecteren. Gezien het feit dat er 52 weken in een jaar zitten (53 in 2020), zou dit leiden tot $5 \times (260 + 52) = 1560$ dieren. U vraagt 1680 dieren aan. Kunt u dit verhelderen of aanpassen (in de bijlage en in de NTS)?

De berekening was idd niet correct en is nu aangepast in zowel de bijlage als de NTS.

- Het uiteindelijke doel van uw aanvraag betreft inderdaad "fundamenteel onderzoek". Het directe doel van uw aanvraag is echter eerder "routinematige productie" dan "fundamenteel onderzoek". Graag dit aanpassen in uw aanvraag en de NTS of onderbouwen waarom u ook het directe doel onder fundamenteel onderzoek schaaft.

We hebben het doel aangepast naar 'routinematige productie'. Dit is het directe doel, het uiteindelijke doel, wat fundamenteel onderzoek betreft zal in een andere projectaanvraag meer belicht worden.

Met vriendelijke groet,



Albinusdreef 2
2333 ZA Leiden
The Netherlands



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academisch Ziekenhuis Leiden

Postbus 9600

2300 RC 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

AVD1160020171067

Bijlagen

1

Datum 21 juli 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 7 juli 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Moleculen van schistosoma wormen" met aanvraagnummer AVD1160020171067. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 13 juli 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Op ons verzoek is de NTS ingekort en meer toegespitst op het directe doel van het project. Daarnaast is de berekening van het aantal benodigde dieren gecorrigeerd.

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 "Moleculen van schistosoma wormen" 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 Leiden gevoegd. Dit advies is opgesteld op 22 juni 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:
21 juli 2017
Aanvraagnummer:
AVD1160020171067

Bezwaar

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen. Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

Bij het indienen van een bezwaarschrift vragen we u in ieder geval de datum van de beslissing waartegen u bezwaar maakt en het aanvraagnummer te vermelden. U vindt deze nummers in de rechter kantlijn in deze brief.

Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige voorziening vragen bij de Voorzieningenrechter van de rechtbank in de woonplaats van de aanvrager. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisend belang.

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

Meer informatie

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

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

- Vergunning
- Hiervan deel uitmakend:
 - DEC-advies
 - Weergave wet- en regelgeving



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Academisch Ziekenhuis Leiden

Adres: Postbus 9600

Postcode en plaats: 2300 RC LEIDEN

Deelnemersnummer: 11600

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 september 2017 tot en met 31 augustus 2022, voor het project "Moleculen van schistosoma wormen" met aanvraagnummer AVD1160020171067, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Leiden. 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 7 juli 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 13 juli 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 13 juli 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 22 juni 2017, ontvangen op 7 juli 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 13 juli 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Infectie met Schistosoma mansoni				
	Syrische goudhamsters (Mesocricetus auratus) /	1.560	100% Matig	

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. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarde wijzigen of intrekken.



Aanvraagnummer:

AVD1160020171067

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:
AVD1160020171067

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 W17-12									
nr.	documenten NTS20171505	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	Projectvoorstel			x					
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1			x					
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2			x					
6	DEC-advies oud				x		x	x	
7	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
8	Verzoek en reactie verzoek aanvulling				x		x	x	
9	DEC-advies nieuw				x		x	x	
10	Advies CCD		x						x
11	Beschikking en vergunning				x		x	x	

1505

1.



11 JULI 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 80200 <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	Koninklijk Nederlands Instituut voor Onderzoek der Zee
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]
		KvK-nummer	41240385
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	Landsdiep 4
		Postbus	59
		Postcode en plaats	1790AB Den Burg
		IBAN	NL69ABNA0642374252
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	St. NIOZ
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 checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" 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 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 22 - 7 - 2017
- Einddatum 1 - 8 - 2022
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Shorebirds in a rapidly changing world: gaining mechanistic understanding of the behavioural, physiological, and population-level responses of shorebirds to global change
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Steltlopers in een snel veranderende wereld: veranderingen in gedrag, fysiologie en populaties op wereldniveau
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC
- Postadres
- E-mailadres

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1035,- 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 't Horntje

Datum 04 - 07 - 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).

Dit document bevat bedrijfsgevoelige informatie

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
- Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
- Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de
- Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
- Hoger onderwijs of opleiding
- Forensisch onderzoek
- Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Background

We live in a **rapidly changing world** in which species are increasingly threatened by habitat loss, overexploitation of natural resources, and climate change. These rapid changes offer opportunities to study the most fundamental question in evolutionary ecology: how do organisms respond to environmental variations? As rapid environmental changes almost form ‘statistical treatments’ in human-induced ‘natural experiments’, global change provides opportunities to address large-scale fundamental questions on behaviour and ecology. Of course, and maybe even more important, also for applied reasons these scientific opportunities should be fully embraced, as fundamental understanding of organismal responses to global change is probably the most effective way to carry out nature conservation. It will be much easier to halt the decline of a population when the reasons for the decline are clear.

Shorebirds are very well suited to study the ecological and evolutionary response to global change. This is because they live in the most fragile and threatened habitats in the world (a rapidly warming Arctic during the breeding season and coastal habitats dealing with a variety of anthropogenic pressures during the nonbreeding season). By travelling the globe annually from the Arctic to the tropics or even further, shorebirds may be our most reliable ‘canaries in the global coal mine’, i.e. providing early-warning signals. Because they live in open landscapes and are conspicuous, their ecology and behaviour can readily be studied, even at the individual level by marking/tagging them (color-bands and/or transmitters) – furthermore, in these rather horizontal landscapes also their prey can be monitored effectively, enabling us to study their ecology in a multi-trophic setting. Last, but not least, shorebirds can be kept in captivity relatively easy over long periods (well-known examples are Red Knots *Calidris canutus* and ruffs *Philomachus pugnax*), which makes it possible to carry out indoor experiments in which experimental variables can be controlled for.

At our institute we have a **long tradition of studying shorebirds** in the context just described. As a first example, consider our work on Red Knots wintering in the Dutch Wadden Sea. It showed that overexploitation of cockle stocks dramatically altered the birds’ foraging opportunities in an indirect manner by changing the stability and structure of the sediment in which their mollusk prey live, thereby affecting entire benthic communities and subsequently Red Knot survival rate and population size. Continued monitoring of food and birds are now revealing how sediments, bivalves and birds are gradually recovering after banning cockle fisheries from the Dutch Wadden Sea. A second example is the recent evidence that another subspecies of Red Knots shows higher mortality at its tropical wintering grounds because of rapid warming at its high Arctic breeding grounds, mediated by body size reductions due to hampered growth of chicks in the Arctic. Notably the reduction in bill length impairs the ability to find the deeply burrowed bivalves, which comes at the expense of reduced survival. Both of these examples make clear that anthropogenic effects on populations are subtle and can only be detected and understood by gaining a deep and fundamental understanding of the needs and choices of individual birds.

One of the strengths of our work has always been the **tight link between fieldwork on free-living birds and indoor work on captive birds** – intriguing but seemingly unanswerable questions raised in the field have often found an answer in our experimental shorebird facilities. With respect to both examples just given: where the fieldwork suggested a *causal* link between survival and a changed food supply (ex. 1) or a changed phenotype (ex. 2), only by carrying out indoor experiments we could mechanistically pinpoint what it was exactly that the individuals were suffering from (ex. 1: changes in food quality affecting different phenotypes in different ways; ex. 2: unveiling how prey depth affects intake rate for differently sized individuals). We can safely claim that worldwide no other research institute exists that holds such a strong infrastructure for fieldwork (research vessels, well-trained personnel) in combination with top-notch experimental facilities. On top of that, with shorebirds being globe trotters widely extending beyond the borders of the ‘Dutch waters’, we are maintaining tight collaborative bonds with shorebird researchers all over the world – making it possible to work in those countries and to import ‘foreign’ shorebirds to our housing facilities to address field-based questions.

Whereas in the past our research program has mostly addressed questions of pure fundamental nature, the focus in the current 5-year project is by-and-large steered by the necessity and duty to understand how organisms deal with rapid environmental change. More to the point, in this project we are specifically interested in **how changes at temperate-zone stopovers affect shorebird populations**. These changes include loss of habitat, or alternatively habitat restoration projects. Changes in habitat will change opportunities in foraging and will alter the landscape of fear, thereby affecting movements of individuals through these landscapes. We are specifically interested in how movements differ between individuals, at fine scale of daily foraging trips, to the larger scale of stopover- and wintering site selection. The currently hot field of *animal personality* states that individuals within a species differ strongly and consistently in their behavior, notably in how they explore their natural environment (at various spatial scales). Blending that field with *global change biology* and *movement ecology* predicts that some individuals are better able to respond to rapid changes than others – and this is a key prediction that we are aiming to test in the current project, both experimentally at small

scales of indoor housing facilities as well as in the wild at the spatially increasing scale of patches, coastal mudflats, and even entire ecosystems.

Because our birds cross international borders, and because many of them live longer lives than the 5 years of this project, and because population monitoring happens at a temporal scale of decades, the current project cannot be seen in isolation. The proposed work clearly contributes and builds upon the insights and experiences gained over the past 25 years. What makes this project new, stimulated by ‘personality theory’ and only possible now because of novel tracking techniques, is that the focus in our work has shifted from the *average* individual in the population to *differences* between individuals to better understand responses to environmental change.

To address these **global-change driven questions**, we work with a limited group of selected shorebird species that differ in ecological niche occupation (species given below). The choice for these specific species reflects the ‘research trade-off’ that exists in gaining a thorough understanding of a single species vs. the ability to generalize the results across species. Although part of the work is beyond the scope of the *WoD* (*‘Wet op Dierproeven’*; such as catching, banding, and collecting biometry data), a major part is dealt with by the *WoD*. Together they form a single project with an overarching aim, described below.

3.2 Aims and objectives, feasibility, and expected outcomes

The aim of this project is to gain mechanistic understanding of the behavioural, physiological, and population-level responses of shorebirds to environmental changes. This broadly-defined aim is composed of three main objectives:

1. **How do shorebird *populations* respond to environmental change?** This objective will be achieved by collecting and analyzing individual-level demographic data.
2. **Are *individual* birds adjusting their *movement* patterns to landscape-scale changes?** This objective will be approached by using the latest tracking technologies.
3. **Can *physiological* and *behavioural* parameters form ‘ecological indicators’ of environmental change?** This objective will be tackled by carrying out experiments on captive birds in our shorebird facilities.

Obviously, this broad aim and its main objectives stretch over a much longer period than just the 5 years covered by this project. Most ecological processes are rather slow and take many years of study, e.g. the demographic response to environmental change. Thus, to meet main objectives in the long run, this project has the following ‘**short-term**’ goals (experiment types) that are achievable within the next five years. Note that these goals flow in a logical order and are highly interconnected (Fig. 1):

- i. **To *describe* individual characteristics.** In order to be able to understand how individual differences affect the outcome of our experiments, a logical first step is to *describe* individuals. The following characteristics will be identified: age, sex, mass, structural body size, personality (‘explorativeness’), biological clock, digestive capacity, metabolic capacity, recent diet. The specific questions dealing with this type of experiments all come to down to asking how an individual’s response to an environmental factor relates to its unmanipulated characteristics. For example: do juveniles differ from adults in their foraging success; do males with their smaller body size face more problems finding deeply burrowed bivalves; does body mass affect anti-predation behavior; or does body size scale to survival through differences in foraging success?
- ii. **To *manipulate* individual characteristics.** A logical follow-up step after describing individual characteristics is to *manipulate* these characteristics (where possible). An important aspect of the phenotype that can and will be manipulated is an individual’s digestive capacity. Notably gizzard size in Red Knots, our focal species up to now and in this project (see below), can be manipulated readily, just as metabolic capacity and energy reserves. The questions dealing with this type of experiments all boil down to whether an individual responds differently to an environmental factor when one or more characteristics have been manipulated compared to its unmanipulated ‘control state’. For example: how does a change in gizzard mass affect foraging behavior; how does a change in energy reserves affect anti-predation behavior; or how does a change in diet affect foraging behavior (often

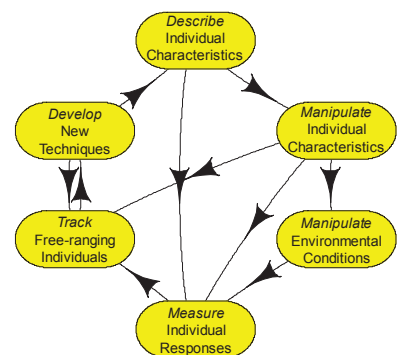


Fig. 1. The logical loop of the six goals (experiment types) and their interconnectedness in this project.

- through diet-changes affecting digestive capacity)?
- iii. **To manipulate the experimental environment.** In order to understand how individuals, depending on their (un)manipulated characteristics, respond to a changing environment, we will *manipulate* (aspects of) their environment (such as the light-dark regime, the tidal regime, microclimate, and the trophic environment (i.e. the quality and quantity of food)). Questions dealing with this type of experiments all deal with the response of individuals to an experimentally manipulated environment relative to the response to a ‘control environment’. For example: how does foraging success vary with variations in food density; or how does the manipulated quality of the food affect the digestive capacity, and thereby an individual’s prey choices?
 - iv. **To quantify behavioral/physiological choices in controllable environments.** The next step is then to measure how these (un)manipulated individuals *respond* to their (un)manipulated environment. Hence, we will quantify their ‘choices’, both their behavioral choices (e.g. prey choice, patch choice, flock choice, intake rate) as well as their physiological choices (e.g. digestive and/or metabolic capacity, energy expenditure). Only by looking at Fig. 1 it is clear that this goal is a very central one in our project – the three goals mentioned above all lead up to this goal of behavioral/physiological choices. More specific questions to be addressed in this experiment type are: how do prey choices depend on an individual’s manipulated digestive capacity (gizzard); how does a forager’s social environment determine its foraging choices (patch and prey choice); how do energy reserves depend on the manipulated variability in food abundance; or how does energy expenditure scale to food density (i.e. do foragers work harder or less hard under poor food conditions)?
 - v. **To track individuals in the wild.** The next logical step, although it can also be the beginning in this chain of research steps, is to track individuals in the unmanipulated wild – this can either be individuals that have undergone an experimental manipulation as described above or not. Modern tracking tools to be applied are miniature radios, GPS-loggers, and satellite tags. Specific questions linked to this goal are: how do different individuals make use of their resource landscape; how is an individual’s daily ranging behavior affected by the manipulation of its digestive capacity (i.e. gizzard); how is migration phenology affected by body size; does timing of spring migration in response to Arctic warming advance *within* or *between* individuals (generations in the latter case)?
 - vi. **To develop new techniques in pilot experiments.** In order to keep this ‘loop’ of research steps going and cutting-edge, we aim to be at the frontiers of tracking technology, e.g. by testing out lifelong attachment techniques for miniature transmitters. In addition, we aim to identify physiological proxies of performance (e.g. refining ultrasonography for measuring organ size) or behavior (e.g. using skin biopsy to identify an individual’s biological clock, which seems to be a proxy for aspects of an individual’s personality). It is clear this goal is not directly question-driven but aimed at improving the methodology to address the questions raised in the other experiment types.

Details of these goals will be spelled out in the Appendices. Please note however, that at this stage we can only spell out the details of our proposed work to a certain extent, as the outcome of a single experiment often determines the question to be addressed in the next experiment, **but obviously always within the boundaries of the just-listed goals.**

The general feasibility of this project is very high. Ever since 1988, our research group has built up tremendous experience in catching, marking, and housing of shorebirds. This is evident from the long and wide list of publications, including a monograph that summarizes our work up until 2011 (Piersma & van Gils, 2011, *The Flexible Phenotype: A Body-Centred Integration of Ecology, Physiology and Behaviour*, Oxford University Press). With respect to catching and marking, since 1998 we have caught > 18,500 individual shorebirds which have been given individual color-band combinations (for the demographic monitoring objective). With respect to housing, we have several shorebird facilities, including the so-called *Experimental Shorebird Facility*, a worldwide unique indoor housing facility, in which climate and tide are experimentally controllable. In total, we will have a capacity to house 270 birds and (after having completed building extra aviaries), including rooms to keep birds in quarantine for their initial period of captivity before we ‘team them up’ with other captive birds. From earlier experience we know that shorebirds held in our facilities for as many as 20 years mix again with free-living flocks after their release and that they show natural-level survival rates.

More specifically, we consider the feasibility per experiment type (goal) is as follows:

- i. **Description of individual characteristics.** Very high feasibility for these type of measurements, as they form the basis for much of our work in the past. Ageing and sizing is very straightforward and based on worldwide standardized and published methodologies. Sexing is based on established molecular techniques. Stable isotope analysis is a widely applied tool, also by our group, to assess recent diet. Just recently, we have successfully designed a standardized technique to assign an individual’s personality as explorative or non-explorative (by quantifying its movement in a standard cage). To quantify digestive capacity we rely on the well-established

- technique of ultrasonography (developed by our own group), and metabolic capacity is measured in a standardized way using metabolic chambers that are present in our shorebird facility. The most challenging is to assess an individual's biological clock based on a small sample of skin tissue, but this has been applied and tested successfully in studies on mammals (mice, humans) and is in development for birds (zebrafinch, pigeon, blue tit).
- ii. **Manipulation of individual characteristics.** We have vast experience in manipulating an individual's digestive performance by changing the quality of its diet. This also changes a bird's metabolic capacity. Energy reserves can readily be changed by adjusting a bird's daily ration.
 - iii. **Manipulation of the environment.** High chance for success here as we have much experience and the technical infrastructure in our shorebird housing facilities to manipulate environmental variables, including light-dark, tide, microclimate, and food quantity and quality.
 - iv. **Measurement of behavioral/physiological choices.** Methodology that we have used in the past will also make this aspect a successful undertaking: in our aviaries, we can readily record behavioral preference for prey, patch and flocks by offering different options to focal birds (often these birds are videotaped during such trials to analyze the choice at a later stage). 'Physiological choices' such as the size of digestive or exercise organs will be measured by the established technique of ultrasonography, metabolic capacity can be measured by quantifying oxygen consumption at rest in our metabolic chambers. Daily energy expenditure will be quantified using the technique of doubly labelled water that we have so often applied in the past.
 - v. **Tracking of individuals in the wild.** This is the most challenging of all tasks as its success heavily depends on the current efforts to miniaturize the necessary technology (satellite transmitter, GPS, solar panel, battery), including the (lifelong) attachment of transmitters in the right way with the right material. We are in the midst of testing out all issues here (see next point).
 - vi. **Development of new techniques.** Testing out the novel techniques (transmitter attachment, ultrasonography, skin biopsy) is very feasible as this can be done on captive birds that do not participate in the actual 'manipulative' experiments described above.

The expected outcomes of this 5-year project will of importance for the scientific community, as well as for applied conservation purposes. With respect to the three main objectives, we expect this project (1) to **deliver 'early-warning' signals** for upcoming population changes in the form of subtle changes in individual-level demographic parameters (survival rates, reproductive rates); (2) By **tracking of individual birds through changing landscapes**, the project will contribute to the rapidly expanding and scientifically 'hot' field of movement ecology, and it will allow us to express quantitatively the importance of different sites along flyways (using the relative time spent at sites by tagged individuals we will be better able to translate counts into the actual number of individuals making use of a site); (3) The project will deliver continued insights in the **(in)flexibility of shorebird physiology and behaviour to environmental fluctuations**, thereby it will provide important scientific contributions to our field, but also outline the limits set by our rapidly changing world on the fragile lives of shorebirds.

3.3 Scientific impact and societal relevance

Scientific impact

First, it is a long-standing goal in ecology to **scale up from individuals to populations**. With the demographic program, we are able to link individual traits (e.g. diet, body size, organ size) to survival rates, thereby delivering the building blocks for physiologically structured population models. With such models, we will be able to make predictions on population numbers, and explore the sensitivity of populations to various forms of trait-dependent survival. Adding data on benthic prey densities, will enable us to explore the validity of various predator-prey models that form the heart of ecological theory. To the best of our knowledge, having individually marked > 18,500 birds in order to estimate demographic parameters, is a worldwide unique undertaking. Second, the **tracking of individuals at various spatial scales through resource landscapes** contributes greatly to *movement ecology* – a discipline that is developing rapidly since tracking devices have recently been miniaturized. Furthermore, we are at the forefronts of developing and using the latest miniature tracking devices. Furthermore, the tracking at larger scales (using satellite transmitters) serve to study the ontogeny of migratory pathways, and how shorebirds adjust their migratory phenology to rapid climate changes and changes in a site's carrying capacity. Our group is unique in mapping resource landscapes in a large spatial extent (>1000 km²), and in being able to express these resources as *harvestable* resources (most studies cannot distinguish harvestable from non-harvestable food items). Third, **understanding behavioural and physiological responses to environmental variations** contributes to the fields of behavioural and physiological ecology. Over the past years, our group acquired a unique position in these fields thanks to the ability to quantify digestive organ size (i.e. gizzard) in live birds and link this to behaviour and ecology (summarized by Piersma & van Gils 2011).

Societal relevance

As laid out in the Introduction, the insights gained in this project not only serve scientific progress, they can very well also contribute to developing nature conservation strategies. Obviously, we realize that applying scientific insights into nature conservation practices requires a long breath, longer than the five years that this project lasts. Nevertheless, having such a societal spin-off is a key driver for our work and hence we want to stress the following points. First, the demographic monitoring may provide **early-warning signals of upcoming population changes** – something that Dutch conservation organizations can and want to make use of (e.g. a so-called ‘Early Warning and Alert Protocol’ has been developed to take hands-on conservation actions). Second, tracking of individual birds will unveil the **importance of key sites in the annual cycle** of different migratory shorebird populations (this includes breeding-, stopover- and nonbreeding- sites); information that is required when assigning protective status to coastal wetlands. Third, even fundamental insights in behavioural and physiological responses to environmental variation will provide handles in the form of ‘behavioural’ and ‘physiological’ **indicators of population stress** – a school of thought that has gained much credibility over the last years. On top of these three conservation aspects, our work serves an educational purpose through outreach and has a large appeal to the general audience. We have been active in this respect (e.g. think back of our role in nation-wide discussion on banning cockle-fisheries) and will continue to invite the press to report on our work (e.g. newspapers, internet, radio, TV, e.g. *Klokhuis* covered our catching work not so long ago), write popular publications (as a recent children book on being a shorebird biologist), give lectures for the laymen (e.g. schools, nature education centers, amateur ornithological meetings, public evenings), take part in exhibitions (e.g. a permanent exhibition of our work was recently opened at Ecomare), and even perform in a shorebird musical (e.g. ‘Tracks’ at Oerol).

3.4 Research strategy

3.4.1 Overview of the project

The three objectives described under 3.2 will be achieved in three different work packages (WPs, see also Fig. 2):

WP1. Demographic monitoring. In this WP we aim to realize the project's first objective, which is to understand how at the *population* level, shorebirds respond to environmental change. The direct goal is quantify survival rate and link these to (*non-manipulated*) *individual characteristics*.

WP2. Tracking. In this WP we aim to realize the project's second objective, which is answer whether and how *individuals* are adjusting their movement patterns to landscape-scale changes.

WP3. Studying behavioral and physiological indicators. In this WP we aim to realize the project's third objective, which is develop and unveil specific *behavioral* and *physiological* indicators of individual responses to environmental change. Of the experiment types described earlier, this package mainly deals with *manipulating individual characteristics* and *manipulating environmental conditions* and subsequently measure the *individual responses*, both at the behavioral and at the physiological level.

The first two WPs take place in the field, and hence will be dealt with in a single Appendix (3.4.4.1). The third WP takes place on captive birds and is spelled out in another Appendix (3.4.4.2).

Connectivity among the different Work Packages

The different WPs connect tightly with each other as described above and visualized in Fig. 2. This connectivity holds both scientifically as well as logistically.

Scientifically, we generally follow the reductionist's approach by trying to understand the bigger picture by understanding the smaller pieces of the puzzle. The wholly grain in ecology is to understand the dynamics of populations, with the puzzle pieces being individual organisms. In that respect, WP3 deals with the smallest building block in this project, where we try to understand individuals on the basis of their behavior and physiology. At a higher integration level, WP2 tries use this information to understand how individuals move in space and time. At this project's highest integration level, WP1 aims to scale up from movement patterns to demographic rates (notably survival), ultimately to come to grips with (changes in) population numbers.

We can best explain this connectivity on the basis of a clear example from our past work. In the past, we were seeking for an explanation of the decline in the population of *islandica* Red Knots during the period that mechanical cocklefisheries was allowed in the Dutch Wadden Sea. Our demographic monitoring (WP1-type of work) revealed that local survival rate of colour-banded individuals was declining. Ring-resightings outside the Dutch Wadden Sea showed that some individuals had moved to other coastal areas that were not under the pressures of cockle dredging, such as the Wash in the UK (WP2-type of work). The question why only some individuals had moved out from the Wadden Sea could only be answered at the physiological level (WP3-type of work). It were the birds with the smallest gizzards that had left the Wadden Sea, seeking for high quality food that had disappeared from the Wadden Sea after cockle-dredging had turned the Wadden Sea benthic community almost into a monoculture. All three type of work, demographic monitoring (1), following/tracking individuals (2), and gaining insights in the physiological constraints of food processing (3) were essential to get the full picture.

Logistically speaking, birds caught for WP2 and WP3 will mostly be caught during the regular catches in WP1. Occasionally it will be the other way around, such that catches organized specifically for WP2 or WP3 be also yield extra birds that will be banded and released immediately for the objective of WP1. Furthermore, tests performed in WP3 (such as trying out novel tagging techniques) are essential for a successful deployment in the wild in WP2.

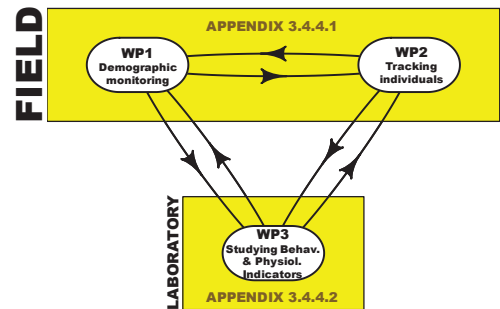


Fig. 2. Schematic overview of the project and the relationship between the three Work Packages (WPs), and reference to their detailed description in the Appendices.

3.4.2 Overview of the different aspects in each Work Package

FIELD WORK (details in Appendix 3.4.4.1):

WP1. Demographic monitoring

This work package will obviously be carried out in the wild, as here we are interested in understanding and forecasting dynamics of natural populations of shorebirds from basic demographic parameters (notably survival rate, but also harder to estimate recruitment rate). The whole package basically is a 3-step procedure, including (1) catching birds, (2) ringing and

characterizing birds (in terms of age, size, behaviour and physiology), and (3) releasing them back in the wild.

WP2. Movement ecology

Also this WP takes place in the wild. Practically, the work aligns neatly with the demographical work, as birds need to be (1) caught, (2) ringed and characterized (age, size, behaviour and physiology), and (3) released. However, before release they are given a radio- or satellite-tag, which enables to track birds across fine spatial detail or over larger spatial scales, respectively.

LABORATORY WORK (details in Appendix 3.4.4.2):

WP3. Behavioural and physiological indicators

This WP largely takes place at the institute’s shorebird facilities. Simply sketched, the work here is a 3-step procedure, including (1) catching birds, (2) carrying out experiments at the institute’s facilities, and (3) releasing them back in the wild (with about 20% of these birds being deployed with a tag).

In the project we will use the following species: Red Knot (*Calidris canutus*), Bar-tailed Godwit (*Limosa lapponica*), and Sanderling (*Calidris alba*). We have chosen for these three species because they each occupy a unique niche in waddensystems, with Red Knots being typical shellfish-consumers, Bar-tailed Godwits being worm-eaters, while Sanderlings typically specialize on small crustaceans. Hence, we have three different type of ‘canaries’, each warning us in its own way for a critical change in the environment. The numbers that we aim to catch for each species for the different species (given in the Appendices) depend on a species catchability and resightability of marked individuals (WP1), the ability to track a species in space (which depends largely on its body size; WP2), and on the relative ease with which the different species can be housed in captivity (WP3). These numbers make clear that the Red Knot is the focal study species, as we have most experience with them, and we can thus build upon vast practical experiences with this species and scientific knowledge. All birds in this project will be caught in the Netherlands, except for a few cases in which birds will be caught elsewhere (e.g. Poland, Germany, France) in order to participate in the indoor experiments at our institute (WP3), where after they may be released in the Dutch Wadden Sea to take part in a tracking study (WP2).” Needless to say that in these foreign countries, the catching is covered by the local legislation.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Demography and movement ecology of free-ranging shorebirds
2	Testing behavioural and physiological indicators of environmental change at the institute
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.	80200	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	NIOZ Royal Netherlands Institute for Sea Research	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		3.4.4.1	Demography and movement ecology of free-ranging shorebirds

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.

Tracking birds gives us a better understanding about population dynamics and movement ecology of shorebirds. To conduct this we catch shorebirds and equip them with a unique combination of colour rings and some of them additionally with a tag. With the information from the tags and resightings we can follow individuals for several years and link this to their individual traits (e.g. diet, body size, gizzard size, weight). All individual traits together enable us to compare birds and to get an overview on these traits in a population. This knowledge together with the individual identification can give us more background information about different survival rates habitat use and population dynamics.

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.

1. Catching, ringing, measuring (100% of birds)

We focus on shorebirds such as Red Knots (*Calidris canutus*), Bar-tailed Godwits (*Limosa lapponica*) and Sanderling (*Calidris alba*) which use the Wadden Sea for overwintering or refuelling and occur in big flocks. In addition to catching shorebirds in the Wadden Sea, we aim to catch them at other refuelling sites such as Banc d'Arguin in Mauritania as well. When we catch birds at these alternative locations, we always aim to use the least invasive catching method appropriate for that site and we work according to local legislation. Depending on the target species and environmental conditions we catch shorebirds with either mist-, canon- or wilster-nets.

Mist-nets are used on intertidal areas and are opened when the waterlevel rises. During this relative short time span birds are 'pushed' by the tide towards the shore/island and encounter our nets. We make sure that the nets are located in such a way that they stay dry during high tide. Nets are checked on a regularly basis. In case we see (or hear; mistnetting occurs in the dark) a flock of birds passing by we check our traps and nets immediately. In general a bird is caught for a maximum of 1 hour.

For birds like Sanderling which roost in dense flocks on predictable high-tide locations, we use a cannon-net. We install this type of net by digging holes in the ground in which we put small cannons (facing upwards), these cannons are attached to a big net. This net is laying in front of the cannons and when a flock of bird sits nicely in front of the net (at least 2m away from the cannons) we fire the cannons. Then the net is pulled completely over the flock and all birds are trapped under the net. With this method we are able to catch

many birds quickly at once. When the net is shot we immediately take the birds out. The last bird which is taken out has been under the net for a maximum of 30 minutes.

In general when nets or traps are open we keep visual control from a short distance (meters). When birds are taken out of the nets they are quickly checked on their wellbeing, put in a crate/bag that is suitable for birds, and brought to the measuring and ringing location. The distance between the catching and ringing location is small and transportation of birds takes about 15 minutes.

For reliable measurements on population dynamics, survival and movement ecology, it is important to identify birds individually. Each bird will be marked with a metal ring and a unique combination of colour rings and a flag for individual identification. We will additionally measure individual traits such as body sizes (bill length, total head, wing, tarsus, tarsus-toe), breast- and wing-moult, age, weight. In Red Knots we additionally measure the size of gizzard and pectoral muscle. Where most measurements are taken with a ruler, the gizzard and pectoral muscle size is measured by means of ultrasound technology which is a non-invasive method. Red Knots eat their prey whole and crush the shells in their gizzard. When a knot eats a lot of hard shelled prey its gizzard becomes more muscular and therefore bigger than that of a knot which eats soft food or only small shells. With this information on the gizzard size we can tell more about the diet of a bird and it allows us to make predictions on food availability. The size of the m. pectoralis tells us more about the flight behavior, during migration this muscle should be bigger. When this muscle is small in the time of year when you expect it to be big, than this bird might be in a bad condition. (Dekinga, A., Dietz, M.W., Koolhaas, A., Piersma, T., 2001). The obtained measurements provide us information on how individual traits are related to movement, habitat use, survival and ultimately population dynamics. With this information we can give a description on individual characteristics of free-ranging birds.

In addition to the non-invasive proceedings there will also be some invasive procedures that consist of taking a blood sample and/or a small skin biopt. During blood sampling 60-100µl. of blood is taken per bird out of the brachial vein. These samples are used for sexing, analysis of DNA/RNA, isotopes, hormones and other blood parameters. Skin samples are taken from 10% of caught birds. These samples will be taken on a spot where the skin is very flexible/loose for example under the wing. Here the skin is lifted up a bit and with a sharp medical siccor a small biopt (± 1mm.) is taken. From earlier experience we know that this procedure is very quick, easy and seems less invasive than blood sampling. The skin will recover very quickly and within a few days it is not possible to find the place where the biopt was taken. These skin samples will be used for in-vitro growing of fibroblast cultures. With these cultures experiments will be done on diurnal rhythms.

For one bird to go through these ringing and measuring procedures it takes approximately 10-15 minutes.

2. Short behavioural essays in the field (20% of birds)

For a selection of birds, we will collect detailed behavioural data on individuals. For these short behavioral essays one could think about experiments related to individual characteristics or measurement of behavioural/physiological choices. In these experiments things such as the intake rate, food preference, energy intake and output and/or digestive capacity can be measured. For these kind of experiments birds have to be kept captive at the catching site for a bit longer. Most of the time these behavioural essays are done within 24 hours. In some cases it happens that it takes longer than 24 hours (< 5% of birds). In these cases birds will be released without behavioural essay or held captive in temporary fieldcages. The size of these fieldcages vary in size between ±0,5*0,5*0,5m up to ±2m*1m*0,5m (LxWxH) depending on the amount of birds. The smallest fieldcage is suitable for only one bird and the biggest fieldcage is suitable for a maximum of 6 birds. The fieldcages are placed on a natural ground (like sand) and enough food and water is present. These fieldcages are made and placed in such a way that predators cannot reach them and discomfort will be minimalized. Besides that the birds in these cages are checked closely. If a bird shows restless behaviour such as trying to fly, not foraging or any other behaviour of which we think a bird is very stressed we release this bird without doing the essay. When these experiments are completed all birds will be released. The outcome of these experiments answer our question on individual traits and differences between individuals. These birds will be released with a tag (either glued or harness) to make a comparison between these short behavioral essays and their movements in their original habitat related to their food sources. Since our institute annually samples the whole Dutch Wadden Sea we know which benthos species occur, how much food there is for birds and where this food is most abundant. By comparing the movements of birds and the food abundance we could say something about their ability to find food and if/how this changes over the years.

3. Tagging (20% of caught birds)

To make the comparison with the short behavioural essays as mentioned above and to understand the movements of birds, their habitat use and other demographic parameters, we will track individuals. We will use two types of tags; one for regional scale movements and one for large scale movements. In general only birds which have a decent weight for the time of year, neat plumage and seems in good condition will be equipped with a tag. The type of tag depends on the research question. We use glued tags for answering questions on regional scale movements or how a bird uses a local habitat. With these tags we gain a knowledge about how a bird moves around the habitat and its food sources. We prefer to use glued tags because they send high resolution data/signals for a short period (± 6-8 weeks) and will fall off when the bird starts moulting and growing new feathers (approximately after a few months). From earlier experience we know that after the first moulting season it is not visible anymore that this birds was equipped with a glued tag before. Glued tags will be used on Red Knots, Bar-tailed Godwits and Sanderling (12% of caught birds). The weight of a glued tag is about 2 grams, which is about 3% of the body weight of a Sanderling. The glued tags for Red knots and Bar-tailed Godwits are 5 grams which is less than 5% of their body weight and therefore below the frequently used 5% of body weight rule.

Tags which are applied by means of a harness will be used for answering questions on large scale movements, migration. For now we will use this type of tag on Red Knots and Bar-tailed Godwits (8% of caught birds). With this information we know if their migratory routes and timing changes over the years or not, and how this relates to other subspecies and other factors like insect growth, temperature and other global changes. We make sure we use the most recent tags, at the moment these tags with a harness are only ± 2 grams which is $\pm 1-2\%$ of the body weight of a Red Knot and less than 1% of the body weight of a Bar-tailed Godwit. These percentages are all below the frequently used 5% of body weight. At the moment there is no suitable harness tag for Sanderling but once there is a tag developed which is lightweight enough we would use it on Sanderling as well. Each harness is fitted individually to make sure it fits perfectly in every season (e.g. during fattening up, migration, breeding). Before staff members tag a wild caught bird they practice first with making the harness and fitting it on a bird by tagging captive birds with a dummy tag at the institute. The same procedure is done when a new developed tag arrives. By practicing first we minimize the discomfort for the bird, because we know which method is the best. We will take additional care by checking up on these birds with a harness to make sure they are fine with the harness. When we see the bird is doing well it will be released. We consider 'doing well' when a bird accepts the harness by showing its natural/normal behaviour, no excessive preening, walking and standing balanced and not putting its bill through the harness. In case we have a doubt about the bird coping we keep this bird captive a bit longer (± 1 day). For example when it puts its bill through the harness, seems very stressed, not able to stand balanced with the weight on its back etc.. If the bird is still not at ease with the harness, we will remove it and release the bird with colour rings only. This happens in less than 5% of these tagged birds.

4. Releasing (100% of caught birds)

When all birds are done with the procedures of ringing, measuring (and optionally tagging and/or short behavioural essay) the birds will be released at their catching site. Usually the total time interval for a bird from getting caught in the net until releasing varies between 2 to 4 hours. Except the birds we keep ± 1 day longer because our doubt about them coping with the harness and/or tag.

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

The minimal number of birds depends on the research question. The more variables we use in our analysis the more birds we need. Besides that re-sighting a Red Knot takes more effort than re-sighting a Sanderling because Sanderling can be at relatively close distance and at places which are easier to access for humans. Therefore the amount of birds we need to ring every year varies between the three species, for each research question a separate power analysis will be made. Based on a previous power analysis and data of previous years we need to colour-ring 600 Red Knots, 300 Bar-tailed Godwits and 400 Sanderling on average per year for a stable amount of marked bird and reliable estimates of population dynamics.

B. De dieren

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

As mentioned before our main study species are Red Knots (*Calidris canutus*), Bar-tailed Godwits (*Limosa lapponica*), and Sanderling (*Calidris alba*). We have our focus on these species because each of them is specialized in their own way and form an excellent model for other migratory shorebird species. On the inter tidal mudflats of the Wadden Sea, Red Knots, for instance, forage on bivalves, whereas Bar-tailed Godwits forage on worms. In contrast, Sanderlings can also be found on the sandy beaches bordering the North Sea where they forage on small worms and shrimps. Together, all these specializations form an excellent model system that encompasses many aspects of migratory shorebirds and their use of different habitats.

We catch our birds (juveniles and/or adults) in the Wadden Sea area. During catching and other procedures at the catching location we do not make a distinction between males or females simply because their phenotypes are similar and both sexes are equally important to us. Nevertheless during analyzing the data later on we do want to know the sex of them, therefore we take a small blood sample which will be analysed. Usually we get our results on the sexes after a few months.

A minimum number of birds is needed to get enough re-sightings for making reliable estimations about survival and population sizes. The amount of birds we need and what we are able to catch is not a clearly fixed number. It depends on the species and on a variety of factors we are not able to control (e.g. amount of birds present at catching site, weather conditions etc.). Based upon earlier experiences we expect to catch approximately: 3000 Red Knots, 1500 Bar-tailed Godwits and 2000 Sanderling over the course of 5 years. These numbers include juveniles and adults. We consider this as realistic for enough re-sightings and answering our questions. Some of these birds will be equipped with a tag which is either glued or attached with a harness. In 12% of caught birds a tag will be glued, this is 360 Red Knots, 180 Bar-tailed Godwits and 240 Sanderling. Of the caught birds, 8% will be equipped with a tag with a harness this is 240 Red Knots and 120 Bar-tailed Godwits.

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:

Our research is a fundamental research about these birds species itself, and to be more specific not only the distribution and movements of these birds but the importance is also in the combination of movement ecology *together* with individual traits. We have chosen these species because together they form an excellent model for other birdspecies which live in the Wadden Sea or depend on the Wadden Sea. The species we have chosen each represent a food specialization (Red Knot: shellfish; Bar-tailed Godwit, worms; Sanderling, small crustaceans), all species together cover the whole range of food specializations. Besides their importance for their food specializations they each fly extremely long distances during migration. During their migration these birds rely on the Wadden Sea for refuelling and resting. This research cannot be conducted with other, more regular laboratory species because this research focusses on the behaviour of our target species and their interactions with the (changing) environment, and we want to gain specific knowledge about our target species, their individual traits and behaviour. We can use this information to gain more knowledge about the physiological changes and adjustments these birds make in response to their quickly changing environment due to climate change. This cannot be done with another species which is housed in a standard laboratory environment, that would not give a reliable outcome. Besides that these species can be held in captivity relatively easy. By conducting research in a controlled environment we can gain understanding about individual traits of a bird and afterwards release this bird back into the wild. By following this bird for many years in the wild we can compare this individual traits with its 'wild behaviour' and with other wild birds of the same species. With this information links could possibly be made between individual traits and (changes in) behaviour.

Since individual traits can only be measured by using the animal itself we have to use live animals. Ultimately, the information about (changing) individual traits and its movements in comparison to global/climate change can show us the importance of proper environmental management and policies

Besides that we do use alternatives as much as possible for example by using video recordings for training purposes. Before observers start with live observations they first practice with video recording of earlier studies. By doing this we avoid causing more stress and discomfort during the actual live observations.

Vermindering:

We always use the minimal number of birds to catch and equip with a tag. The big advantage of tags attached by means of a harness is that it lasts for several years and therefore provides us with data of multiple migratory tracks of only one individual this reduces the amount of birds.

Verfijning:

The method of catching depends on the target species we want to catch but we always choose the method which causes the least discomfort. We always try to avoid other species in our nets by checking the location, weather conditions, timing etc. In case we do encounter other species in our nets we check them on their wellbeing and if it has a ring. After this quick check we release them immediately. In case a bird has been ringed we check its ring, make a note and report this to the person or institute of interest.

During catching we always keep in mind how many birds we are able to measure, ring and release within a reasonable time (max 4 hours). If we already have a lot of birds in the first batch, we decide to close the nets and finish measuring/ringing/tagging these birds before re-opening the nets and start catching again (if necessary). In case we catch such a large number of birds which we cannot measure within a reasonable time, we will immediately release the surplus birds.

We only use state of the art GPS/PTT tags which are as light weight as possible and have a proposed expenditure of at least several years or even lifelong. Different tags require different methods of attaching. At the institute we have already several years of successful experience with tagging of birds by using different methods and we developed a full-body harness for these tags ourselves. This full-body harness fits perfectly for birds which strongly vary in their weight during the year, besides that each harness will be adjusted for the bird individually. We are aware that wearing a tag for the rest of the bird's life has an impact on the integrity of the bird. Nevertheless we choose not to use preformed breaking points in the harness. With these breaking points the harness could eventually fall off. We do not use this because the harness itself is part of the tag, the harness helps to send the signals better. In case we would apply breaking

points in the harness, the signal would be disturbed. The harness itself is made from metal which has been coated with a plastic layer. Eventhough we can not exactly say how long the harness will last, we think that after a few years the harness will break due to corrosion of the metal. Obviously we do hope it will not break and last at least several years. The most recent data shows us that these tags can at least send signals for 8 years. By following the selection of birds for several years we get information about their timing, patterns and routes of migration and how/if this changes over the years. We invest a lot of time in re-sightings (colourings) therefore birds which are equipped with a tag would be seen on a regular basis as well. Therefore we would notice if a bird carries a tag which is not functioning anymore. By our best knowledge we do not know any cases of this.

An earlier performed pilot test with the most recent 2gr. tag has shown us that the bird has completed its north- and southward migration with very accurate GPS points. Only birds that are considered as healthy, by checking their weight, plumage and general behaviour will be equipped. We always do a pilot test at the institute when there is a development on techniques or when a new tag arrives to make sure this can easily be applied in the field with the least discomfort.

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

We are aware that being caught in a net can be very stressful for a bird. Therefore we check the nets as much as possible to make sure that the birds are only in the net for a very short period. Every bird that is taken out of the net is checked quickly on their wellbeing. If there is any doubt about the birds health (which is naturally and not caused by the catching procedure) the bird will be released immediately and without ringing or measuring. In case a bird gets cramp in its legs or wings we keep it in captivity a bit longer and try to let him recover at our ringing station or bring him to our shorebird facilities at the institute. As soon as the bird has recovered, we will release it. This happens in less than 5% of the caught birds.

To minimise stress and fear we try to get the measuring, ringing, ultrasound etc. done as quickly as possible. While the birds are waiting they are kept in crates in a quiet and dark area. In these crates we cover the bottom with hemp fiber or sawdust which makes the crate less slippery and more hygienic for the birds. Before opening the crate to release the birds we let them adjust to the surrounding mudflat after which we open the crate and they can walk out of the crates on their own.

Before staff members tag a wild caught bird they practice first with making the harness and fitting it on a bird by tagging captive birds with a dummy tag at the institute. The same procedure is done when a new developed tag arrives. By practicing first we minimize the discomfort for the bird, because we know which method is the best. Occasionally we keep a bird captive a bit longer (± 1 day) in case we have a doubt about the bird coping to the tag and harness.

Only well experienced and qualified people are catching and handling the birds. Due to this experience the amount of wounded birds caused by catching or handling is very low (close to 1%).

After a few weeks the glued tags will fall off and end up in the environment. We do not have the ability to pick up these tags once they have fallen off because we are not able to find them. When the tags fall off the battery has run out of power and the tag will no longer send signals and is therefore unable to find. If there would be a possibility to built-in something which can still send a signal after the battery has died that would be perfect. For now that is not an option, the tag would get heavier and bigger which causes more discomfort for the bird. Such a thing should definitely be further developed. The total amount of waste from the glued tags that will end up in the environment annually will be:

- Red knot: 72 tags * 5 gram = 360 gr.
- Bar-tailed Godwit: 36 tags * 5 gram = 180 gr.
- Sanderling: 48 tags * 2 gram = 96 gr.

On average this would make a total of 156 tags per year with a total weight of 636 gr., this is equal to ± 4 mobile phones each year. Eventhough we understand and agree that it is not good to let this end up in the environment, there is no alternative available. The deviation of the total amount of glued tags over 5 years may differ from this example and is dependent on the amount of birds caught. Over the course of 5 years we use a maximum of in total 780 glued tags (360 Red knots, 180 Bar-tailed godwits, 240 Sanderling).

To conduct this research we have (to get) permission from the *Wet natuurbescherming* and handle according to the *Vogelrichtlijn* and *Habitatrichtlijn* because the Wadden sea is a Natura2000 area.

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.

N.v.t.

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.

A large part of this research is conducted at the biotoop of the birds. When we keep birds captive for a short period (hours or maximum 1 day) they will be housed in crates as described earlier in which the bottom is covered with hemp fiber or sawdust (see D. replacement, reduction, refinement). These crates will be placed in a quiet and dark area to keep the birds calm. Regularly well trained and qualified staff members check on these birds to make sure they are doing well.

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.

The chemicals of the sedatives/analgesia influence the biological clock, makes the skin biopsy useless and therefore has an influence on the results. Besides that the skin of a bird is not as sensitive as human skin, especially the part between the feathers. These reasons made us decide not to use any sedatives/analgesia.

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?

Birds are being caught from the wild and during their time in the nets or traps limited in their movements. After that they are held captive for the above procedures which causes a certain level of discomfort but always being released back into the wild afterwards.

The selection of birds that will be equipped with a tag has to get used to wearing it, at first this might cause moderate discomfort. After they are acclimatized they are able to behave like they would normally do and their discomfort will be mild.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

These wild birds are suddenly trapped in a net and therefore cannot move that much and are away from the rest of the flock. Then they are put in a box, transported and handled several times for measurements. This restriction in their movements and the handling time causes stress to the birds.

When birds are equipped with a tag they have to get used to the weight on their back. At first they will be unbalanced or walking backwards and trying to get rid of the tag. Usually the birds get used to this extra weight in a few minutes and birds will be standing

balanced. Besides that, in the first days birds might preen more around the harness for different reasons. Firstly preening might be caused by the harness because irritates them. By preening they adjust their feathers around the harness in such a way that there is no irritation. Secondly they might preen more because they have been handled longer than usual during weekly checks. The extra preening stops within a few days.

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

We are catching birds from the wild always by using the least invasive catching method depending on the target species. Besides the catching method we check the caught birds quickly on their wellbeing try to be done with the measurement as soon as possible, so that the birds can be released quickly. Only birds that seem fit enough for extra measurements such as a short behavioural essay or wearing a tag will be used for this. During the procedures all staff members will try to avoid causing extra stress to the bird by working quietly and relax (not being stressed themselves).

When birds are equipped with a tag, either by harness or glued, we keep a close look at them to see how they cope with it. The harness itself is adjusted for each individual separately to make it fit perfectly for each individual.

Since we do some similar procedures in the field and at the institute (ringing, tagging, measuring etc.) we keep a close eye on how the birds react to different methods and procedures. In case we see a problem in the field which might also occur at the institute we directly implement this at the institute (the same applies for the other way around).

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.

During the catching procedure a bird might get injured from the catching method. In the worst case, such as a broken wing, we have to euthanize the bird. Euthanization in the field will be done by cervical dislocation. There is always someone around who is able to do this in a correct way. By this we reduce the rate and duration of discomfort as much as possible.

We want to emphasize that the **chances for this to happen are very low (less than <<< 1%)**.

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

We want to emphasize that the chances for this to happen are very low (less than 1%).

K. Classificatie van ongerief

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

Birds will be caught from the wild, we consider this catching part as very stressful for a bird even though it lasts for a short period. Therefore we classify it as a moderate degree of discomfort. After catching all birds of the target species will be handled and ringed. This we classify as mild discomfort. Additionally some of the birds will participate in short behavioral essays. These essays cause mild discomfort because birds are held captive a bit longer. At last some birds will be tagged with either a glued tag or a tag with a harness. For both types of tags we consider the rate of discomfort as moderate in the first hours. After the bird is used to wearing the tag the rate of discomfort decreases to mild.

At maximum a bird encounters the following procedures: catching, handling/ringing, ultrasound measurement (Red Knot), short behavioral essays and tagging. The chances for a bird to go through all procedures is low, this happens in $\pm 4\%$ of the caught birds (see figure).

Overall we would classify this type of research with a moderate degree of discomfort.

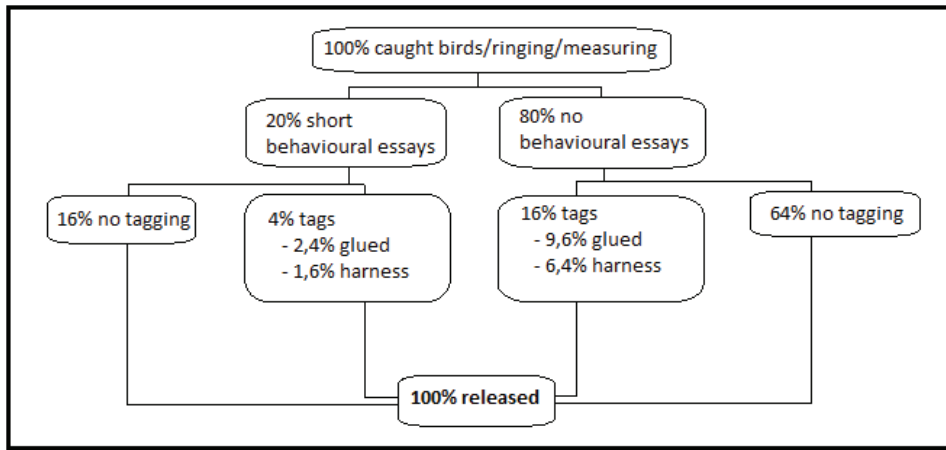


Figure 1 - The percentages shown in the figure are always the percentages from the first 100% caught birds which will all be ringed, measured and a small blood sample will be taken. As shown, only 4% of the caught birds will participate in all possible handlings and discomfort before it will be released again.

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



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.	80200	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	NIOZ Royal Netherlands Institute for Sea Research	
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>	3.4.4.2	Testing behavioural and physiological indicators of environmental change at the institute

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

For conducting research on behavioural and physiological responses to the environment it is not enough to conduct fieldresearch only. Therefore researchers from the institute bring birds which are caught from the wild to the specialized shorebird facilities at the institute, developed and built exactly for this purpose. In the experimental shorebird facility at the institute we can control and manipulate different environmental variations and see how birds respond. Responses could be things such as changes in behaviour, physiology, choices a bird makes, personality of a bird and/or understanding individual differences. Besides that we do pilots for developing new techniques. We want to make a link in the tested individuals between the natural situation and the laboratory. To recognize them in the field we release the captive birds with a unique colour ring combination and some birds additionally with a tag. This contributes to the interesting field of movement ecology and gives us knowledge about the use of habitat and migration.

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.

1. Catching

In the Netherlands birds will be caught mainly in the Wadden Sea area but for a complete understanding of the behaviour and physiology of different (sub-)species around the globe we catch birds in other areas and other countries as well (according to local legislation).

Dependent on the species, birds will be caught by using either walk-in traps, mist-, canon- or wilster nets. Birds will be taken out of the traps/nets as quickly as possible, put in crates suited for birds and transported to the temporary field station. This station is located near the catching site, transport of birds from the catching site to the field station takes approximately 15 minutes. Here birds get ringed and are measured on their individual traits (bill length, total head, wing, tarsus, tarsus-toe), breast- and wing-moult rates, age and weight and a small blood sample is taken for sexing.

In Red Knots we additionally measure the size of gizzard (stomach) and pectoral muscle. Where most measurements are taken with a ruler, the gizzard and pectoral muscle size is measured by means of the non-invasive ultrasound technology. This information gives us more details about the diet of a bird. Red Knots eat their prey whole and crush the shells in their gizzard. When a knot eats a lot of hard shelled

prey its gizzard becomes more muscular and therefore bigger than that of a knot which eats soft food or only small shells. Therefore the gizzard size tells us more about the diet of a bird and it allows us to make predictions on food availability. The size of the m. pectoralis tells us more about the flight behavior, during migration this muscle should be bigger. When this muscle is small in the time of year when you expect it to be big, than this bird might be in a bad condition. (Dekinga, A., Dietz, M.W., Koolhaas, A., Piersma, T., 2001). After these measurements birds will be transported to the institute and placed in our shorebird facility with a 'trainer'. This trainer bird is a more experienced bird which is already at the institute for at least a few months and could help the new birds adjusting to captivity. This trainer shows the new bird where to find food, not to fly every time the bird hears something etc.. Since we mostly have Red Knots in captivity, we also have a trainer for new Red Knots as well. For the other species it is less likely that we will have trainers of the same species but a Red Knot can be a trainer for Bar-tailed Godwits and Sanderling as well. It takes about 1 or 2 days before the new birds start eating from their new food source. The complete acclimatization period takes ± 2 weeks. After these two weeks birds do not start to fly every time when they hear a noise or when someone enters the aviary but only walk towards the back of the aviary. We know from earlier experience that birds are able to keep a stable weight after these two weeks of acclimatization. In general, keeping a stable weight tell us that a bird is doing well. If a bird does not get acclimatized for some reason we release this bird.

2. Experiments at the facilities of the institute

To gain understanding about how individual traits contribute to behavioural and physiological responses to environmental variations we conduct different types of experiments. Therefore birds will be kept in an controlled environment at the institute where they participate in different types of (non-)invasive experiments.

Non-invasive experiments are observations on the moult rate, behavior, foraging, food variations, ultrasound measurements and/or basal metabolic rate (BMR).

Some of these non-invasive experiments will be conducted during the housing routines, for example keeping track on their weight changes and moult rates. During the weekly cleaning activities we weigh and score every bird individually on their breast and (primary) wing moult. This gives us weekly descriptions on individual characteristics and change over time in these characteristics. Not only between individuals but also between species and subspecies. This whole cleaning procedure takes a few hours, during this birds are put in a crate suitable for birds and right before they will be put back in their aviary their moult and weight is checked. For each bird this scoring takes about 1 minute.

Behavioural experiments can be conducted when birds are in their housing aviaries. At the doors of every aviary is a window with one-way glass, therefore birds can be observed without disturbing them. At the institute we also have a big artificial mudflat facility (7x7 m.) "*The experimental shorebird facility*" which can be filled with seawater. In this arena we can observe birds on a variety of behaviours for example exploration or foraging behavior without further human disturbance.

Additionally with some of the birds (5%) we use an accelerometer for a detailed automatic registration on their behaviours. This accelerometer is a small device and will be either glued to the back of the bird or attached by a harness. When the device is glued in most cases it will fall off when the skin is renewed (± 2 weeks) or ultimately when the bird starts moulting. When it was attached by a harness it will be removed when measurements are done (± 7 days).

Another type of non-invasive experiments considers food variations. For years already we have experience with food variations in Red Knots and we know that they are able to change their gizzard size. Red Knots eat their prey whole, including the shell, and break this shell in their gizzard for further digestion. Breaking these shells can only be done when the gizzard is strong and big enough. From earlier experience we know we can manipulate this gizzard size by treating them with different types of food. When birds are fed with the soft food pellets the gizzard will be small because this type of food is easy to digest. When birds are fed with a type of food which is more difficult to digest due to a hard shell, like little mudsnails (*Peringia ulvae*), the gizzard muscle has to become stronger and therefore bigger. After the diet switch it takes about a week to see a difference in gizzard size. These gizzard sizes can be measured with non-invasive ultrasound technology. When birds are in a food experiment they will be switched to the little mudsnails for example during a period of several weeks (± 4 weeks) before they will switch back to soft pellet food which is the normal food. After being on soft pellet food again for several weeks (± 4 weeks) the diet switch schedule might be repeated.

For a selection of the birds their energy expenditure will be measured by means of basal metabolic rate (BMR). To conduct this the birds will be restricted from their food for 6 hours before testing. After these 6 hours the birds will be kept solitary in the BMR box for one night (± 12 hours). After the BMR birds will be checked on their wellbeing and placed back in their aviary.

With this information we can measure the individual responses to manipulations in environmental factors and see how (in)flexible birds are in their responses. In general this takes a few hours, 2-3 max.

Invasive experiments involves either taking a small skin biopt or blood sampling.

A skin biopt is taken from 10% of captive birds. These samples will be taken at a spot where the skin is very flexible/loose for example under the wing. Here the skin is lifted up a bit and with a sharp medical siccior a small biopt (± 1 mm.) is taken. From earlier experience we know that this procedure is very quick, easy and seems less invasive than blood sampling. The skin will recover very quickly and within a few days it is not possible to find the location where the biopt was taken. These skin samples will be used for in-vitro growing of fibroblast cultures. With these cultures experiments will be done on diurnal rhythms.

For gaining more understanding about the internal processes in a bird we take blood samples (*10% of captive birds*). With these blood samples we can analyse the levels of different hormones, RNA/DNA, isotopes and other blood related parameters over time. This

information can be compared to migration and/or breeding season for example. This gives us insight in the state of the body before, during and after a important and energy consuming period. We take blood samples from the brachial vein (wing), $\pm 80 \mu\text{l}$ per sample **with** a total of maximum 1% of bodyweight per month. Birds are placed back in their aviaries after one hour in general, the actual sampling or invasive procedure takes about one minute or less.

Training and Pilots

Besides the above experiments a few birds will be used for pilot tests, testing of a tag before release or training of (new) staff members to maintain their qualities and skills. Over the course of 5 years this will be ± 50 birds, mainly Red Knots. Since it will not always be the same birds that are used for training, one bird is used only once or maybe twice for training purposes. With these pilots we can develop new techniques which could ultimately reduce discomfort in future experiments, for example new in-vitro experiments might be developed.

3. Releasing

To combine the knowledge of the individual traits and behaviour of birds in a controlled environment with their behaviour and movements in their natural environment, we eventually release them.

Before releasing birds they will be prepared for living in the wild again. To make sure the bird is able to eat and digest the natural food, its diet will be switched to little mudsnails (*Peringia ulvae*) for at least two weeks. Feeding these little mudsnails makes the gizzard size become bigger again. With this bigger gizzard the bird is able to eat preys with either hard or soft shells. Once the birds are able to keep a stable and decent weight the birds are ready to be released.

A few days before releasing we check several possible locations and choose the one at which other birds from the same species occur. We release the birds here during low tide, therefore birds get several hours to eat and are able to join a flock before they have to fly to another location (hoogwater vluchtplaats (hvp)). Due to the colour rings we are able to recognize birds in the wild which have been in captivity. From earlier experience and re-sightings we know that birds survive very well in the wild after being in captivity for several years and behave normally.

There are two options for releasing;

- a. Without tag (*80% of birds*); the bird will be released with a metal ring and a unique combination of colour rings for individual recognition in later years. During the year researchers from the institute plan several expeditions and fieldwork trips to locations in the Netherlands and foreign countries for ring reading of 'our' birds. With this very valuable information we know when and where birds are and could have a general impression of their health by looking at their behaviour. Besides our own researchers we have a network of other researchers and enthusiast hobbyists who tell us when they have seen some of 'our' birds. Very often they supply us with a photo of the bird with its rings. This photo ensures us that the read combination is correct.
- b. With a tag (*20% of birds*); Besides the fact that it costs a lot of time to follow birds ourselves and do re-sightings, birds also go to locations which are simply not accessible for us. In these inaccessible areas would be a lot of missing data. This is where tags can help us following birds. These tags do not only give us information about the location of a bird but tells us also about when a bird flies somewhere, timing (besides the tag, this bird get the unique combination of colour-rings and a metal ring as well). The tag can be attached by the means of a harness or can be glued to the back of this bird. The type of tags which is used depends on the research question. Tags that send signals for a short period (weeks) will be glued to the back of the bird. This tag falls off when the skin is renewed or when the bird starts moulting. We know from earlier experience that after the first moulting season it is not possible to see whether or not this bird had a glued tag on its back.

For tags which send signals for several years, like GPS/PTT tags, we use a harness to attach this tag. These types of tags contain a small solar panel which recharges itself and is therefore able to keep sending signals for several years. With the GPS information of these birds we know more about where, when and howlong a bird stays at a certain location. This contributes greatly to the individual movements and movement ecology of the bird even at locations which are very hard to reach for humans.

These two sources of information, re-sightings and tags, give us the complete information for answering our questions.

In general captive birds will be released in the Netherlands. It is possible that a certain subspecies was caught in a foreign country to be sure it is the right subspecies. For example two subspecies from the Red Knot (*C.c. canutus* and *C.c. islandica*) both occur in the Dutch Wadden Sea at the same time. These two subspecies cannot be distinguished based on phenotype. After their stop in the Dutch Wadden Sea, each subspecies follows their own Northward migratory route. At these more Northern locations the right subspecies can be caught. These birds which were caught in more Northern locations can be released in the Netherlands at the right moment of the year when they naturally occur in the Wadden Sea. Besides the fact that releasing of our captive birds has a great value for our research, it also has our preference to release them because we know they can live for many years in the wild.

Exotic species will not be released in the Netherlands but held captive at the institute until they will be adopted by a zoo, sanctuary or exchanged with another research facility.

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

As usual in modern research on animals which should lead to publications in the peer-reviewed literature, we spent much attention on the sample size required to gain robust results whilst still keeping them as low as possible to reduce any degree of animal suffering and the taking birds from the wild, manage our own workloads and keep the work affordable. The exact number of birds will vary between studies. We will take earlier experiences into account, check literature, do a pilot test and carry out a power analysis for each particular study to estimate the required number of birds. All experiments will be checked by the animal welfare body of the institute. We do need newly caught birds for our research because birds participating in experiments at the institute might learn from their earlier experience in an experiment and therefore starting to behave differently. Therefore the overall trend is that birds will be participating in an experiment only a few times and then be released with colour-rings (and in some cases additionally with a tag). Re-sightings on these animals gives us a lot of very valuable information which can be compared to the experiments at the institute.

All animals will be caught from the wild and even though we try to catch in the optimal conditions there always are several factors which we cannot always control, such as weather conditions, presence of target species and simply if they get into the nets or not. If we cannot catch the required amount of birds for an experiment, then this experiment has to be delayed or an additional catching expedition has to be planned. With this extra catching expedition bird could be caught to reach the original required number.

B. De dieren

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

Our focus is on shorebirds, to be more precise the Red Knot (*Calidris canutus*), the Bar-tailed Godwit (*Limosa lapponica*), and the Sanderling (*Calidris alba*). These species form an excellent model for other migratory shorebird species because they are extreme specialists in their diet (Red Knots, shellfish; Bar-tailed Godwit, worms; Sanderling, small crustaceans). These three types of diets represents the possible range of diet preferences of birds in the Wadden Sea. These diets together with the extremely long migratory distances makes these birds an excellent model for other shorebirds species. Besides that a Red Knot copes very well with being in captivity and is flexible during diet manipulations therefore we mainly use Red Knots in captivity experiments. The origin of birds which will be brought to the institute is located along their migratory flyway. In earlier experiments we caught birds (juvenile and/or adults) in the Wadden Sea area, Mauretania, Poland, China, Australia and Alaska. When birds are caught some of them will be brought to the institute where we have a unique shorebird facility.

During catching and further experiments we do not make a distinction between male or female simply because their phenotypes are identical. We know their sex only after analyzing blood samples. The total number of birds at the institute varies and is dependent on the (sub)species. Based on the number of birds participating in experiments of the last 5 years we can make an estimation on the amount of birds for the next 5 years. Red Knots will be the major species present in the aviaries at the institute. The shorebird facilities at the institute have a limit on the total number of birds present. This depends on the species present and the requirements of a specific experiment. For example one aviary could house 10 Red Knots but only 5 Bar-tailed Godwits. This will be taken into account during the setup of the experiments. In total the aviaries can house a maximum of 270 Red Knots (27 aviaries with 10 birds per aviary) at the same time (After renovation). The composition of birds in their aviaries (sex, subspecies, age) depend on the requirements of the experiment or is at random. The statistical unit can be an individual or a group of birds, this depends on the type of experiment. For example exploration experiments will be conducted with only one bird at a time in a separate room and are independent. For each experiment a power analysis will be done to check how many birds need to participate in an experiment for statistical valid results. If a group of birds is not participating in an experiment they are housed according to the general housing conditions (See section F - Housing and Care).

We want to make a link between tested individual traits and their behaviour in the field, therefore we release the birds after a certain period at our facilities. We cannot always use the same birds for testing different individual traits because birds might learn from their earlier experiments and might behave differently than new caught birds. This means we have to catch new birds during the year as well. Keeping in mind the maximum of 270 Red Knots present at the institute and releasing some of them during the year means that we bring a maximum of 250 new Red Knots to the institute (or 1250 in total of 5 years).

For the other species we bring a maximum total of 150 Bar-tailed Godwits and 500 Sanderlings to the institute. Always taking the maximum capacity of the aviaries into account. If for example there will be brought Bar-tailed Godwits to the aviaries Red Knots have to be released. A good planning of experiments and catching birds is necessary.

It is possible to divide the captive birds roughly in different groups based upon the type of experiments:

- Group 1: Catching, invasive experiment, releasing + tag = 4 %
- Group 2: Catching, invasive experiment, releasing no tag = 16%
- Group 3: Catching, non-invasive experiment, releasing + tag = 16%
- Group 4: Catching, non-invasive experiment, releasing no tag = 64%

On average a bird is held captive for 1 or 2 years and then released. As shown above, most birds will participate in non-invasive behavioural experiments and will in the end be released without a tag.

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:

The experiments at our institute are designed to get knowledge of the animal itself and its individual traits and responses. Therefore replacement of the animals is not possible. Besides that, these particular species form an excellent model for many other species of shorebirds and migratory birds.

If possible, the training and updating of the skills of (new) staff members will be done with birds that passed away earlier or were euthanized due to sickness or an old age. This sickness is not caused by the experiment. Besides that we do not know the age of birds that were caught as adult, sometimes it happens that a bird dies without any signs. In these cases we assume that a bird has died due to an old age. By doing this we do not have to catch birds for training purposes such as ultrasound gizzard measurement, calibration of ultrasound measurements, scoring of breast- and wingmoult and/or biometry measurements.

Vermindering:

Obviously we try to get as much information with the least discomfort for each bird. One way to do this is by a good planning of experiments. By combining experiments the number of birds kept at the institute can be reduced. For example birds can be observed for two different types of behaviour at the same time, such as hierarchy of the group and personality of a bird. Behavioural studies such as hierarchy can be conducted while the bird is in its holding aviary without being disturbed by the observer. Besides that we reduce the rate of discomfort by combining experimental procedures on the animals with the weekly cleaning of the aviaries. The birds are caught from their aviaries anyway when the aviaries are cleaned, so these birds can be measured on their biometry or gizzard etc.. By doing this the birds will be caught only once from the aviary instead of twice.

Verfijning:

The method of use for catching in the field depends on the target species. For every method we use, we check the nets or traps as often as possible to make sure a bird experiences the least discomfort. Also when birds are taken out of the nets/traps we check them quickly on their wellbeing.

When birds are taken to the institute and participate in a food variation experiment we keep a close eye on them. From earlier experience we know that some birds might refuse to eat a new type of food for the first few days. We weigh these birds more often, every 1 or 2 days. For Red Knots we keep a lower limit of 90 grams, Bar-tailed Godwit 200 grams and Sanderling 35 grams. If the weight is below this point we can decide to move the birds to another aviary. Often a change in group composition is already enough to make them eating their new food source. Ultimately we could start force feeding them (this happens in << 1% of the birds).

Since 1994, i.e. over the last 23 years, our institute has successfully housed shorebirds and keeping them healthy. Generally we try to keep the birds as close to wild conditions as possible. The smooth surfaces of the floors and walls make the aviaries hygienic and easy to clean and disinfect. All birds are individually checked on their general health, weight and breast- and wingmoult. In case there is any doubt about the health of a bird, a small blood sample can be taken to check this on blood parameters and the presence of parasites.

To reduce disturbance we observe our birds through one-way glass from the hallway. By using this one-way glass the birds are not able to see us and will not be disturbed or behave differently. For the birds to express as much natural behaviour as possible, each aviary is enriched with an artificial mudflat and continuously running seawater which is pumped up directly from the Wadden Sea. Previous experience shows that the birds preen frequently into the small mudflat and that the seawater is a necessity for the birds to keep healthy feet and to keep themselves occupied. Besides that there is always ad libitum food in the aviaries, unless a food related experiment requires otherwise. There is natural diurnal rhythm and temperature in most of the aviaries, in a few aviaries this can be set. During normal housing conditions this rhythm is set to the local/natural range of temperature and light.

When a bird lives naturally in a mixed flock (different ages, sex, subspecies) then in captivity we keep them in mixed flocks as well unless the experiment requires otherwise. The amount of birds per aviary is adjusted to the species as mentioned before (for example one aviary could house 10 Red Knots but only 5 Bar-tailed Godwits).

After renovation there will be a facility to keep a specific group of birds (subspecies) completely separated from other captive birds.

When a bird is released with a tag we make sure we use state of the art tags. The most recent tags are 2gr. which is $\pm 1-2\%$ of the body weight of a Red Knot. These tags have a proposed expenditure of at least several years or even lifelong and are attached in such a way that a bird can vary in its weight before/after migration without disturbance. An earlier performed pilot test has shown us that the bird has completed its north- and southward migration with very accurate GPS points.

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.

For wild birds to be in captivity we assume that there is a certain degree of discomfort therefore we try to optimize their housing conditions (see section F - Accommodation and Care). For several years already the institute has shown to be successful in maintaining healthy shorebirds in their facilities and afterwards release them successful back into the wild. In later years we have resightings of birds that used to be captive birds, recognized by their colouring combination. They behave normally in their flock and show no signs of disturbed behaviour due to captivity. Therefore we think that being held in captivity for 1 or 2 years does not have an enormous or irreversible effect on the bird.

To minimize discomfort we try to disturb our birds as less as possible. Everytime when we have to catch birds for cleaning activities or an experiment we keep them in similar boxes and put these boxes in a dark area. We know from experience that a bird is more relaxed in a dark and quiet area.

When a bird experiences something new such as a diet switch, harness, glued tag, pilot test etc. we check this bird more often on its wellbeing. In case there is any doubt about its wellbeing we intervene by taking the harness/tag off placing the bird in another group composition or take him out of the experiment.

During catching we might find other species caught in our nets. If we encounter this we check the general health of the individual and check if it has a ring. If so we report this to the person or institute that has originally ringed this bird and release the bird as soon as possible, i.e. immediately. When we catch a bird which is in poor health, which is obviously not caused by catching method, we release him because we consider this birds as a part of the natural population with fit and less fit birds.

Only well trained and qualified staff members will handle the birds and perform experiments.

To conduct this research we have (have to get) permission from the *Wet natuurbescherming* (former F&F wet) and handle according to the *Vogelrichtlijn* and *Habitatrichtlijn* because the Wadden sea is a Natura2000 area.

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.

The general housing conditions are not according to the guidelines because there are no guidelines for our species. We always keep in mind the physiological and ecological needs of these birds and adjust their aviary as much as possible to reach this. With these adjustments we keep their discomfort as low as possible during the general housing, this is further described at section D Refinement.

For birds which are housed solitary for **several days**; they will be housed in their normal aviaries but with changed conditions such as temperature of air/water, food availability, food source etc. With these changes in environmental factors we can measure their responses. For birds that are kept solitary for only **a few hours** they will be put in a crate suitable for birds. This crate is either covered with hemp fiber or sawdust on the bottom or has many tiny holes in the bottom and sides to keep it hygienic and less slippery. These crates are put in a dark and quiet area to avoid stress as much as possible. During the actual BMR measurement (which is done during the inactive period of a bird) the bird is put in a small container in which the bottom is covered with foam rubber. The inside of this container is dark and the container is placed in a quiet area. After ± 12 hours the bird is taken out of the container, checked on its wellbeing and placed back in its original aviary.

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.

The chemicals of the sedatives/analgesia influence the biological clock, makes the skin biopsy useless and therefore has an influence on the results. Besides that the skin of a bird is not as sensitive as human skin, especially the part between the feathers. These reasons made us decide not to use any sedatives/analgesia.

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?

Catching of wild birds and keeping them in captivity.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

- When a bird is placed in an aviary for the first time it has to get used to being in a restricted space, new food source and new individuals. Besides that birds might feel the urge to fly long distances during migration seasons but they cannot fully express this behaviour, even though they are able to fly in their aviaries. During these periods birds might experience a bit more stress than usual.
- For a reliable measurement on the Basal Metabolic Rate (BMR) a bird should not be very active, stressed etc. therefore we keep birds in the BMR while they are in their resting period. Shorebirds have their resting periods based on the tides of the sea. During low tide they forage on the mudflat and during high tide they find a safe location (hvp) for resting. When birds are in captivity for a longer period (year(s)) it is hard to determine when it has its resting period because there are no tides in the aviary and we do not know how long their biological clock 'remembers' these tides.
- At all times we try to keep the birds in a social group, but for certain measurements, like BMR or behavioural experiments, we need to keep a bird solitary for a few hours or days. This is only necessary if we have to make sure a bird will not be influenced by flock members because we want to test individual responses/behaviour. As soon as the measurement is done the bird will be placed back with other birds. This procedure can be divided in two different approaches; 1. being solitary for a few hours and 2. Being solitary for maximum 7-10 days. Being solitary for a few hours will happen to ± 150 birds per year. For the second, being solitary for several days, will happen to $\pm 15-20$ birds per year.
- All birds that were caught will be released in the end. These birds need to adjust again to living in the wild with the danger of predators and searching for food.
- During captivity birds might get sick. This can be recognized when a bird shows a rapid decrease in weight, bad feather condition, lesions or wounds from which it will not recover, abnormal behaviour and/or a combination of these signs. Abnormal behaviour can be standing with puffed up feathers and/or standing (or laying) isolated from the flock.

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

1. New birds are being checked more regularly on their behaviour, weight and general wellbeing. A more experienced bird will be put in the cage together with the new birds as a trainer. The new birds can learn from the trainer where to find food and might make it easier to cope with the new situation. If it turns out that a bird is not able to cope with being in captivity (flying against wall for example), this bird will be released. Based upon earlier experiences, this happens in 1% of the birds.
2. When a newly caught bird is putted into the BMR we make sure he has a resting period at that time. We do that by checking when there is a high tide at the catching site. At high tide a shorebird is not able to find food on the mudflat and therefore has a obligatory resting period. When it considers a bird that has been in captivity for months already we put him in the BRM during the night assuming that he is not aware of the tides and will not be disturbed by people in the building and therefore experience less stress.
3. To reduce the discomfort of solitary housing we make these periods as short and infrequent as possible. For behavioural experiments birds are kept solitary in an aviary maximum for 7-10 days. They will experience this maximum 2 times per year. When birds are participating in experiments such as BMR measurements they have to be kept solitary for one night/resting period. A bird will experience such an event maximum 4 times per year.
4. Before birds are released their diet will be switched to little mudsnails (*Peringia ulvae*) for at least one week. Feeding these little mudsnails makes the gizzard become bigger again and the bird is able to eat and digest the natural food.
5. When a bird shows signs of illness we contact our local veterinarian to find a way for curing the disease. Besides the sick bird we check the other birds more closely on their health. Ultimately if the condition of the bird is so bad that he will not recover or experiences to much discomfort we euthanize this bird.

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.

Unfortunately some birds reach their humane endpoint due to an old age or sickness eventhough we consult our local veterinarian. A bird has reached its humane endpoint when it shows more discomfort than caused by the experiment. This can be observed in their general behaviour, heavy weight drops (<15% compared to the last weekly measuring, which is not normal for the time of year), laying alone, standing alone and/or with puffed up feathers or injuries of which we know it will not recover, then the humane endpoint is reached. The increased rate of discomfort will at maximum reach 'moderate' and will be short lasting (< 1 day). We euthanize birds with carbon dioxide. We expect, based upon earlier experience, the chances for this to happen very rare after the acclimatization period. Looking at numbers of the last 5 years, the average of birds reaching their humane endpoint is ±8%. We want to emphasize that the amount of birds reaching their humane endpoint due to catching or the experiment is very low, less than 0.5%.

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.

For every procedure separately the rate of discomfort is shown as below. At first expect a moderate rate of discomfort due to the catching, when the bird is taken to the institute and has been put in its aviary we expect the rate of discomfort decreasing to mild.

Procedure	Rate of discomfort	% of birds experience discomfort
Catching birds	Moderate	100%
Transport from catching site to aviaries	Mild	100%
Housing wild birds	Mild	100%
Catching for cleaning/health check	Mild	100%
Ultrasound measurements	Mild	80%
Food variations	Mild	80%
Behavioural experiments	Mild	80%
Solitary housing (7-10 days)	Mild	7%
Blood sampling	Mild	10%

Biopsy	Mild	10%
Pilot testing	Mild	2%
Training (new) staff members	Mild	2%
Basal metabolic rate (BMR)	Mild	50%
Tagging	Mild	20%
Consequences for releasing	Mild	100%

Overall Overall every bird will experience a **moderate** degree of discomfort since every bird is being caught from the wild.

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

9. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: 28-04-2017, 06-06-2017
- Datum antwoord: 25-05-2017, 29-06-2017

- Datum: 28-04-2017
- Datum antwoord: 25-05-2017

De gestelde vragen betroffen:

- Onderscheid tussen directe en uiteindelijke doelen
- Beschrijving haalbaarheid en samenhang van de doelstellingen
- Nadere onderbouwing wetenschappelijk belang
- Onderbouwing gebruik verschillende soorten
- Bredere context van het onderzoek (experimenten die buiten de kaders van de Wod vallen)
- Publieksinformatie
- Situatie niet in Nederland gevangen dieren aan eind experiment.
- Relatie doelstellingen en experimenten
- Herleidbaarheid verschillend ongerief bij verschillende vangmethoden
- Herleidbaarheid experimenten (meetparameters) naar doelstellingen
- Onderbouwing van keuze voor verschillende type zenders
- Beschrijving experimenten (experimental design) en de keuzes hierbij voor de verschillende experimenten
- Onderbouwing aantallen dieren
- Gewicht van de zender ten opzichte van het gewicht van de vogel voor de verschillende soorten
- Herleidbaarheid van de ongerief classificaties
- Toepassen van lokaal analgesie
- Mogelijkheden voor toepassing 3V alternatieven
- Beschrijving/toepassen van humane eindpunten
- Conditie rond uitzetten van vogels na verblijf op instituut
- Aanbrengen van pootringen
- Acclimatisatieperiode voor vogels in quarantaine
- Taalgebruik in de NTS

Verstreckte antwoorden:

- De antwoorden waren aanleiding voor nadere toelichting/aanvullende vragen

Correspondentie (2^e ronde)

- Datum: 06-06-2017
- Datum antwoord: 29-06-2017

De gestelde vragen betroffen:

- Beschrijving uitvoering experimenten in het veld
- Belasting van het milieu met afgevallen zenders
- Al of niet afvallen van de tuigjes
- Onderbouwing van de keuze van de soorten

- Toepassen van humane eindpunten (in het bijzonder in het veld)
- Herleidbaarheid van de ongeriefinschattingen
- Situatie niet in Nederland gevangen vogels aan eind experiment.
- (Statistische) onderbouwing experimenten
- Beschrijving huisvesting
- Formulering humane eindpunten

Verstreckte antwoorden:

- Alle vragen en opmerkingen zijn naar tevredenheid beantwoord en verwerkt in de bijgestelde projectaanvraag

10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC): NVT

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

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

C. Beoordeling (inhoud)

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

Deze aanvraag is onderdeel van een al langlopende onderzoeklijn en heeft een concrete, goed afgebakende doelstelling en kan getypeerd worden als een project. Het betreft onderzoek waarbij onderzocht wordt hoe 3 in het wild voorkomende soorten steltlopers met elk een verschillende leefwijze en voedselkeuze, omgaan met de snelle veranderingen in hun (deels gezamenlijke) biotoop. Omdat het in alle gevallen trekvogels betreft biedt dit onderzoek inzicht in de consequenties van de veranderingen op verschillende locaties (van de Arctische gebieden via de Waddenzee tot de tropen). De 3 soorten hebben ecologische verschillende eigenschappen, resultaten met de verschillende soorten zijn daarmee aanvullend aan elkaar.

Het onderzoek dient primair een wetenschappelijk belang, maar geeft ook inzicht in de invloed van de vaak door de mens geïnduceerde, milieu veranderingen en daarmee in de noodzaak/het belang/de mogelijkheden voor het beheer van de leefgebieden van de 3 soorten in dit project maar ook van andere gebieden en andere soorten.

Er is binnen de aangegeven doelstellingen, een hechte wederzijdse relatie tussen de experimenten/metingen in het veld en de experimenten/metingen in laboratorium. Deze hechte interactie is er ook met de onderdelen van het onderzoek die buiten de kaders van de Wod en daarmee dus ook buiten dit project vallen.

Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor en door de uitgebreide ervaring van de onderzoeksgroep met de te gebruiken modellen is het ook duidelijk met welk ongerief individuele dieren zullen worden geconfronteerd. De commissie is daarom van mening dat het project voldoende samenhang vertoont en 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 Flora- en faunawet). Voor zover de DEC weet is er geen "tegenstrijdige" wetgeving die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan.
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 in de aanvraag aangekruiste doelcategoriën zijn in overeenstemming met 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 uiteindelijke doel van dit onderzoek is het verkrijgen van fundamenteel wetenschappelijke kennis over hoe individuele dieren en populaties reageren op veranderingen in hun omgeving en wat hun natuurlijke grenzen en aanpassingsvermogen hierbij zijn. Belangrijke onderdelen hiervan zijn het bepalen van fysiologische en gedragsparameters van dieren in hun natuurlijke omgeving en in experimenteel gecontroleerde omgevingen op het instituut. Een groot deel van de handelingen in het kader van dit onderzoek valt buiten de kaders van de Wod, een gedeelte van de handelingen zijn vergunningplichtig. Deze laatste vormen de basis van deze projectaanvraag.

De kennis verkregen met dit onderzoek kan toegepast worden bij het opstellen van beheersmaatregelen van de veelal door menselijk ingrijpen bedreigde leefgebieden van de vogels, op verschillende locaties van de trekroutes.

De onder dit project uitgevoerde experimenten resulteren in een aanvulling en uitbreiding van de dataset die er de afgelopen decennia al in het kader van deze onderzoekslijn is verzameld. Voor het kunnen bepalen van lange termijn effecten is deze werkwijze essentieel. Omdat het in alle drie de gevallen kustvogels betreft die leven in open gebieden, is bijvoorbeeld het foerageren goed te observeren. Veranderingen in beschikbare prooidieren en in voedselkeuze als gevolg van veranderingen in het milieu zijn dan ook goed te meten. Dit gebeurt ook in het kader van het brede onderzoeksprogramma.

De directe doelen/vragen van dit project zijn:

1. In hoeverre beïnvloedt de 'personality' van een dier zijn reactie op veranderingen in zijn omgeving?
2. In hoeverre kan deze reactie worden beïnvloed door veranderingen aan te brengen in de fysiologische status van een vogel?
3. Hoe reageren de vogels op kunstmatig aangebrachte veranderingen in hun omgeving?
4. Het kwantificeren van veranderingen in fysiologie en gedrag op veranderingen in controleerbare omgevingsomstandigheden.
5. Het volgen van dieren in het wild. In hoeverre worden hun bewegingen (bijvoorbeeld het moment van de lente trek) bepaald door factoren in hun natuurlijke omgeving (bijvoorbeeld door de opwarming van de Arctische gebieden)? Tot nu toe werd dit vooral gedaan door dieren te voorzien van individuele kleurringen. Door het beschikbaar komen van kleine GPS loggers kunnen deze bewegingen veel nauwkeuriger worden bepaald.
6. Het ontwikkelen van nieuwe testen en nieuwe meetparameters die een nauwkeurigere beschrijving geven van de fysiologische en interne eigenschappen van een dier.

Er is een hechte directe en reële relatie tussen het directe en het uiteindelijke doel.

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

De belangrijkste belanghebbenden zijn de proefdieren, de onderzoeker die de vergunning heeft aangevraagd, het onderzoeksveld en het milieu.

Voor de proefdieren geldt dat hun welzijn en integriteit worden

aangetast. De in gevangenschap gehouden dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en in mindere mate pijn ondergaan.

Uiteindelijk zullen alle dieren na afloop van het laboratorium-onderzoek worden vrijgelaten met een reële kans op een verder normaal natuurlijk leven. Een deel van de op het laboratorium gehouden dieren en een deel van de in het wild gevangen dieren worden uitgerust met een GPS logger.

De dieren hebben er belang bij van deze omstandigheden gevrijwaard te blijven.

Voor de onderzoekers geldt dat het publiceren van belangrijke nieuwe wetenschappelijke inzichten resulteert in een goede wetenschappelijke reputatie, hetgeen vaak de sleutel is voor het verkrijgen van nieuwe onderzoeksmiddelen en -mogelijkheden. Dit kan door de onderzoeker zelf 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. Het gaat uiteindelijk om de vraag of dit onderzoek belangrijke wetenschappelijke en maatschappelijke doelen dient.

Voor het betreffende onderzoeksveld is dit onderzoek van belang, omdat het belangrijke nieuwe inzichten kan opleveren over de mogelijkheden van dieren om zich aan te passen aan veranderingen in hun omgeving en de mechanismen die daaraan ten grondslag liggen. Deze kennis is essentieel voor het opstellen van wetenschappelijk onderbouwde beheersmaatregelen van wereldwijd veelal door menselijk ingrijpen bedreigde natuurgebieden. Dit is van groot belang voor de samenleving.

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

De commissie is van oordeel dat er ten gevolge van de in dit project beschreven dierproeven geen sprake is substantiële negatieve milieueffecten. De aanvrager heeft inzicht gegeven in het maximaal aantal afgevallen zenders die uiteindelijk in het milieu zullen belanden.

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*).
De aanvrager heeft een wereldwijd erkende kennis en deskundigheid en ruime ervaring met het uitvoeren van dit type dierproeven. Voor

nieuwe facetten in dit onderzoek worden eerst gecontroleerde pilotexperimenten uitgevoerd. De commissie is ervan overtuigd dat de ervaring en expertise bij de aanvragende instantie er toe zal leiden dat de doelstelling haalbaar is, dat er zorgvuldig met de proefdieren gewerkt zal worden en dat er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden.

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 commissie is van oordeel dat het project goed is opgezet, 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 in het kader van het project. De commissie is ervan overtuigd dat de doelstellingen van dit project haalbaar zijn.

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*).**

Het betreft onderzoek met dieren in en uit het wild. Het gebruik van deze dieren zowel in het veld als in het laboratorium is voldoende wetenschappelijk onderbouwd. De beoogde doelen kunnen niet worden verkregen met dieren die speciaal voor dierproeven zijn gefokt.

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 instelling is wereldwijd erkend om het succesvol huisvesten van verschillende soorten steltlopers. Voor de betreffende soorten zijn in de bijlage II van de Richtlijn 2010/63/EU geen gedetailleerde huisvestingeisen opgenomen. De verblijven zijn aangepast om optimaal tegemoet te komen aan fysiologische en ethologische behoeften van de betreffende dieren. In het kader van een aantal experimenten zullen dieren gedurende enkele dagen solitair worden gehuisvest. Dit gebeurt eigenlijk altijd in dezelfde verblijven. Deze afwijkende huisvesting is voldoende wetenschappelijk onderbouwd. Er is bij de instelling al uitgebreide ervaring met dergelijke korte solitaire huisvesting. Dit heeft nog nooit aanleiding gegeven tot aanvullend ongerief.

Het is aangetoond dat onder de huisvestingsomstandigheden bij deze instelling vogels vele jaren gehouden kunnen worden en na een uitwenperiode daarna in staat zijn weer onderdeel te worden van een natuurlijke populatie met ook een natuurlijke levensverwachting. De verblijven voor de dieren in quarantaine zijn dezelfde als die voor de standaardhuisvesting.

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).**

Er zullen in het kader van dit project van de drie aangegeven soorten samen maximaal 6500 dieren worden gevangen. Dit is een subset van het aantal dieren dat toch al gevangen, gemeten en geringd wordt (handelingen die buiten het toetsingsbereik van de Wod vallen).

Al deze 6500 dieren zullen uitgerust worden met een of meerdere pootringen en er zal een klein bloedmonster genomen worden en/of een huidmonster en/of een veer worden getrokken. Voor 64% van de dieren is dit de enige interventie (gering ongerief). 16% van de dieren zal uitgerust worden met een zender (10% met een radiotag (gering ongerief) en 6% met een GPS logger met een tuigje (kortdurend matig ongerief).

20% van de dieren zal participeren in gedragstesten (gering ongerief), 4% hiervan zal daarna uitgerust worden met een zender (2.5% met een radiotag (gering ongerief) en 1.5% met een GPS logger met een tuigje (kortdurend matig ongerief). Een zeer klein percentage van de dieren zal geconfronteerd worden met matig ongerief ten gevolge van het oplopen van trauma door ongelukken. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het instituut heeft al vele jaren ervaring met dit onderzoek. Deze ervaringen ondersteunen deze inschattingen.

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 de dieren wordt aangetast door het instrumentele gebruik in dierproeven. Een deel van de dieren zal enige tijd uit hun natuurlijke milieu worden gehaald en gehuisvest worden in het instituut. Een deel van de dieren wordt voor het weer uitzetten in het biotoop uitgerust met een radiotag (geplakt op de veren) of een GPS logger (met een tuigje aan het dier is bevestigd). De dieren zullen enige tijd nodig hebben om aan de aanwezigheid van deze zender te wennen. Een klein deel van de dieren die in het buitenland worden gevangen, en die de Waddenzee niet als natuurlijk biotoop gebruiken, kunnen vanwege onder meer infectie risico's niet meer in hun oorspronkelijke biotoop worden uitgezet. Deze zullen in een permanente opvang buiten de instelling worden gehuisvest. Het is de ervaring dat de dieren al of niet uitgerust met een zender/logger die direct na het vangen weer losgelaten worden maar ook de dieren die na afloop van de experimenten op het instituut via een uitwentraject weer losgelaten worden, direct weer onderdeel zijn van een natuurlijke populatie.

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).*

De criteria voor humane eindpunten zijn primair gericht op het voorkomen van meer dan het ongerief dat ten gevolge van het vangen en de experimenten verwacht zou mogen worden. Er is een zeer kleine kans dat dieren bij het vangen en/of de vervolghandelingen trauma oplopen. Ook in dit geval zal onnodig ongerief worden voorkomen door of het dier direct te doden of het gedurende enige tijd in gevangenschap te huisvesten totdat hij weer in staat is uitgezet te worden. De commissie deelt de inschattingen die hiertoe gemaakt zijn en is van mening dat adequate humane eindpunten zijn geformuleerd die meer dan matig ongerief zullen voorkomen.

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).*

Voor het bestuderen van de reactie van wilde dieren op veranderingen in hun natuurlijke omgeving is het gebruik van in het wild gevangen dieren en onderzoek in het veld onvermijdelijk. Vanwege de extrapolatie naar de situatie in het veld dienen de gecontroleerde laboratorium experimenten ook met dezelfde (in het wild gevangen)

vogels te worden uitgevoerd. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn.

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).**

Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat. De onderzoekers hanteren een goede strategie om ervoor te zorgen dat er met het kleinst mogelijke aantal dieren wordt gewerkt waarmee nog een wetenschappelijk betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Door gebruik te maken van de meest geavanceerde zenders met een lange levensduur kan veel informatie worden verkregen van een beperkt aantal vogels. Hierdoor hoeven er minder vogels te worden gevangen om uitgerust te worden met een zender/logger. Door de stapsgewijze aanpak wordt onnodig gebruik van proefdieren voorkomen.

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).**

Het project is in overeenstemming met de vereiste van verfijning van dierproeven. De vangprocedures zijn erop gericht om de bijvangst zo veel mogelijk te reduceren. Er wordt gebruik gemaakt van de meest geavanceerde (en dus ook lichtste) zenders om de doelstellingen te kunnen bereiken. Na het aanbrengen van de zender worden de dieren eerst nog enige tijd geobserveerd. Als blijkt dat het dier niet met de aanwezigheid van een zender/logger om kan gaan, wordt deze verwijderd. Alle gezenderde vogels worden ook uitgerust met kleurringen. Er wordt zeer veel tijd en moeite gestoken om de kleurringen na vrijlating in het veld regelmatig af te lezen (ook in andere gebieden van de trekroutes). Dat betekent dat er informatie beschikbaar komt over hoe de dieren omgaan met de zenders. Deze informatie wordt gebruikt bij de opzet en uitvoering van de vervollexperimenten. De DEC is er van overtuigd dat de beschreven proefopzet de meest verfijnde is en dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.

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.
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*).
De aanvrager zal in het project gebruik maken van zowel mannelijke als vrouwelijke dieren. Dit wordt vooral veroorzaakt doordat mannelijke dieren niet te onderscheiden zijn van vrouwelijke dieren. Bij het bepalen van de groepsgroottes wordt ervan uitgegaan dat er in de gemeten parameters geen verschillen zullen zijn tussen mannelijke en vrouwelijke dieren. Bij de groepsgroottes spelen sekse verschillen (behalve voor experimenten die zich specifiek hierop richten) geen rol. De commissie beschouwt dit als afdoende.
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 vermeldt 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 dieren zullen nooit in het kader van het project gedood worden. De gebruikte dodingsmethode in geval van het bereiken van de humane eindpunten staat vermeld in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU.
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.

Er worden in deze projectaanvraag geen landbouwhuisdieren, honden, katten of niet-humane primaten gedood om niet-wetenschappelijke redenen.

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 is begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

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

Rechtvaardigt het belang van de doelstelling van het project de aantasting van de integriteit en het ongerief dat de dieren wordt aangedaan, en is tegemoet gekomen aan alle zorgvuldigheidseisen (3V's)?

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).

Het merendeel van de proefdieren ervaart een aantasting van het welzijn en de integriteit. Een klein deel van de dieren zal geconfronteerd worden met kortdurend matig ongerief. Voor de overige dieren is het ongerief licht. Een heel klein deel van de dieren zal niet meer kunnen worden uitgezet. De doelstellingen kunnen niet zonder gebruik van wilde dieren worden behaald. De onderzoekers doen al het mogelijke om het lijden van de dieren en het aantal dieren te beperken.

Dit onderzoek kan belangrijke nieuwe wetenschappelijke inzichten opleveren over hoe dieren in het wild omgaan met veranderingen in hun omgeving en wat hun strategieën en aanpassingsvermogen daar bij zijn. De DEC kent daar veel gewicht aan toe mede omdat het veelal door mens geïnduceerde veranderingen zijn. De uitkomsten uit dit onderzoek kunnen toegepast worden bij het opstellen van beheersmaatregelen van wereldwijd veelal door menselijk ingrijpen bedreigde natuurgebieden. In het project zijn voorbeelden uit het verleden hiervan opgenomen. Het adequaat beschermen van kwetsbare natuurgebieden, op basis van wetenschappelijke kennis en informatie, dient een groot maatschappelijk belang.

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 overtuigd van het belang van de directe en uiteindelijke doelstellingen. Uiteindelijk kunnen deze bijdragen aan nieuwe wetenschappelijke inzichten over hoe dieren (kunnen) omgaan met veranderingen in hun omgeving.

De DEC is van mening dat de belangen van de wetenschap en het beschikbaar komen van wetenschappelijk onderbouwde beheersplannen voor een groot aantal kwetsbare natuurgebieden wereldwijd voldoende zwaar wegen om het schaden van de belangen van de proefdieren (om gevrijwaard te blijven van een aantasting van hun welzijn en integriteit) te rechtvaardigen. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager. De DEC is van mening dat het project goed is opgezet, en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn, dat het doel niet met minder dieren behaald kan worden, dat de gebruikte aanpak de meest verfijnde is en dat maximaal voorkomen wordt dat mens, dier en het milieu onbedoelde negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven.

De DEC is van oordeel dat het hier boven geschetste belang de onvermijdelijke nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren, in de vorm van aantasting van integriteit, angst, pijn of stress, rechtvaardigt. Aan de eis dat het belang van de experimenten op dient te wegen tegen het ongerief dat de dieren wordt berokkend en de aantasting van hun integriteit, is voldaan.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

- X 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, specificeer het minderheidsstandpunt op het niveau van verschillende belanghebbenden en de waarden die in het geding zijn (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.A; zie bijlage I voor voorbeeld*).

Het uitgebrachte advies is unaniem, 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 zijn geen knelpunten of dilemma's geconstateerd - zowel binnen als buiten de context van het project - die de verantwoordelijkheid en competentie van de DEC overstijgen.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Kon. Ned. Inst. Voor Onderzoek der Zee (NIOZ)

[Redacted]

Postbus 59
1790 AB DEN BURG



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
AVD8020020171505

Bijlagen

2

Datum 5 juli 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [Redacted]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 4 juli 2017. Het gaat om uw project "Shorebirds in a rapidly changing world:gaining mechanistic understanding of the behavioural, physiological, and population-level responses of shorebirds to global change ". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD8020020171505. 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:

5 juli 2017

Aanvraagnummer:

AVD8020020171505

Datum:
5 juli 2017
Aanvraagnummer:
AVD8020020171505

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 80200
Naam instelling of organisatie: Kon. Ned. Inst. Voor Onderzoek der Zee (NIOZ)
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 41240385
Straat en huisnummer: Landsdiep 4
Postbus: 59
Postcode en plaats: 1790 AB DEN BURG
IBAN: NL69ABNA0642374252
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: St. NIOZ

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Datum:
5 juli 2017
Aanvraagnummer:
AVD8020020171505

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

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

Over uw aanvraag

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

Over uw project

Geplande startdatum: 22 juli 2017
Geplande einddatum: 1 augustus 2022
Titel project: Shorebirds in a rapidly changing world: gaining mechanistic understanding of the behavioural, physiological, and population-level responses of shorebirds to global change
Titel niet-technische samenvatting: Steltlopers in een snel veranderende wereld: veranderingen in gedrag, fysiologie en populaties op wereldniveau
Naam DEC: [REDACTED]
Postadres DEC: [REDACTED]
E-mailadres DEC: [REDACTED]

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:

Datum:

[REDACTED]
't Horntje

4 juli 2017

Datum:

5 juli 2017

Aanvraagnummer:

AVD8020020171505



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Kon. Ned. Inst. Voor Onderzoek der Zee (NIOZ)

Postbus 59
1790 AB DEN BURG



**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
AVD8020020171505

Bijlagen

2

Datum 5 juli 2017

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 5 juli 2017

Vervaldatum: 4 augustus 2017

Factuurnummer: 171505

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD8020020171505	€ 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.

Van: Info-zbo [mailto:info@zbo-ccd.nl]

Verzonden: maandag 10 juli 2017 9:20

Aan: ██████████

Onderwerp: aanvullend advies gevraagd bij aanvraag AVD8020020171505

Geachte leden van ██████████,

Bij de CCD is een aanvraag tot projectvergunning ingediend waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Voor wat betreft de ongeriefclassificatie en dieraantallen zijn er verschillen tussen het DEC advies en de projectaanvraag en daarom willen wij u vragen uw advies aan te vullen. Blijft uw ethische afweging/ advies aan de CCD ongewijzigd wanneer de afweging wordt gemaakt over de informatie die in de projectaanvraag staat beschreven?

De dieraantallen: onder C11 wordt beschreven dat er maximaal n=6500 dieren worden gevangen. Dit zijn de dieren in bijlage 3.4.4.1, voor bijlage 3.4.4.2 worden nog eens n=1900 dieren gevangen. (Aanvrager beschrijft in de NTS zelfs n=4500 dieren voor bijlage 3.4.4.2, maar wij vragen hier nog een correctie voor).

Onder C11 en D2 beschrijft u dat het overgrote deel van de dieren licht ongerief zal ondervinden en een klein deel van de dieren kortdurend matig ongerief. De aanvrager beschrijft in de bijlagen dierproeven dat het cumulatief ongerief (inclusief ongerief ten gevolge van het vangen) voor alle dieren matig zal zijn.

Met vriendelijke groet, ██████████

Namens **Centrale Commissie Dierproeven**

www.centralecommissiedierproeven.nl

.....

Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag

.....

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl (let op: nieuw emailadres!)

Geachte [REDACTED]

Allereerst excuses voor de onduidelijkheden en discrepanties tussen de projectaanvraag en het advies. Het betreft in alle gevallen onzorgvuldigheden en niet geheel duidelijke omschrijvingen bij de vertaling van de gegevens uit het project naar de informatie in het advies.

Er is een bijgestelde gecorrigeerde versie van het advies meegestuurd. De bijstellingen bij de vragen C11 en D2 zijn hieronder, in bold rood aangegeven.

Bij de CCD is een aanvraag tot projectvergunning ingediend waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Voor wat betreft de ongeriefclassificatie en dieraantallen zijn er verschillen tussen het DEC advies en de projectaanvraag en daarom willen wij u vragen uw advies aan te vullen. Blijft uw ethische afweging/ advies aan de CCD ongewijzigd wanneer de afweging wordt gemaakt over de informatie die in de projectaanvraag staat beschreven?

De ethische afweging is gebaseerd op de gegevens in het project en niet op de gegevens in het advies. Het advies aan de CCD blijft dan ook ongewijzigd.

De dieraantallen: onder C11 wordt beschreven dat er maximaal n=6500 dieren worden gevangen. Dit zijn de dieren in bijlage 3.4.4.1, voor bijlage 3.4.4.2 worden nog eens n=1900 dieren gevangen. (Aanvrager beschrijft in de NTS zelfs n=4500 dieren voor bijlage 3.4.4.2, maar wij vragen hier nog een correctie voor).

Dit klopt. Waarschijnlijk staan er in de tabel in de NTS nog de aantallen dieren uit een eerdere versie. De commissie is in haar afweging uitgegaan van de volgende aantallen:

Soort	In het veld (appendix 1)	Op het instituut (appendix 2)
Kanoetstrandloper (<i>Calidris canutus</i>)	3.000	1.250
Rosse grutto (<i>Limosa lapponica</i>)	1.500	150
Drieteenstrandloper (<i>Calidris alba</i>)	2.000	500

Onder C11 en D2 beschrijft u dat het overgrote deel van de dieren licht ongerief zal ondervinden en een klein deel van de dieren kortdurend matig ongerief. De aanvrager beschrijft in de bijlagen dierproeven dat het cumulatief ongerief (inclusief ongerief ten gevolge van het vangen) voor alle dieren matig zal zijn.

Alle vogels worden in het wild gevangen. Het ongerief tengevolge van het vangen is voor alle vogels matig. Omdat het ongerief bij de vervolghandelingen hier geen aanleiding toe geeft komt de cumulatieve ongerief classificatie voor alle vogels dan ook uit op matig. In het antwoord op vraag C11 hebben wij willen aangeven wat het ongerief tengevolge van de vervolghandelingen is om duidelijk te maken dat de commissie in haar afweging er vanuit gegaan is dat het feitelijke ongerief niet voor alle vogels gelijk is.

Hierbij zijn twee zaken misgegaan. Het cumulatieve ongerief (voor alle vogels matig) is niet expliciet aangegeven en de inschattingen en aantallen uit appendix 2 zijn niet opgenomen.

Bijgesteld antwoord C11

Er zullen in het kader van dit project van de drie aangegeven soorten samen maximaal 6500 **(appendix 1) en 1900 (appendix 2)** dieren worden gevangen. Dit is een subset van het aantal dieren dat **totaal** gevangen, gemeten en geringd wordt (handelingen die buiten het toetsingsbereik van de Wod vallen).

Al deze **8400** dieren zullen **in het wild worden gevangen (matig ongerief) en** worden uitgerust worden met één of meerdere pootringen en er zal een klein bloedmonster genomen worden en/of een huidmonster en/of een veer worden getrokken. Voor **50%** van de dieren is dit de enige interventie (licht ongerief). **13%** van de dieren zal uitgerust worden met een zender (**8 %** met een radiotag (**licht** ongerief) en **5%** met een GPS logger met een tuigje (kortdurend matig ongerief).

30% van de dieren zal participeren in gedragstesten en andere testen (**licht** ongerief), **7%** hiervan zal daarna uitgerust worden met een zender (**6%** met een radiotag (**licht** ongerief) en **1%** met een GPS logger met een tuigje (kortdurend matig ongerief). Een zeer klein percentage van de dieren (**<< 1%**) zal geconfronteerd worden met matig ongerief ten gevolge van het oplopen van trauma door ongelukken. Het cumulatieve ongerief (**matig voor alle dieren**) als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het instituut heeft al vele jaren ervaring met dit onderzoek. Deze ervaringen ondersteunen deze inschattingen.

Bijgestelde deel van antwoord D2

Alle proefdieren **worden geconfronteerd** met aantasting van hun integriteit **en met geclassificeerd matig ongerief. Dit wordt in het overgrote deel van de vogels veroorzaakt door het matige ongerief tengevolge van het vangen.** Een klein deel van de dieren zal **ten gevolge van de vervolghandelingen** geconfronteerd worden met kortdurend matig ongerief. Voor de overige dieren is het ongerief **ten gevolge van de vervolghandelingen** licht.

In de hoop dat een en ander nu duidelijk is en dat het vergunningverleningstraject nu weer snel opgestart kan worden.

14 juli 2016

9. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: 28-04-2017, 06-06-2017
- Datum antwoord: 25-05-2017, 29-06-2017

- Datum: 28-04-2017
- Datum antwoord: 25-05-2017

De gestelde vragen betroffen:

- Onderscheid tussen directe en uiteindelijke doelen
- Beschrijving haalbaarheid en samenhang van de doelstellingen
- Nadere onderbouwing wetenschappelijk belang
- Onderbouwing gebruik verschillende soorten
- Bredere context van het onderzoek (experimenten die buiten de kaders van de Wod vallen)
- Publieksinformatie
- Situatie niet in Nederland gevangen dieren aan eind experiment.
- Relatie doelstellingen en experimenten
- Herleidbaarheid verschillend ongerief bij verschillende vangmethoden
- Herleidbaarheid experimenten (meetparameters) naar doelstellingen
- Onderbouwing van keuze voor verschillende type zenders
- Beschrijving experimenten (experimental design) en de keuzes hierbij voor de verschillende experimenten
- Onderbouwing aantallen dieren
- Gewicht van de zender ten opzichte van het gewicht van de vogel voor de verschillende soorten
- Herleidbaarheid van de ongerief classificaties
- Toepassen van lokaal analgesie
- Mogelijkheden voor toepassing 3V alternatieven
- Beschrijving/toepassen van humane eindpunten
- Condities rond uitzetten van vogels na verblijf op instituut
- Aanbrengen van pootringen
- Acclimatisatieperiode voor vogels in quarantaine
- Taalgebruik in de NTS

Verstreckte antwoorden:

- De antwoorden waren aanleiding voor nadere toelichting/aanvullende vragen

Correspondentie (2^e ronde)

- Datum: 06-06-2017
- Datum antwoord: 29-06-2017

De gestelde vragen betroffen:

- Beschrijving uitvoering experimenten in het veld
- Belasting van het milieu met afgevallen zenders
- Al of niet afvallen van de tuigjes
- Onderbouwing van de keuze van de soorten

14 juli 2016

- Toepassen van humane eindpunten (in het bijzonder in het veld)
- Herleidbaarheid van de ongeriefinschattingen
- Situatie niet in Nederland gevangen vogels aan eind experiment.
- (Statistische) onderbouwing experimenten
- Beschrijving huisvesting
- Formulering humane eindpunten

Verstreckte antwoorden:

- Alle vragen en opmerkingen zijn naar tevredenheid beantwoord en verwerkt in de bijgestelde projectaanvraag

10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC): NVT

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

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

C. Beoordeling (inhoud)

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

Deze aanvraag is onderdeel van een al langlopende onderzoekslijn en heeft een concrete, goed afgebakende doelstelling en kan getypeerd worden als een project. Het betreft onderzoek waarbij onderzocht wordt hoe 3 in het wild voorkomende soorten steltlopers met elk een verschillende leefwijze en voedselkeuze, omgaan met de snelle veranderingen in hun (deels gezamenlijke) biotoop. Omdat het in alle gevallen trekvogels betreft biedt dit onderzoek inzicht in de consequenties van de veranderingen op verschillende locaties (van de Arctische gebieden via de Waddenzee tot de tropen). De 3 soorten hebben ecologische verschillende eigenschappen, resultaten met de verschillende soorten zijn daarmee aanvullend aan elkaar.

Het onderzoek dient primair een wetenschappelijk belang, maar geeft ook inzicht in de invloed van de vaak door de mens geïnduceerde, milieu veranderingen en daarmee in de noodzaak/het belang/de mogelijkheden voor het beheer van de leefgebieden van de 3 soorten in dit project maar ook van andere gebieden en andere soorten.

Opmerking [REDACTED] Wat je bedoelt is prima, ik heb een kleine aanpassing, de zin werd wat lang. Beide zijn prima.

Er is binnen de aangegeven doelstellingen, een hechte wederzijdse relatie tussen de experimenten/metingen in het veld en de experimenten/metingen in laboratorium. Deze hechte interactie is er ook met de onderdelen van het onderzoek die buiten de kaders van de Wod en daarmee dus ook buiten dit project vallen.

Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor en door de uitgebreide ervaring van de onderzoeksgroep met de te gebruiken modellen is het ook duidelijk met welk ongerief individuele dieren zullen worden geconfronteerd. De commissie is daarom van mening dat het project voldoende samenhang vertoont en 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 Flora- en faunawet).**
Voor zover de DEC weet is er geen "tegenstrijdige" wetgeving die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan.
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 in de aanvraag aangekruiste doelcategoriën zijn in overeenstemming met 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 uiteindelijke doel van dit onderzoek is het verkrijgen van fundamenteel wetenschappelijke kennis over hoe individuele dieren en populaties reageren op veranderingen in hun omgeving en wat hun natuurlijke grenzen en aanpassingsvermogen hierbij zijn. Belangrijke onderdelen hiervan zijn het bepalen van fysiologische en gedragsparameters van dieren in hun natuurlijke omgeving en in experimenteel gecontroleerde omgevingen op het instituut. Een groot deel van de handelingen in het kader van dit onderzoek valt buiten de kaders van de Wod, een gedeelte van de handelingen zijn vergunningplichtig. Deze laatste vormen de basis van deze projectaanvraag.

De kennis verkregen met dit onderzoek kan toegepast worden bij het opstellen van beheersmaatregelen van de veelal door menselijk ingrijpen bedreigde leefgebieden van de vogels, op verschillende locaties van de trekroutes.

De onder dit project uitgevoerde experimenten resulteren in een aanvulling en uitbreiding van de dataset die er de afgelopen decennia al in het kader van deze onderzoekslijn is verzameld. Voor het kunnen bepalen van lange termijn effecten is deze werkwijze essentieel. Omdat het in alle drie de gevallen kustvogels betreft die leven in open gebieden, is bijvoorbeeld het foerageren goed te observeren. Veranderingen in beschikbare prooidieren en in voedselkeuze als gevolg van veranderingen in het milieu zijn dan ook goed te meten. Dit gebeurt ook in het kader van het brede onderzoeksprogramma.

De directe doelen/vragen van dit project zijn:

1. In hoeverre beïnvloedt de 'personality' van een dier zijn reactie op veranderingen in zijn omgeving?
2. In hoeverre kan deze reactie worden beïnvloed door veranderingen aan te brengen in de fysiologische status van een vogel?
3. Hoe reageren de vogels op kunstmatig aangebrachte veranderingen in hun omgeving?
4. Het kwantificeren van veranderingen in fysiologie en gedrag op veranderingen in controleerbare omgevingsomstandigheden.
5. Het volgen van dieren in het wild. In hoeverre worden hun bewegingen (bijvoorbeeld het moment van de lente trek) bepaald door factoren in hun natuurlijke omgeving (bijvoorbeeld door de opwarming van de Arctische gebieden)? Tot nu toe werd dit vooral gedaan door dieren te voorzien van individuele kleurringen. Door het beschikbaar komen van kleine GPS loggers kunnen deze bewegingen veel nauwkeuriger worden bepaald.
6. Het ontwikkelen van nieuwe testen en nieuwe meetparameters die een nauwkeurigere beschrijving geven van de fysiologische en interne eigenschappen van een dier.

Er is een hechte directe en reële relatie tussen het directe en het uiteindelijke doel.

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

De belangrijkste belanghebbenden zijn de proefdieren, de onderzoeker die de vergunning heeft aangevraagd, het onderzoeksveld en het milieu.

Voor de proefdieren geldt dat hun welzijn en integriteit worden

aangetast. De in gevangenschap gehouden dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en in mindere mate pijn ondergaan.

Uiteindelijk zullen alle dieren na afloop van het laboratorium-onderzoek worden vrijgelaten met een reële kans op een verder normaal natuurlijk leven. Een deel van de op het laboratorium gehouden dieren en een deel van de in het wild gevangen dieren worden uitgerust met een GPS logger.

De dieren hebben er belang bij van deze omstandigheden gevrijwaard te blijven.

Voor de onderzoekers geldt dat het publiceren van belangrijke nieuwe wetenschappelijke inzichten resulteert in een goede wetenschappelijke reputatie, hetgeen vaak de sleutel is voor het verkrijgen van nieuwe onderzoeksmiddelen en -mogelijkheden. Dit kan door de onderzoeker zelf 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. Het gaat uiteindelijk om de vraag of dit onderzoek belangrijke wetenschappelijke en maatschappelijke doelen dient.

Voor het betreffende onderzoeksveld is dit onderzoek van belang, omdat het belangrijke nieuwe inzichten kan opleveren over de mogelijkheden van dieren om zich aan te passen aan veranderingen in hun omgeving en de mechanismen die daaraan ten grondslag liggen. Deze kennis is essentieel voor het opstellen van wetenschappelijk onderbouwde beheersmaatregelen van wereldwijd veelal door menselijk ingrijpen bedreigde natuurgebieden. Dit is van groot belang voor de samenleving.

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

De commissie is van oordeel dat er ten gevolge van de in dit project beschreven dierproeven geen sprake is substantiële negatieve milieueffecten. De aanvrager heeft inzicht gegeven in het maximaal aantal afgevallen zenders die uiteindelijk in het milieu zullen belanden.

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*).
De aanvrager heeft een wereldwijd erkende kennis en deskundigheid en ruime ervaring met het uitvoeren van dit type dierproeven. Voor

nieuwe facetten in dit onderzoek worden eerst gecontroleerde pilotexperimenten uitgevoerd. De commissie is ervan overtuigd dat de ervaring en expertise bij de aanvragende instantie er toe zal leiden dat de doelstelling haalbaar is, dat er zorgvuldig met de proefdieren gewerkt zal worden en dat er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden.

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 commissie is van oordeel dat het project goed is opgezet, 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 in het kader van het project. De commissie is ervan overtuigd dat de doelstellingen van dit project haalbaar zijn.

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*).**

Het betreft onderzoek met dieren in en uit het wild. Het gebruik van deze dieren zowel in het veld als in het laboratorium is voldoende wetenschappelijk onderbouwd. De beoogde doelen kunnen niet worden verkregen met dieren die speciaal voor dierproeven zijn gefokt.

- 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 instelling is wereldwijd erkend om het succesvol huisvesten van verschillende soorten steltlopers. Voor de betreffende soorten zijn in de bijlage II van de Richtlijn 2010/63/EU geen gedetailleerde huisvestingeisen opgenomen. De verblijven zijn aangepast om optimaal tegemoet te komen aan fysiologische en ethologische behoeften van de betreffende dieren. In het kader van een aantal experimenten zullen dieren gedurende enkele dagen solitair worden gehuisvest. Dit gebeurt eigenlijk altijd in dezelfde verblijven. Deze afwijkende huisvesting is voldoende wetenschappelijk onderbouwd. Er is bij de instelling al uitgebreide ervaring met dergelijke korte solitaire huisvesting. Dit heeft nog nooit aanleiding gegeven tot aanvullend ongerief.

Het is aangetoond dat onder de huisvestingsomstandigheden bij deze instelling vogels vele jaren gehouden kunnen worden en na een uitwenperiode daarna in staat zijn weer onderdeel te worden van een natuurlijke populatie met ook een natuurlijke levensverwachting.

De verblijven voor de dieren in quarantaine zijn dezelfde als die voor de standaardhuisvesting.

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).**

Er zullen in het kader van dit project van de drie aangegeven soorten samen maximaal 6500 (appendix 1) en 1900 (appendix 2) dieren worden gevangen. Dit is een subset van het aantal dieren dat totaal gevangen, gemeten en geringd wordt (handelingen die buiten het toetsingsbereik van de Wod vallen).

Al deze 8400 dieren zullen in het wild worden gevangen (matig ongerief) en worden uitgerust worden met één of meerdere pootringen en er zal een klein bloedmonster genomen worden en/of een huidmonster en/of een veer worden getrokken. Voor 50% van de dieren is dit de enige interventie (licht ongerief). 13% van de dieren zal uitgerust worden met een zender (8 % met een radiotag (licht ongerief) en 5% met een GPS logger met een tuigje (kortdurend matig ongerief). 30% van de dieren zal participeren in gedragstesten en andere testen (licht ongerief), 7% hiervan zal daarna uitgerust worden met een zender (6% met een radiotag (licht ongerief) en 1% met een GPS logger met een tuigje (kortdurend matig ongerief). Een zeer klein percentage van de dieren (<< 1%) zal geconfronteerd worden met matig ongerief ten gevolge van het oplopen van trauma door ongelukken. Het cumulatieve ongerief (matig voor alle dieren) als

gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geëvalueerd. Het instituut heeft al vele jaren ervaring met dit onderzoek. Deze ervaringen ondersteunen deze inschattingen.

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 de dieren wordt aangetast door het instrumentele gebruik in dierproeven. Een deel van de dieren zal enige tijd uit hun natuurlijke milieu worden gehaald en gehuisvest worden in het instituut. Een deel van de dieren wordt voor het weer uitzetten in het biotoop uitgerust met een radiotag (geplakt op de veren) of een GPS logger (met een tuigje aan het dier is bevestigd). De dieren zullen enige tijd nodig hebben om aan de aanwezigheid van deze zender te wennen. Een klein deel van de dieren die in het buitenland worden gevangen, en die de Waddenzee niet als natuurlijk biotoop gebruiken, kunnen vanwege onder meer infectie risico's niet meer in hun oorspronkelijke biotoop worden uitgezet. Deze zullen in een permanente opvang buiten de instelling worden gehuisvest. Het is de ervaring dat de dieren al of niet uitgerust met een zender/logger die direct na het vangen weer losgelaten worden maar ook de dieren die na afloop van de experimenten op het instituut via een uitwentraject weer losgelaten worden, direct weer onderdeel zijn van een natuurlijke populatie.

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).

De criteria voor humane eindpunten zijn primair gericht op het voorkomen van meer dan het ongerief dat tengevolge van het vangen en de experimenten verwacht zou mogen worden. Er is een zeer kleine kans dat dieren bij het vangen en/of de vervolghandelingen trauma oplopen. Ook in dit geval zal onnodig ongerief worden voorkomen door of het dier direct te doden of het gedurende enige tijd in gevangenschap te huisvesten totdat hij weer in staat is uitgezet te worden. De commissie deelt de inschattingen die hiertoe gemaakt zijn en is van mening dat adequate humane eindpunten zijn geformuleerd die meer dan matig ongerief zullen voorkomen.

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).
Voor het bestuderen van de reactie van wilde dieren op veranderingen

in hun natuurlijke omgeving is het gebruik van in het wild gevangen dieren en onderzoek in het veld onvermijdelijk. Vanwege de extrapolatie naar de situatie in het veld dienen de gecontroleerde laboratorium experimenten ook met dezelfde (in het wild gevangen) vogels te worden uitgevoerd. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn.

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).**

Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat. De onderzoekers hanteren een goede strategie om ervoor te zorgen dat er met het kleinst mogelijke aantal dieren wordt gewerkt waarmee nog een wetenschappelijk betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Door gebruik te maken van de meest geavanceerde zenders met een lange levensduur kan veel informatie worden verkregen van een beperkt aantal vogels. Hierdoor hoeven er minder vogels te worden gevangen om uitgerust te worden met een zender/logger. Door de stapsgewijze aanpak wordt onnodig gebruik van proefdieren voorkomen.

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).**

Het project is in overeenstemming met de vereiste van verfijning van dierproeven. De vangprocedures zijn erop gericht om de bijvangst zo veel mogelijk te reduceren. Er wordt gebruik gemaakt van de meest geavanceerde (en dus ook lichtste) zenders om de doelstellingen te kunnen bereiken. Na het aanbrengen van de zender worden de dieren eerst nog enige tijd geobserveerd. Als blijkt dat het dier niet met de aanwezigheid van een zender/logger om kan gaan, wordt deze verwijderd. Alle gezenderde vogels worden ook uitgerust met kleurringen. Er wordt zeer veel tijd en moeite gestoken om de kleurringen na vrijlating in het veld regelmatig af te lezen (ook in andere gebieden van de trekroutes). Dat betekent dat er informatie beschikbaar komt over hoe de dieren omgaan met de zenders. Deze informatie wordt gebruikt bij de opzet en uitvoering van de vervolggexperimenten. De DEC is er van overtuigd dat de beschreven proefopzet de meest verfijnde is en dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.

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.
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*).
De aanvrager zal in het project gebruik maken van zowel mannelijke als vrouwelijke dieren. Dit wordt vooral veroorzaakt doordat mannelijke dieren niet te onderscheiden zijn van vrouwelijke dieren. Bij het bepalen van de groepsgroottes wordt ervan uitgegaan dat er in de gemeten parameters geen verschillen zullen zijn tussen mannelijke en vrouwelijke dieren. Bij de groepsgroottes spelen sekse verschillen (behalve voor experimenten die zich specifiek hierop richten) geen rol. De commissie beschouwt dit als afdoende.
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 vermeldt 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 dieren zullen nooit in het kader van het project gedood worden. De gebruikte dodingsmethode in geval van het bereiken van de humane eindpunten staat vermeld in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU.
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.

Er worden in deze projectaanvraag geen landbouwhuisdieren, honden, katten of niet-humane primaten gedood om niet-wetenschappelijke redenen.

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 is begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

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

Rechtvaardigt het belang van de doelstelling van het project de aantasting van de integriteit en het ongerief dat de dieren wordt aangedaan, en is tegemoet gekomen aan alle zorgvuldigheidseisen (3V's)?

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).

Alle proefdieren worden geconfronteerd met aantasting van hun integriteit en met geclassificeerd matig ongerief. Dit wordt in het overgrote deel van de vogels veroorzaakt door het matige ongerief ten gevolge van het vangen. Een klein deel van de dieren zal ten gevolge van de vervolghandelingen geconfronteerd worden met kortdurend matig ongerief. Voor de overige dieren is het ongerief ten gevolge van de vervolghandelingen licht.

Een heel klein deel van de dieren zal niet meer kunnen worden uitgezet. De doelstellingen kunnen niet zonder gebruik van wilde dieren worden behaald. De onderzoekers doen al het mogelijke om het lijden van de dieren en het aantal dieren te beperken.

Dit onderzoek kan belangrijke nieuwe wetenschappelijke inzichten opleveren over hoe dieren in het wild omgaan met veranderingen in hun omgeving en wat hun strategieën en aanpassingsvermogen daar bij zijn. De DEC kent daar veel gewicht aan toe mede omdat het veelal

door mens geïnduceerde veranderingen zijn. De uitkomsten uit dit onderzoek kunnen toegepast worden bij het opstellen van beheersmaatregelen van wereldwijd veelal door menselijk ingrijpen bedreigde natuurgebieden. In het project zijn voorbeelden uit het verleden hiervan opgenomen. Het adequaat beschermen van kwetsbare natuurgebieden, op basis van wetenschappelijke kennis en informatie, dient een groot maatschappelijk belang.

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 overtuigd van het belang van de directe en uiteindelijke doelstellingen. Uiteindelijk kunnen deze bijdragen aan nieuwe wetenschappelijke inzichten over hoe dieren (kunnen) omgaan met veranderingen in hun omgeving.

De DEC is van mening dat de belangen van de wetenschap en het beschikbaar komen van wetenschappelijk onderbouwde beheersplannen voor een groot aantal kwetsbare natuurgebieden wereldwijd voldoende zwaar wegen om het schaden van de belangen van de proefdieren (om gevrijwaard te blijven van een aantasting van hun welzijn en integriteit) te rechtvaardigen. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager. De DEC is van mening dat het project goed is opgezet, en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn, dat het doel niet met minder dieren behaald kan worden, dat de gebruikte aanpak de meest verfijnde is en dat maximaal voorkomen wordt dat mens, dier en het milieu onbedoelde negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven.

De DEC is van oordeel dat het hier boven geschetste belang de onvermijdelijke nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren, in de vorm van aantasting van integriteit, angst, pijn of stress, rechtvaardigt. Aan de eis dat het belang van de experimenten op dient te wegen tegen het ongerief dat de dieren wordt berokkend en de aantasting van hun integriteit, is voldaan.

14 juli 2016

E. Advies

1. Advies aan de CCD

X 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, specificeer het minderheidsstandpunt op het niveau van verschillende belanghebbenden en de waarden die in het geding zijn (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.A; zie bijlage I voor voorbeeld*).

Het uitgebrachte advies is unaniem, 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 zijn geen knelpunten of dilemma's geconstateerd - zowel binnen als buiten de context van het project - die de verantwoordelijkheid en competentie van de DEC overstijgen.



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Kon. Ned. Inst. Voor Onderzoek der Zee (NIOZ)

Postbus 59
1790 AB DEN BURG



**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
AVD8020020171505

Bijlagen

1

18 JULI 2017

Datum 17 juli 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 4 juli 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Shorebirds in a rapidly changing world:gaining mechanistic understanding of the behavioural, physiological, and population-level responses of shorebirds to global change " met aanvraagnummer AVD8020020171505. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 12 juli 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Er is u gevraagd de Niet Technische Samenvatting aan te passen en de dieraantallen in overeenstemming te brengen met de aantallen zoals beschreven in bijlage 3.4.4.2.

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 "Shorebirds in a rapidly changing world:gaining mechanistic understanding of the behavioural, physiological, and population-level responses of shorebirds to global change " starten. De vergunning wordt afgegeven van 22 juli 2017 tot en met 1 augustus 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie [REDACTED] gevoegd. Dit advies is opgesteld op 4 juli 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 12 juli 2017 heeft de DEC gereageerd op onze vragen. De ethische afweging van de DEC blijft ongewijzigd na aanpassing van de dieraantallen en de ongeriefclassificatie.

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).

Datum:
17 juli 2017
Aanvraagnummer:
AVD8020020171505

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



Algemeen Secretaris

Bijlagen:

- Vergunning
- Hiervan deel uitmakend:
 - DEC-advies
 - Weergave wet- en regelgeving

Datum:
17 juli 2017
Aanvraagnummer:
AVD8020020171505



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Kon. Ned. Inst. Voor Onderzoek der Zee (NIOZ)

Adres: Postbus 59

Postcode en plaats: 1790 AB DEN BURG

Deelnemersnummer: 80200

deze projectvergunning voor het tijdvak 22 juli 2017 tot en met 1 augustus 2022, voor het project "Shorebirds in a rapidly changing world:gaining mechanistic understanding of the behavioural, physiological, and population-level responses of shorebirds to global change " met aanvraagnummer AVD8020020171505, volgens advies van Dierexperimentencommissie [REDACTED]. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

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

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 4 juli 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 4 juli 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 12 juli 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 4 juli 2017, ontvangen op 4 juli 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 12 juli 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Demography and movement ecology of free-ranging shorebirds				
	Andere vogels (andere Aves) / kanoetstrandloper, rosse grutto, Drieteenzandloper	6.500	100% Matig	
3.4.4.2 Testing behavioural and physiological indicators of environmental change at the institute				
	Andere vogels (andere Aves) / kanoetstrandloper, rosse grutto, drieteenstrandloper	1.900	100% Matig	

Voorwaarden

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

Aanvraagnummer:
AVD8020020171505

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:

AVD8020020171505

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:
AVD8020020171505

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.

Inventaris Wob-verzoek W17-12									
nr.	documenten NTS20171544	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	Projectvoorstel				x		x	x	
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1				x		x	x	
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2				x		x	x	
6	DEC-advies				x		x	x	
7	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
8	Vragen en antwoorden aanvulling				x		x	x	
9	Advies CCD		x						x
10	Beschikking en vergunning				x		x	x	

1544

1.



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

- 1.6 *(Optioneel)* Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.
- (Titel) Naam en voorletters 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 01 - 01 - 2018
- Einddatum 01 - 01 - 2023
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Evaluation of novel HIV vaccine candidates for immunogenicity and capacity to protect against SIV/SHIV virus infection in macaques.
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Onderzoek naar de werkzaamheid en effectiviteit van nieuwe HIV vaccins.
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC
- Postadres
- E-mailadres

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1187 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
- 2 bijlages beschrijving dierproeven

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

1 - 5 - 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.

HIV/AIDS is a major public health issue. According to the World Health Organization, human immunodeficiency virus (HIV) infection, which results in acquired immune deficiency syndrome (AIDS) is,

even today, among the ten major leading causes of death and is the second leading cause of mortality in adolescents. Since the first report in 1981 and the identification of HIV as a causative agent in 1983 (Barré-Sinoussi et al., 2004), AIDS has claimed over 37 million lives. In 2015, 2.1 million people became newly infected with HIV and 1.1 million people died from AIDS.

HIV infection is characterized by a slow and progressive loss of CD4⁺ T cells that, in absence of treatment, generally leads to an immunosuppressed condition. Nowadays, it is recognized that chronic immune activation is the driving force of such immunodeficiency (Paiardini and Müller-Trutwin, 2013). Under successful combined antiretroviral therapy (cART), the virus is controlled up to an undetectable level in blood, but a residual chronic inflammation persists and is associated with the morbidity and mortality observed in the antiretroviral-treated patients. Despite the great advances made in HIV/AIDS knowledge, there are still key problems to solve, in particular the lack of a vaccine, a cure and the absence of treatments for resolution of HIV-induced inflammation.

The development of a safe and effective HIV/AIDS vaccine that can prevent HIV-1 infection has become a key research priority. Since the discovery of HIV-1 there has been only **one** phase III clinical trial showing a 31.2% protection against HIV-1 (RV144 trial; Rerks-Ngarm et al., 2009). This modest efficacy highlights the importance to continue developing new or better HIV vaccines and vaccination strategies. Nowadays because of the advanced characterisation of antibody responses in HIV infected individuals in combination with new molecular engineering technologies, more specific vaccine candidates can and will be designed. Together with new scientific insights in the design of new vaccines molecules it is expected that the limited efficacy against HIV will be improved significantly and will accelerate the search for more effective HIV vaccines.

In the search for a vaccine against HIV-1, there is a need for an animal species that can be infected with the human virus. Such a model would help, for instance, in the study of therapeutics like neutralizing antibodies (Nabs) against HIV-1 or vaccines inducing either antibodies against HIV or immune cells able to kill virus infected target cells. Chimpanzees constitute the original reservoir of HIV-1 and therefore are naturally susceptible to HIV-1. However, results obtained from HIV-1 infection in these primates have been non conclusive. Some groups have reported the development of AIDS in this model (Novembre et al., 1997; Davis et al., 1998; O'Neil et al., 2000; Ferrari et al., 1993), characterized by marked depletion of CD4⁺ T cells, sustained viremia, severe CD4:CD8 inversion and increased T cell apoptosis. Others have observed that chimpanzees do not or only slowly progress to AIDS, maintaining their normal CD4⁺ T cell counts and display undetectable viremia (Juumpan et al., 2008). The scientific limitations of the model, together with the new guidelines for the use of chimpanzees in biomedical research, lead to the stop of its use for HIV research (Anon, 2011).

Macaques are not susceptible to HIV-1 infection. However, infection of macaques, with Simian Immunodeficiency Virus (SIV) leads to a disease that is similar to AIDS induced by HIV in humans. So far, this is the most suitable model to study the mechanisms of transmission and pathology of the disease. Indeed, SIV infection in macaques fulfils the conditions for a reliable animal model for human disease: 1) The disease developed in humans after HIV infection can also be observed in animals after SIV infection; 2) The course of the disease in humans is similar to SIV infected animals; 3) The range of cells, tissues and organs involved in humans are similar to SIV infected animals, and 4) Immune responses to infection in humans are also similar in the animal model. These conditions are not fulfilled by other animal models, such as feline immunodeficiency virus (FIV) in cats or HIV-1 in humanized mice. Other attempts for studying HIV-1 infection in small animals such as rats, mice or rabbits were performed without success (Garcia-Tellez, et al., 2016) leaving the non-human primate (NHP)-SIV model as the most suitable model so far, for HIV/AIDS research and vaccine efficacy evaluation studies.

HIV vaccines are either designed to induce a neutralizing antibody response against the HIV-1 Envelope protein, which will result in inhibition of binding of the virus to its target cells and thus prevent infection, or designed to induce a cellular cytotoxic T-cell response against viral components, which will result in

killing of already infected target cells. For HIV vaccine candidates directed against the HIV-1 envelope protein, SIV cannot be used because the SIV envelop is significantly different from the HIV-1 envelope. In these cases, chimeric simian-human immunodeficiency virus (SHIV), in which the envelope glycoproteins of SIV are replaced with those of HIV-1 (Li et al., 1992), are used as challenge virus. With the use of these recombinant viruses it is now possible to also evaluate effectiveness of therapeutic antibodies (Hessel and Haigwood, 2015; Garcia-Tellez, et al., 2016). For HIV vaccine candidates directed against various (functional) internal molecules of the virus, SIV can be used as challenge model because of the closer similarity between HIV-1 and SIV for these proteins. Because SIV causes a disease that is similar to HIV-1 in humans, this model allows also assessment of vaccine mediated suppression of virus multiplication and delay or prevention of disease progression.

In conclusion, the strong immunological and physiological resemblances to humans make NHP a unique model in pre-clinical vaccine safety, immunogenicity and efficacy evaluation, particularly in relation to the new HIV vaccine delivery platforms being developed and for the evaluation of the mechanism of protection; i.e. broadly neutralizing antibody, non-neutralizing antibody and cellular broadly protective immune responses. Evaluation in NHP is essential before new HIV vaccine candidates can be evaluated in humans. Although many efficacy studies have already been performed in NHP, still no correlates of protection have been found. Therefore, challenge studies are still necessary in order to establish whether a vaccine actually can provide protection against infection and to establish correlates of protection.

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 goal of this project is to evaluate novel HIV vaccine candidates for occurrence of adverse effects, immunogenicity and capacity to protect against SIV/SHIV infection in macaques. The ultimate goal is to develop an HIV vaccine that can induce an immune response that is sufficiently broad to provide protection against different HIV variants and can provide a degree of heterogeneous protection that would lead to reduced morbidity and mortality caused by AIDS.

The goal of the project can be divided in 2 sub-goals:

1. Vaccine evaluation. Safety, immunogenicity and efficacy to protect against infection will be evaluated using an appropriate SIV/SHIV virus challenge strain in relation to the type of vaccine being used.
2. Set-up infection model for SIV/SHIV viruses that have not yet been used in NHP at our institute and that are needed for vaccine evaluation (sub-goal 1) and refinement of SIV/SHIV virus infection models. For refinement the optimal dose and optimal route of infection will be investigated in order to improve the assessment of vaccine efficacy.

In case a vaccine has to be evaluated against an SIV/SHIV strain that has been used before at our institute, then this can be directly performed under sub-goal 1. However, in case a new SIV/SHIV strain has to be used then two stages are necessary; first to set-up the infection model (sub-goal 2) and then use this information in the model for vaccine evaluation (sub-goal 1). Two types of experiments are needed to achieve these sub-goals, namely a vaccine evaluation model (described in bijlage 1) and a SIV/SHIV infection model (bijlage 2).

At our institute we have been performing vaccine evaluation studies in NHP for over 20 years. Most vaccine candidates were directed against human immunodeficiency virus, hepatitis B virus and hepatitis C virus, malaria and tuberculosis (reviewed in 't Hart et al., 2015; ██████████; Holterman et al., 1999; 2001). We have the appropriate facilities and experience to work with pathogenic viruses, at BSL-III biosafety conditions. In addition, we have the appropriate immunological assays for assessment of cellular, humoral and innate immune responses against HIV. Our long-standing experience with pathogenic viruses, including HIV, SIV/SHIV, and with vaccine evaluation guarantees that these animal

studies will be adequately performed.

3.3 Relevance

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

One key step in the process of vaccine development is the use of animal models, in which vaccine candidates can be properly evaluated to make a rational selection of vaccine candidates for subsequent clinical evaluation possible and where correlates of protection can be studied. Macaques are the current 'gold standard' animal species for testing HIV vaccines. Vaccine studies in macaques can be modelled based on the patient cohort to be used in clinical trials as most modes of HIV transmission including mother to child, hetero or homosexual transmission and intravenous drug use can be mimicked by varying the route (oral, vaginal, penile, rectal or intravenous) and amount of virus inoculum (single high dose versus repeated low dose) used to challenge vaccinated animals. The ability of the vaccine to prevent or delay virus acquisition, control virus replication and disease progression can then be determined. These virological outcomes are used to compare the relative efficacy of different vaccine strategies, and should guide the choice of HIV vaccines to be advanced to clinical trials. Thus this project is very important in contributing to a solution of one of the global health issues: HIV/AIDS by finding a vaccine, or vaccination strategy, which will stop the spread of the HIV pandemic. Furthermore, this project will result in important scientific findings: safety and immunogenicity of new vaccine platforms together with the fact that potentially effective vaccine candidates might improve our knowledge on mechanism(s)/correlates of protection. With this knowledge, even better and more effective vaccines can then be developed.

3.4 Research strategy

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

Vaccines that will be tested in NHP have to be in the final stages of preclinical development and require this last validation step in order to assure that there are no adverse effects that were missed in the preliminary studies in other species and that they are effective in an animal species that has an immune system closely related to humans. Additional criteria for vaccine evaluation are: a) the vaccine strategy must be novel, for instance with regard to choice of antigen, formulation, route of application, that have not been tested before in similar NHP studies, b) demonstration that the vaccine or vaccine components are non-toxic, c) when specific host molecules are targeted then cross recognition of macaque homologues must have been demonstrated, d) the vaccine cannot be adequately tested in other than NHP animal models, for instance due to the mechanism of action or the type of immunological assessment needed, e) preferably immunogenicity of vaccine candidates should have been proven in other species, unless this is not possible because the specific vaccine modality used does not work in other species. This concerns only vaccines for which it is not possible to directly evaluate them in other species because interaction with specific host molecules is required that are only present in humans and in NHP, but not in other species. In this case, it is required that a similar vaccine strategy that targets slightly different molecules but uses the same mode of action has been evaluated and found to be immunogenic in other species. In order to evaluate the immunogenicity of a new HIV vaccine candidate, its capacity to protect against infection and the possible adverse effects, a vaccine evaluation experiment will be performed according to well established procedures, as described in bijlage 1. The potential vaccine candidate(s) need to have been evaluated extensively for immunogenicity and safety in rodent species with positive outcome before they will be evaluated in NHP where safety, immunogenicity and efficacy to protect against infection will be evaluated using an appropriate SIV/SHIV virus challenge strain in relation to the type of vaccine being used.

Typically, one or a number of immunizations are given over a certain time period. After immunization the induction of T-cell and antibody immune responses is measured. The strength of these responses as well as their breadth, i.e. the capacity to recognize not only homologous viruses that are similar to the vaccine but also heterologous viruses, is determined. Subsequently, the capacity of the vaccine to protect against infection is tested by experimental infection of the animals with either SIV or SHIV. The choice of the virus strain that is to be used for experimental infection will depend on the outcome of the

evaluation of the immune responses and the stage of development of the vaccine.

New vaccine concepts may require that in first instance protection against infection from a homologous virus strain will be tested. However, more advanced vaccine candidates typically require evaluation of protection against infection with a heterologous virus strain. Experimental infection will only be performed when the immunization has induced clearly measurable immune responses against the virus that is to be used for experimental infection so that protection against infection is possible. Whether protection is actually achieved depends on local interaction between cells of the immune system and local anti-viral antibodies with the virus and virus infected cells in the genital tract or lymphoid tissues. This cannot be adequately modelled in an *in vitro* system and requires experimental infection of an animal. Ideally the vaccine should provide a robust level of protection or be able to reduce disease burden and virus multiplication. In case proper evaluation of the capacity of a vaccine to protect against infection requires that a virus has to be used that has not been tested before in macaques at our institute then this virus will first be tested in a small number of animals to determine if all animals become infected and what the amount of virus production is (type 2 experiment). Virus infection can be performed by inoculating the animals via various routes, using either a single exposure with a relatively high dose of virus or multiple exposures with lower doses of virus. The routes of infection can be categorized as mucosal, mimicking sexually transmitted virus infections which forms the large majority of virus transmission worldwide, or intravenous, mimicking IV drug users which forms a minority of virus transmission worldwide. The relevance for a vaccine for IV drug users might be the effect of the vaccine on delay of disease progression rather than prevention against infection. A single exposure to a high amount of virus is usually applied in the intravenous exposure model and occasionally in mucosal exposure models, when viruses are used that are relatively easy to neutralize. In this single exposure model all non-vaccinated control animals should become infected after a single exposure. More typical for the mode of acquisition of HIV in humans is via multiple exposures to a low amount of virus via the mucosal route. To model this mode of infection, a repeated low dose challenge model will be used. In this model usually 1 monkey infectious dose (MID₅₀) will be used, resulting in infection of over 99% of the control animals after 7 exposures. The virus is titrated as described in bijlage 2 to establish the exact amount needed to reach 1 MID₅₀.

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.

Vaccine evaluation in macaques. For this type of experiment animals will be immunized either once or they will receive a number of immunizations over a certain time period. During the study animals will be monitored for adverse effects of the vaccine, including monitoring of general behaviour and health. Blood and occasionally mucosal washings (i.e. nasal, rectal, vaginal washes) will be taken to measure induction of systemic as well as local immune responses. When adequate immune responses are induced that indicate that protection against infection might be achieved, the efficacy against infection will be tested by experimental infection with SIV/SHIV. A group of non-vaccinated animals will be included as infection controls.

SIV/SHIV infection in macaques. In order to establish infectivity and pathogenicity of a new virus that has not been tested previously in NHP at our institute, a small number of animals will be infected and monitored for clinical symptoms, body weight and changes in blood parameters. Blood samples will be taken to determine if the animals have become infected and what the amount of virus production is. It is estimated that 75% of our future efficacy studies will be performed with virus strains/stocks that have been used in earlier efficacy studies at our institute. To evaluate a new virus, the virus can be inoculated via different routes; i.e. intravenously, intra-rectally or intra-vaginally using different doses in order to determine the minimum infectious dose of that particular virus via that specific route of infection. Proper application in vaccine evaluation studies requires that in these infection studies the viral dose at which 50% of the animals become infected (MID₅₀) has to be established and that the amount of virus produced in the circulation over the infection period is clearly measurable and that the variation in virus multiplication between the animals is sufficiently low to allow measurement of reduction in virus load in vaccinated animals with less than 10 animals per group.

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.

Vaccine candidates that fulfil the criteria for evaluation in NHP may be directly tested in a vaccine

evaluation study (bijlage 1), if the SIV/SHIV virus that is to be used for establishing capacity of the vaccine to protect against infection has already been used in NHP at our institute. If this is not the case then the virus has to be tested first in an SIV/SHIV titration infection study (bijlage 2). Requirement to proceed from SIV/SHIV infection study to vaccine evaluation study are: a) determination of the MID50 for the route of infection to be used, b) variation in virus multiplication between animals has to be such that in a vaccine evaluation study with group sizes within reasonable limits, statistically significant results can be obtained depending on the challenge dose: for one high dose usually n=6 per group vs repeated low dose where n=10 per group might be required for statistical significance.

Literatuur.

Anon, 2011. [Institute of Medicine \(US\) and National Research Council \(US\) Committee on the Use of Chimpanzees in Biomedical and Behavioral Research. Chimpanzees in Bio- medical and Behavioral Research: Assessing the Necessity. National Academies Press \(US\).](#)

Barré-Sinoussi, F., et al., 2004. [Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome \(AIDS\). 1983. Rev. Investig. Clín. Organo Hosp. Enferm. Nutr. 56, 126-129.](#)

[REDACTED]

[REDACTED]

Davis, I.C., Girard, M., Fultz, P.N., 1998. [Loss of CD4⁺ T cells in human immunodeficiency virus type 1-infected chimpanzees is associated with increased lymphocyte apoptosis. J. Virol. 72, 4623-4632.](#)

Ferrari, G., et al., 1993. [The impact of HIV-1 infection on phenotypic and functional parameters of cellular immunity in chimpanzees. AIDS Res. Hum. Retrovir. 9, 647-656.](#)

Garcia-Tellez T, et al., 2016. [Non-human primates in HIV research: Achievements, limits and alternatives. Infect Genet Evol. 46:324-332.](#)

Hart 't et al., 2015. [The translational value of non-human primates in preclinical research on infection and immunopathology. Eur J Pharmacol. 15,759.69-83.](#)

Hessell, A.J., Haigwood, N.L., 2015. [Animal models in HIV-1 protection and therapy. Curr. Opin. HIV AIDS 10, 170-176.](#)

Holterman L, et al., 1999. [Specific passage of simian immunodeficiency virus from end-stage disease results in accelerated progression to AIDS in rhesus macaques. J Gen Virol.80 \(Pt 12\):3089-97.](#)

Holterman L, et al., 2001. [Characteristics of a pathogenic molecular clone of an end-stage serum-derived variant of simian immunodeficiency virus \(SIV\(F359\)\). J Virol. 75\(19\):9328-38.](#)

Juompan, L.Y., et al., 2008. [Analysis of the immune responses in chimpanzees infected with HIV type 1 isolates. AIDS Res. Hum. Retrovir. 24, 573-586.](#)

Li J, et al., 1992. [Infection of cynomolgus monkeys with a chimeric HIV-1/SIVmac virus that expresses the HIV-1 envelope glycoproteins. J Acquir Immune Defic Syndr 5:639 - 646.](#)

Novembre, F.J., et al., 1997. [Development of AIDS in a chimpanzee infected with human immunodeficiency virus type 1. J. Virol. 71, 4086-4091.](#)

O'Neil, S.P., et al., 2000. Progressive infection in a subset of HIV-1-positive chimpanzees. *J. Infect. Dis.* 182, 1051-1062.

Paiardini, M., Müller-Trutwin, M., 2013. HIV-associated chronic immune activation. *Immunol. Rev.* 254, 78-101.

Rerks-Ngarm S, et al., 2009. Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. *N Engl J Med* 361: 2209-2220.

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	Vaccine evaluation in macaques
2	SIV/SHIV infection (titration) in macaques
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'.

[Redacted]

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	Vaccine evaluation in macaques

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.

Over the years we have developed, refined and validated a protocol for the evaluation of HIV vaccines in macaques [Redacted] [Holterman et al., 1999](#); [Holterman et al., 2001](#)). A baseline measurement will be determined by taking blood and mucosal washings (nasal, rectal, vaginal) some weeks before the first immunization will take place. Subsequently, animals are immunized either once or they receive a number of immunizations over a certain time period. Although the vaccines that are used in these studies have already been extensively evaluated in other models and are expected to give no or only very limited adverse effects, animals will be monitored for possible changes in general behaviour and health. The site of immunization will be checked for local reactions and blood will be drawn to measure clinical chemistry and haematology parameters. Before, between and after immunizations, blood and occasionally nasal, rectal and/or vaginal washes, draining lymph node biopsies and/or gut biopsies will be taken to measure induction of systemic as well as local immune responses. When adequate immune responses are induced that indicate that protection against infection might be achieved, the efficacy against infection will be tested by experimental infection with SIV or SHIV. A group of non-vaccinated animals will be included as infection controls. The infection will be performed as described in bijlage 2. Most vaccine candidates are aimed to protect against mucosal transmission of HIV, but some can be developed to delay or prevent AIDS disease progression (and thus model therapeutic vaccination).

The primary outcome parameters are:

Absence of unexpected reactogenicity of the vaccine: effects of the vaccine on general behaviour, health, local reactions and blood parameters.

Testing the Immunogenicity and efficacy: Induction of cellular and humoral immune responses. The type and strength of the induced responses will determine if the objectives of the vaccine strategy are

achieved. Furthermore, the capacity to protect against viral challenge will be established in terms of: protection against infection, increase in the number of exposures needed to obtain productive infection, reduction in the level of virus replication upon infection, protection against a loss of CD4 T-cells or changes in other blood parameters, prevention or delay in disease progression.

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

Animals will receive one or more immunizations, typically at 4 to 8 week time intervals, although occasionally a longer time frame is needed between immunizations when different vaccine modalities are used for priming and boosting of the immune response. Usually 3 immunizations suffice over a period of 20 weeks. However, in rare occasions these limits may have to be exceeded depending on the vaccines used. Immunizations will be done either by intradermal injection, intramuscularly, subcutaneously, intravenously, intra-nasally, intra-tracheally, intra-bronchially using a bronchoscope or via aerosol using a nebulizer. At regular time intervals, usually two and four weeks after every immunization, blood is drawn to measure systemic adverse effects, which includes measurement of clinical chemistry and haematology, and to measure induction of cellular and humoral immune responses. The two-week interval after immunization is chosen, because this is optimal for measuring cellular immune responses, while four weeks is optimal for measuring humoral immune responses. The total amount of blood will be less than 1% of the body weight per month and less than 0,7% of body weight per bleeding. Occasionally, usually before the start of the study and after the last immunisation, a nasal, rectal and/or vaginal wash, lymph node biopsies and/or gut biopsies are taken in order to measure induction of local immune responses. Immune responses recorded after the final immunization will be used to decide whether protection against viral challenge can be reasonably expected. If these responses are inadequate, i.e. if there are no antibody binding responses, or no detectable cellular immune responses in the majority of a vaccinated group, then the study will be stopped and animals may be re-used in other non-HIV related experiments. Otherwise, experimental challenge will take place in all animals and usually will take place between 4 and 8 weeks after the last immunization. This time period is needed to allow immunological memory to form after the last immunization. The decision not to challenge will be communicated with the AWB. SIV/SHIV infection may be done in a bolus way or in a repeated low-dose strategy by intra-rectal, intra-vaginal or oral route of inoculation (as described in bijlage 2). Animals will be monitored daily for behaviour, appetite and stool. Typically, blood is taken every week for the first 6 weeks after final challenge, then every 2 weeks until week 12 followed by monthly bleeding usually until week 24 to measure viral loads and to monitor changes in clinical chemistry and haematology parameters, number of CD4 T-cells and other leucocyte subsets. Nasal, rectal and vaginal washings will be collected simultaneously with blood collection at selected time points after infection to measure viral loads in those excretions. In case AIDS symptoms become manifest, (animals suffer from chronic diarrhea and show more than 10% body weight loss in combination with abnormal hematology parameters: these are AIDS-defining conditions and are criteria for euthanasia), the animals will be euthanized and tissues collected for viral load measurements. In case animals remain negative for SIV/SHIV and are thus protected against SIV/SHIV infection, a re-challenge with a heterologous SIV/SHIV might be considered to study the broadness or strength of the immune response, measured as capacity to protect against a different strain of SIV/SHIV. At the end of the study all animals will be euthanized to establish vaccine safety and measure viral loads in different tissues. The details of each study, regarding the interval between the immunizations, the number and time points of sampling, the specific criteria to proceed with a viral challenge, the time interval between the last immunization and viral challenge will depend on the actual type of vaccine that is being tested and this will be submitted to the AWB.

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

The number of animals per group will be based on statistical power analysis appropriate for the primary outcome measure. There are two primary outcome measures: 1. Vaccine immunogenicity defined as cellular (ELISpot or ICS) or humoral (Ig levels or neutralisation titres) responses and 2. Vaccine efficacy, with the fraction infected or reduction in virus load as primary outcome measures. For vaccine immunogenicity calculations take into account the number of animals required to detect statistically

significant induction of immune responses compared to unvaccinated controls or, in case different vaccines are compared, whether significant differences between vaccine groups can be detected. The minimal detectable alternative is 1.8 and 1.3 x standard deviations for 6 and 10 animals (based on $\alpha = 0.05$, $\beta = 0.2$), respectively. For vaccine efficacy calculations are performed to establish the number of animals required to detect vaccine efficacy, defined as: 1. As a reduction in the number of infected animals (Vaccine efficacy > 85% or 60% for 6 and 10 animals, respectively). 2. As an increase in the number of challenges required for animals to become infected. (Vaccine efficacy > 77% or 62% for 6 and 10 animals, respectively) and 3. As a reduction in in virus load in the circulation in the vaccine groups versus the challenge control group. The minimal detectable alternative is 1.8 and 1.3 x standard deviations for 6 and 10 animals, respectively.

Only the minimum number of animals per group needed, will be used. Since historical data are available on infection in unvaccinated animals (bijlage 2), usually fewer animals can be used in the non-vaccinated challenge control group than in the vaccine groups.

B. The animals

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

The experiment will be performed in macaques, adult, M/F, n=180.

Macaque species have been extensively used in HIV vaccine research (Rivera-Hernandez et al., 2014; Del Prete et al., 2016; Garcia-Tellez et al., 2016). The most often used species are the rhesus macaque (*Macaca mulatta*) and cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*). Both species are susceptible to an array of SIV/SHIV viruses. For SIV as well as several SHIVs rhesus macaques show higher levels of virus replication and a more pronounced loss of CD4 T-cells after infection than cynomolgus macaques. Therefore, rhesus macaques are the preferred species for vaccine research against HIV. However, for some viruses it is not known which macaque species is the most susceptible and in those cases the choice of macaque species to use will depend on the robustness of the infection in that species. All animals are purpose bred and are either from our institute or obtained from a certified supplier. For experiments involving vaginal challenges, only female monkeys will be used. In other cases both male and female animals can be used. However, since there are immunological differences between males and females we prefer that for each individual experiment either all animals are male or all are female. This choice is also important with regard to the amount of blood needed to perform all assays. Male animals are bigger than female animals and therefore more blood per time point can be drawn from males. In case assays need to be performed which consume large amounts of blood, male monkeys are preferred above females. The number of animals requested is based on the assumption that each study will contain two vaccine groups and 1 control group, with up to 10 animals per group. The group size will be determined per experiment, based on power calculations specific for the experiment and the viral challenge strategy used. Variation in virus multiplication between animals has to be such that in a vaccine evaluation study significant protections against infection can be obtained with a limited number of animals per group This depends on the mode of challenge used: for one high dose challenge usually n=6 per group suffices, while for repeated low dose challenges n=10 per group may be required to reach statistical significance. As stated above, probably fewer animals may be needed in the non-vaccinated challenge control groups. In all, we anticipate performing a maximum of 6 such studies over a 5-year period using n=6/group with a maximum of 4 different vaccine candidates (or different combinations of routes of vaccination) + 1 control group per study (= 4 experimental groups + 1 control group, at n=6/group, with 6 studies, results in maximal of 180 animals).

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.

Animals that will be used in these experiments, have possibly been used in previous experiments. Animals that have been involved in previous HIV vaccine studies or that have pre-existing antibodies against HIV are not suitable. If immune responses after vaccinations are inadequate, the animals can be

re-used in other non-HIV related protocols. In view of the long life of the animals of this species reuse of animals will take place within the limitations described in art 1e of the Wet op de Dierproeven.

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 immune system is very complex and the *in vivo* interactions between virus and/or vaccine and host are not completely understood. At present, there is no *in vitro* model available that can mimic the human immune system sufficiently to study the potential of a vaccine to induce protective immune responses. Due to the complex interaction of HIV with different tissues and the role of local immunity in eradication of the virus, the efficacy of an HIV vaccine to protect against infection can only be adequately established in an animal model. HIV can only infect humans and chimpanzees and no other species. However, infection of non-human primates (NHP), such as macaques, with Simian Immunodeficiency Virus (SIV) leads to a disease that is similar to AIDS induced by HIV in humans. NHP have an immune system that most closely resembles that of humans. Also, the availability of many cross-reactive reagents makes it possible to study in detail the contribution of the innate immune system and to analyse vaccine induced immune responses and evaluate their role in the control of infection. In addition, vaccine strategies that aim to trigger immune responses through targeting of specific cell surface molecules or innate immune receptors have either limited cross reactivity to other animal species or trigger different cell types or different responses because of differences in receptor expression pattern or cell signalling pathways. These aspects are essential for the evaluation of HIV vaccines. For these types of vaccines new vaccination strategies as well as vaccine modalities are used that aim for the induction of cross protective cellular immune responses or induction of broadly cross neutralizing antibody responses or non-neutralizing antibody responses that become effective through interaction with innate immune cells. Here, the close homology between the immune system in NHP and humans is essential for proper induction and adequate analysis of these responses, allowing a better extrapolation to the human situation. Evaluation in NHP is therefore needed before clinical evaluation in humans can start. Other attempts for studying HIV-1 infection in small animals such as rats, mice, rabbits or cats were performed without success. The development of humanized mice, that are reconstituted with human immune cells, has made it possible to study HIV-1 infection and answer some specific research questions. However, their development requires complex surgical engineering. Moreover, they need to be generated *de novo* for each experiment, being tailored according to the immunological requirements of the research. In addition, anatomical differences exist, for example at the level of lymphoid organs that are not fully developed and a lack of several human immune cell lineages, in particular related to innate immune responses (Garcia et al, 2016).

Reduction

The number of animals needed per experiment will be based on statistical power calculation for achieving statistically significant induction of immune responses and a significant level of protection or reduction in virus load in the circulation between the vaccine groups and the challenge control group. Only the minimum number of animals needed will be used. Since historical data are available on infection in unvaccinated animals (bijlage 2), usually less animals can be used in the challenge control group than in the vaccine groups. Furthermore, we aim to evaluate multiple vaccine candidates in a single experiment, so that a single challenge control group can be used. This has to be weighed against the fact that in order to obtain significant differences in immune response between the vaccine groups, more animals per vaccine group may be needed.

Refinement

Before start of the experiment socially compatible animals will be selected to make social housing throughout the full length of the study possible. Furthermore, animals are trained to cooperate as much as possible for the invasive handlings, such as receiving the sedation. Another contribution to refinement will be the go/no go decision regarding challenging the animals depending on the immunological outcome of the vaccinations: only in case of vaccine induced immune responses against the virus, animals will be challenged. Otherwise no challenge will take place. Finally the low dose challenge model is also a form of refinement. This challenge model mimics the human situation of becoming infected, and increases the change to find (a level of) protection.

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

Animals will be socially housed with a socially compatible animal, whenever possible. There is an extensive program for enrichment in our institute that consists of playing material and methods to present food (<http://www.bprc.nl/en/welfare/>).

During the study animals will be observed daily by qualified and competent animal caretakers. In addition, at every time point that a handling is performed the animal will be weighed and closely examined. During the studies, animals will be monitored for clinical chemistry and haematology to avoid potential disease development. All handlings will be performed under sedation. Should changes occur in behaviour, appetite or stool then a veterinarian will be informed and measures will be discussed with the investigator and implemented. A clinical endpoint is defined on the basis of these daily observations in combination with weight loss and haematological parameters as described under point J. Possible local reactions on the injection site of the vaccine will be recorded at multiple time points using a scoring system that includes redness, swelling and induration. In case substantial induration is seen, then the wound will be treated and analgesics will be applied.

The "wet natuurbescherming" and "wet dieren" do not pose additional requirements that are needed for the type of studies proposed in this application.

Literatuur.

[REDACTED]

[REDACTED]

Garcia-Tellez, T., et al., 2016. [Non-human primates in HIV research: Achievements, limits and alternatives. Infection, Genetics and Evolution 46, 324-332.](#)

Holterman L, et al., 1999. [Specific passage of simian immunodeficiency virus from end-stage disease results in accelerated progression to AIDS in rhesus macaques. J Gen Virol.80 \(Pt 12\):3089-97.](#)

Holterman L, et al., 2001. [Characteristics of a pathogenic molecular clone of an end-stage serum-derived variant of simian immunodeficiency virus \(SIV\(F359\)\). J Virol. 75\(19\):9328-38.](#)

Rivera-Hernandez T, et al., 2014. [The contribution of non-human primate models to the development of human vaccines. Discov Med. 18\(101\):313-22.](#)

Del Prete GQ, Lifson JD, Keele BF, 2016. [Nonhuman primate models for the evaluation of HIV-1 preventive vaccine strategies: model parameter considerations and consequences. Curr Opin HIV AIDS. 11\(6\):546-554.](#)

Garcia, J.V., 2016. [In vivo platforms for analysis of HIV persistence and eradication. J. Clin. Invest. 126, 424-431.](#)

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.

Pain relief will be applied if necessary at the site of vaccine injection. Analgesics known not to interfere with the induction of the vaccine response will be used.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

1. Stress because of change in housing / adaptation stress.
2. Discomfort due to lymph node (LN) biopsies and gut biopsies.
3. Discomfort due to injection.
4. Stress because of sedation and recovery.
5. Disease symptoms due to the infection.
6. Discomfort due to single housing as a result that his/her cage mate has to be euthanized before the end of the study. Introducing a new cage mate will result in more stress than single housing for the remaining period of the study.

Explain why these effects may emerge.

1. Animals have to be moved to DM-III facilities because of the experimental infection with SIV/SHIV.
2. When LN biopsies are taken, this might cause local pain and irritations. Gut biopsies usually do not cause pain (according to veterinarians) but might cause some irritation in their throat.
3. When vaccines are given by injection, this can cause local pain and irritation.
4. Animals will be repeatedly sedated for vaccine delivery, blood sampling, virus infection. Recovery can involve nausea, vomiting, dizziness and confusion.
5. HIV infection can cause AIDS.
6. In case a cage mate has to be euthanized.

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

1. Animals will be socially housed, have an acclimatization period and enrichment is provided.
2. Animals will be sedated for taking LN and gut biopsies and analgesics will be applied. After taken LN biopsies the skin will be stitched.
3. Animals will be sedated for vaccine delivery. Only rarely are strong adverse effects seen. Should granuloma formation be observed, then the animal will be sedated, the wound will be cleaned and analgesics are applied.
4. Recovery of the animals will be monitored and the veterinarian will be consulted in case of problems.
5. Animals are monitored daily and weighed at each sedation. In case AIDS symptoms manifests (animals suffer from chronic diarrhea and show more than 10% body weight loss in combination with abnormal hematology parameters), the veterinarian is consulted.
6. Introducing a new cage mate in an ongoing study will result in more stress than single housing for the remaining period of the study.

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.

Animals are monitored daily. In case the first clinical symptoms of AIDS become manifest (animals suffer from chronic diarrhoea and show more than 10% body weight loss in combination with abnormal haematology parameters: these are AIDS-defining conditions and are "criteria for euthanasia"), the animals will be euthanized. In case an animal becomes sick but not related to the vaccination, and cannot be treated than the animal will be euthanized as well.

Indicate the likely incidence.

The percentage of animals reaching the end point (AIDS) will depend on the virus being used. Some SIV/SHIV viruses will only cause none to minimal effect while other viruses are more pathogenic. Even with pathogenic viruses AIDS symptoms will usually not develop before 26 weeks post infection. Usually the follow up period after SHIV infection is shorter than 26 weeks meaning that < 1% of the animal will face AIDS like symptoms. In case of SIV infection < 25% of the animals will face AIDS like symptoms in the timeframe as mentioned.

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 amount of discomfort is estimated as moderate. This is mainly caused by the frequent sedations due to immunizations, challenges and bleedings.

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 case the decision has been made to continue to challenge, all animals will be euthanized at the end of the study. Once animals become infected with SIV/SHIV different tissues/cells contain the virus even if no virus is present in the circulation. These latently infected cells can become active and start producing virus due to yet unknown stimuli. Therefore these animals cannot be re-used for other (non HIV related) studies.

In case no challenge will take place, the animals can be re-used in non-HIV related studies.

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

challenge stock. This precise measurement of the MID₅₀ is especially essential for the repeated low dose challenge model, because a small deviation will result in either infection of all control and vaccine animals or very low levels of infection in the control group, both of which make the results of the vaccine evaluation study un-interpretable (Roederer, 2015). Although rhesus macaques have proved to be more susceptible to infection with SIV and some SHIV strains than cynomolgous macaques (Reimann et al., 2005), this may be different for other SHIVs. Because it is very important to infect all control animals with a given MID₅₀ this dose therefore has to be titrated in the species which will be used for vaccine efficacy studies. It may therefore be necessary to evaluate a new virus in a second species.

Primary outcome parameters are: Virus replication.

Secondary outcome parameters are: Bodyweight, changes in leucocyte subset composition in peripheral blood.

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

HIV infection may be done by intravenous inoculation or via the mucosal compartments i.e. oral, intrarectal or intravaginal route. Administration of HIV via one of the mucosal routes may be done either at a single high dose, in which the virus is given once at typically 10-20 MID₅₀, or at a repeated low dose, where the virus is given at weekly intervals, usually at 1 MID₅₀ over 5-15 weeks. Blood is taken every week for the first 6 weeks and then by every 2 weeks until week 12 to determine the viral loads and kinetics of the virus in time in circulation and to monitor changes in clinical chemistry and haematology parameters and leucocyte subsets. In case of a multiple low dose challenge model, blood is taken every week until 6 weeks after the final challenge and then the same schedule is used as described above. At the end of the study the animals will be euthanized. However, when animals did not become virus positive, a re-challenge might be considered with a higher viral dose. The details of each study, regarding the route of infection, mode of challenge, viral dose, species and duration of the follow up period after challenge will be submitted for approval to the AWB.

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

The titration experiment, in which the virus is inoculated by a particular route with different amounts of virus, will be performed in groups of two animals for obtaining a rough estimate of the MID₅₀ and groups of 4-8 animals for a precise calculation of the MID₅₀. The first phase of these experiments, i.e. obtaining a rough estimate, can be omitted in case the virus has already been characterised in another laboratory. Experience in the past has shown that with this number of animals an adequate assessment can be made on the reproducibility of infection given a particular amount of virus. Via the so called "Karber" formula (Roederer, 2015) the minimum monkey/animal infectious dose (M/AID₅₀) can then be calculated for that virus stock.

Literatuur

[REDACTED]

[REDACTED]

Holterman L, et al., 1999. Specific passage of simian immunodeficiency virus from end-stage disease results in accelerated progression to AIDS in rhesus macaques. *J Gen Virol.*80 (Pt 12):3089-97.

Holterman L, et al., 2001. Characteristics of a pathogenic molecular clone of an end-stage serum-derived variant of simian immunodeficiency virus (SIV(F359)). *J Virol.* 75(19):9328-38.

Reimann KA, et al., 2005. Pathogenicity of simian-human immunodeficiency virus SHIV-89.6P and SIVmac is attenuated in cynomolgus macaques and associated with early T-lymphocyte responses. *J*

Virol. 79(14):8878-85.

Roederer M. 2015. Parsimonious Determination of the optimal infectious dose of a pathogen for Nonhuman Primate Models. PLoS Pathog. 11(8):e1005100.

B. The animals

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

The experiment will be performed in macaques, adult, M/F, n=56.

Most HIV vaccine studies will be performed in rhesus macaques (*Macaca mulatta*) but sometimes also cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*) can be used. Therefore evaluating the infectivity of a new SIV/SHIV virus must be evaluated in the corresponding macaques as well.

Assuming 2 animals per group, and 4 different doses to be tested via a particular route of administration plus a follow up experiment with 6 animals, and evaluation of 2 new viral stains, the total number of animals needed will be maximum 28. If an additional route of application is needed than the number of animals will be doubled.

In total 56 animals are the maximum needed for setting up infection models and to determine the infectivity of newly generated virus stocks or new SIV/SHIV viruses via different routes of infection in a period of 5 years.

All animals are purpose bred. Both male and female animals can be used, except when an intra-vaginal is used.

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.

Animals that will be used in these experiments, have possibly been used in previous experiments. Animals that have been involved in previous HIV vaccine studies or that have pre-existing antibodies against HIV are not suitable. In view of the long life of the animals of this species reuse of animals will take place within the limitations described in art 1e of the Wet op de Dierproeven.

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

Due to the complex interaction of SIV (as a model virus for HIV) with different tissues and the role of both systemic and local immunity in blocking virus transmission the efficacy of an HIV vaccine to protect against infection can only be adequately established in an animal infection model. Macaques are the only species susceptible for SIV/SHIV infection and therefore are the only animals which can be used to evaluate HIV vaccine candidates for their efficacy against SIV/SHIV. Furthermore the NHP have the advantage that they physiologically and immunologically most closely resemble humans. This has important implications, both for vaccine evaluation (explained in bijlage 1), as well as for the infection with SIV/SHIV, since development of a productive infection is dependent on the interaction between the virus and its target cells at the site of exposure as well as the local response of the innate and adaptive immune system. In order to test the efficacy of a vaccine candidate against a virus, one must establish first the virus dose to infect animals via a certain administration/infection route. When animals will be challenged with a (too) high amount of challenge virus, then a potential positive vaccine effect will not be observed because all animals will be infected. In case a too low amount of virus is used as challenge dose, the number of infected animals will be too low in the control group and a difference between

vaccinated and non-vaccinated animals can no longer be observed. Thus, first a virus titration study has to be performed to find the optimal infectious dose via a given route of administration/infection before this challenge dose can be applied in a vaccine efficacy study. As explained in bijlage 1, these aspects are especially important for the evaluation for HIV vaccines. The proper evaluation of these vaccines requires adequate infection models in NHP, which is the purpose of the studies proposed here.

Reduction

Experience from previous experiments has shown that the virus titration experiments described under A allow us to establish a MID50 value that is sufficiently reliable to be used for subsequent vaccine efficacy evaluation, with the use of a minimum number of animals. When a new virus or virus stock is used, for which there are no preliminary data available 12 to 16 animals suffice. Using the two-phase approach, a reduction of animals can be achieved: in the first phase, 2 animals per virus dilution (using 4 different dilutions) will give a rough estimation in the amount of virus dose needed to infect the animals. In the second phase, 4 to 8 animals are then sufficient to find the optimal infectious dose. For viruses for which more information is available a limited amount of 4 to 8 animals will suffice.

Refinement

Before start of the experiment socially compatible animals will be selected to make social housing throughout the full length of the study possible. Furthermore, animals are trained to cooperate as much as possible for the invasive handlings, such as receiving the sedation. Because the purpose is to find the optimal virus dose for challenge studies, the animals in titration studies will be euthanized as soon as the animals becomes clearly virus positive. Therefore, no long follow up period is required thus avoiding the animals to stay in study for an extended period of time and thus also avoiding the chance that (some) animals will develop AIDS. During the studies, animals will be monitored for clinical chemistry and haematology to avoid potential disease development. All handlings will be performed under sedation.

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

Animals will be socially housed with a socially compatible animal. There is an extensive program for enrichment in our institute that consists of playing material and methods to present food.

During the study, animals will be observed daily by qualified animal caretakers. Should changes occur in behaviour, appetite or stool then a veterinarian will be informed and measures will be discussed with the investigator and implemented. A clinical endpoint is defined on the basis of these daily observations in combination with weight loss and haematological parameters as described under point J. When this endpoint is reached (which is very unlikely during the timeframe of 12 weeks) the animal will be immediately euthanized. All handlings will be performed under sedation. On every time point where a handling is performed the animal will be weighed and closely examined.

Any other legal requirements will be met.

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.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

1. Stress because of change in housing
2. Stress because of sedation and recovery
3. Disease symptoms due to the infection

Explain why these effects may emerge.

1. Animals have to be moved to DM-III facilities because of the experimental infection with SIV/SHIV.
2. Animals will be repeatedly sedated for virus infection and blood sampling.
3. SIV/SHIV infection can cause AIDS. However, this is very unlikely in the timeframe (12 weeks) of the studies.

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

1. Animals will be socially housed and enrichment is provided.
2. Recovery of the animals is monitored and the veterinarian will intervene if animals do not recover fast enough.
3. Animals are monitored twice daily and a clinical scoring list is used to record the clinical symptoms. When a certain pre-determined clinical score is reached i.e. in case AIDS symptoms manifests: animals suffer from chronic diarrhea and show more than 10% body weight loss in combination with abnormal hematology parameters, the animals will be euthanized.

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.

Animals are monitored daily. In case the first clinical symptoms of AIDS become manifest (animals suffer from chronic diarrhoea and show more than 10% body weight loss in combination with abnormal haematology parameters: these are AIDS-defining conditions and are "criteria for euthanasia"), the animals will be euthanized. Animals will also be euthanized in case they become seriously sick however not as a result of SIV infection.

Indicate the likely incidence.

The percentage of animals reaching the end point (AIDS) will depend on the virus being used. Some SIV/SHIV viruses will only cause none to minimal effect while other viruses are more pathogenic. Even with pathogenic viruses AIDS symptoms will usually not develop before 26 weeks post infection. Usually the follow up period after SHIV infection is shorter than 26 weeks meaning that < 1% of the animal will face AIDS like symptoms. In case of SIV infection < 25% of the animals will face AIDS like symptoms in the timeframe as mentioned. The timeframe of the proposed studies has a maximum of 12 weeks and therefore the expected chance to develop AIDS is even less.

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 amount of discomfort is estimated as moderate. This is mainly caused by the frequent sedations due to the challenge and bleedings and the development of clinical symptoms of AIDS on some of the animals.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

All animals will be euthanized at the end of the study. Once animals become infected with SIV/SHIV different tissues/cells contain the virus even if no virus is present in the circulation. These latently infected cells can become active and start producing virus due to yet unknown stimuli. Therefore, these animals can not be re-used for other (non HIV related) studies.

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: AVD [REDACTED] 20171544
2. Titel van het project: Evaluation of novel HIV vaccine candidates for immunogenicity and capacity to protect against SIV/SHIV virus infection in macaques
3. Titel van de NTS: Onderzoek naar de beschermende werking van nieuwe HIV vaccins
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
 - wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: [REDACTED]
 - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
 - e-mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: 01-05-2017
 - aanvraag compleet: 01-05-2017
 - in vergadering besproken: 12-05-2017
 - anderszins behandeld: 18-05-2017
 - termijnonderbreking(en) van 15-05-2017 tot 16-05-2017 en 18-05-2017 tot 22-05-2017
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 16-05-2017 en 22-05-2017
 - advies aan CCD: 22-05-2017
7. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.
De aanvrager heeft het projectvoorstel afgestemd met de IvD en het met instemming van de IvD ingediend bij de DEC.

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 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: 15-05-2017 en 18-05-2017
 - Gestelde vraag/vragen: Enige tekstuele aanpassingen, aanvullende informatie betreffende innovatie op gebied van HIV vaccin ontwikkeling, nadere uitleg over wanneer SIV of SHIV gebruikt moet worden, criteria voor het overgaan tot experimentele infectie (wanneer is een immuun respons adequaat om te gaan testen of bescherming tegen infectie gevonden kan worden), het belang van een juiste bepaling van de te gebruiken hoeveelheid virus voor challenge, aanvullende uitleg over de twee fase benadering voor bepaling van de benodigde hoeveelheid virus, aanvullende informatie over verfijning en humane eindpunten.
 - Datum antwoord: 16-05-2017
 - Verstrek(e) antwoord(en): Het project is aangepast in de NTS (3.1 uitleg over gebruik SIV of SHIV), het projectvoorstel (3.1 innovatie op HIV vaccin gebied en nadere uitleg over gebruik SIV of SHIV), bijlage 1 (A. beschrijving voorwaarden voor infectie, D. refinement, J. beschrijving humane eindpunten bij overige oorzaken van ziekte) en bijlage 2 (A. aanvullende uitleg over noodzaak voor bepaling juiste hoeveelheid virus en twee fase benadering, D. refinement, J. beschrijving humane eindpunten bij overige oorzaken van ziekte).
 - De antwoorden hebben wel 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. Het project is vergunningplichtig.
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. Is de DEC competent om hierover te adviseren? De commissie heeft voldoende expertise, inbegrepen de immunologie, virologie, vaccinologie, statistische analyse, onderzoek met niet-humane primaten, en toepassing van alternatieven op deze gebieden. Ook is er voldoende expertise op gebied van ontwerp van dierproeven, proefdiergeneeskundige praktijk, het houden en verzorgen van dieren, ethiek en proefdieren en hun bescherming. De DEC heeft ruime ervaring met het beoordelen van onderzoek naar vaccins tegen virale infecties in niet-humane primaten.
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. Een van de DEC leden was betrokken bij de aanvraag. Deze persoon heeft zich teruggetrokken van de vergadering bij de bespreking van de aanvraag en overigens geen aandeel gehad in de afweging en advisering.

C. Beoordeling (inhoud)

1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft. Het voorgestelde onderzoek bestaat uit twee fasen, te weten 1) evaluatie van de effectiviteit en veiligheid van kandidaat vaccins tegen HIV in niet-humane primaten en 2) bepalen van de optimale hoeveelheid virus die gebruikt moet worden om in de vaccin studies te kunnen testen of een vaccin beschermt tegen infectie. Vaccins die getest gaan worden in dit model zijn innovatief en nog niet eerder getest in niet-humane primaten. De subdoelen sluiten logisch aan bij het hoofddoel en vormen een samenhangend geheel. Het verwachte ongerief voor de dieren is duidelijk omschreven en de uitkomsten van deze experimenten zijn helder en meetbaar. Het aantal dieren is realistisch ingeschat en voor zover mogelijk statistisch onderbouwd. De klinische eindpunten zijn duidelijk gedefinieerd.
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). Er is, zover de DEC kan overzien, geen tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan.
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 aangegeven doelcategorie, te weten 'translationeel of toegepast onderzoek', sluit aan bij het projectvoorstel. In deze projectaanvraag worden nieuwe kandidaat HIV vaccins getest op hun vermogen om een goede immuunrespons te induceren die bescherming biedt tegen HIV infectie en op veiligheid. Het nieuwe van deze vaccins bestaat uit het feit ze ontworpen worden met nieuwe moleculair biologische technologieën en deels zijn aangepast naar aanleiding van een betere karakterisering van de antistof respons in HIV besmette personen.

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. Het directe doel van het project is het testen van nieuwe anti HIV vaccins op veiligheid en effectiviteit in niet-humane primaten. Het uiteindelijke doel is de implementatie van nieuwe vaccins ter bescherming van mensen tegen HIV infectie. Momenteel zijn meer dan 37 miljoen mensen besmet met HIV en worden jaarlijks meer dan 2 miljoen mensen besmet met HIV. Met de ontwikkeling van anti-virale medicijnen kan het virus in het merendeel van de HIV geïnfecteerde mensen goed onderdrukt worden. Echter het virus blijft aanwezig en moet constant onderdrukt worden door het levenslang gebruik van medicijnen. De kosten, problemen bij de distributie en de noodzaak om de medicijnen dagelijks in te nemen maken dat gebruik in met name derde wereld landen onvoldoende is, waardoor jaarlijks meer dan 1 miljoen mensen overlijden aan de gevolgen van AIDS. Met een effectief vaccin kan de verdere verspreiding van HIV voorkomen worden. De onderzoekers willen de veiligheid en effectiviteit van HIV vaccin kandidaten testen in niet-humane primaten als laatste stadium voor toepassing in de mens. Het betreft hier *pre-klinisch* onderzoek. Er is binnen dit onderzoek een reële relatie tussen het directe doel en het uiteindelijke doel.
5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden (*Zie*

Praktische handreiking ETK: Stap 2.B en tabel 1; zie bijlage I voor voorbeeld). De belangrijkste belanghebbenden in dit translationele project dat gericht is op de ontwikkeling van een effectief vaccin tegen HIV zijn de te beschermen personen, de proefdieren en het onderzoeksveld.

Voor de te beschermen personen is het beschikbaar komen van een effectief vaccin tegen HIV van groot belang, aangezien het infectie met HIV of anders het ontstaan van AIDS en sterfte kan voorkomen. Ook kan hierdoor gebruik van anti-virale middelen, met de daaraan verbonden hoge kosten en bijwerkingen, vermeden worden.

Het belang voor de samenleving is dat infectie met HIV en verspreiding van het virus onder de menselijke populatie voorkomen wordt. Dit resulteert in; een sterke verbetering van de gezondheid van grote groepen mensen, het voorkomen van sociale stigmatisering, een sterke beperking van de uitgaven voor begeleiding, verpleging en medicatie, en in “resource poor settings” minder sterfte ten gevolge van HIV infectie.

Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal worden aangetast, de dieren zullen stress ondervinden, soms ziek worden en kunnen enige mate van pijn ondervinden.

Het onderzoeksveld krijgt nieuwe informatie die wordt gedeeld d.m.v. publicatie(s). Dit onderzoek kan leiden tot meer inzicht in het vermogen van diverse typen vaccins om diverse typen immuun responsen op te wekken en de immuun mechanismen die een rol spelen bij vaccin gemedieerde bescherming tegen infectie.

6. Is er aanleiding voor de DEC om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken? Er zijn geen substantiële milieueffecten te verwachten binnen de kaders of ten gevolge van dit project.

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. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn boven iedere twijfel verheven gezien de wetenschappelijke output, de verworven interne- en externe financiering 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. 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. 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*).

- 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)

De keuze voor deze diersoort is gebaseerd op bewezen gevoeligheid voor infectie met virussen die grote gelijkenis met HIV vertonen en een vergelijkbaar ziektebeeld geven. Bovendien vertoont deze diersoort zeer grote fysiologische en immunologische overeenkomsten met de mens. De kandidaat vaccins zijn tevoren gekarakteriseerd in *in vitro* en *in vivo* (veelal knaagdieren) modellen. In de laatste fase van de preklinische ontwikkeling van kandidaat vaccins is het echter noodzakelijk om de effectiviteit en veiligheid van de kandidaat vaccins te onderzoeken in een diermodel waarin de aard en verloop van de ziekte grote overeenkomsten vertonen met de mens. Vaccin kandidaten kunnen niet afdoende in andere diermodellen of alternatieve modellen worden getest met oog op bescherming tegen infectie in de mens. De resultaten verkregen in dit proefdiermodel kunnen de sterkte van de immuunrespons van de kandidaat HIV vaccins in de mens voorspellen. De eventuele nadelige effecten (bijvoorbeeld als gevolg van de complexiteit van immuunresponsen en hun interactie met het infectieus agens) van de kandidaat vaccins kunnen in dit diermodel worden bepaald.

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 huisvesting en verzorging voldoet ten volle aan de vereisten in bijlage III.
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 is correct als matig ingeschat op basis van ervaring met vaccin evaluatie en SIV/SHIV infectie studies in niet-humane primaten en wordt veroorzaakt door de experimentele technieken, de vaccinaties en de klinische symptomen ten gevolge van de infectie. In combinatie zijn de gevolgen van deze handelingen terecht als matig ongerief ingeschat. Door implementatie van humane eindpunten op basis van klinische symptomen en hematologische parameters en door het aanhouden van een gelimiteerde infectie periode wordt ernstig ongerief vermeden. De dieren voor de experimenten zijn speciaal voor dit doel gefokt, en zullen als sociaal compatibel duo worden gehuisvest. Een dier kan door het uit studie nemen van de kooigenoot (ten gevolge van bereiken humaan eindpunt) gedurende een deel van de studie solitair gehuisvest zijn.
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 wordt aangetast door de dieren te vaccineren en te infecteren met HIV en het eventueel nemen van biopten. De dieren worden aan het eind van de studie, of eerder bij het bereiken van een humaan eindpunt, gedood. Hierdoor wordt voorkomen dat de dieren de ziekte AIDS ontwikkelen. Ook indien na toediening van het virus in de dieren geen virus kan worden aangetoond of de dieren na enige tijd virus negatief worden is doden van de dieren noodzakelijk aangezien het virus nog steeds aanwezig kan zijn in de organen.
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. Naar de mening van de DEC zijn de humane eindpunten zorgvuldig beschreven (gebaseerd op algemene en specifieke criteria) en is de kans dat dieren een humaan eindpunt zullen bereiken adequaat ingeschat.

14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Er is geen *in vitro* model beschikbaar waarin een immuunrespons kan worden opgewekt, of dat de beschermende werking van vaccins kan meten. Er kan veel informatie betreffende specificiteit en hoogte van de immuunrespons worden verkregen uit *in vitro* assays die zullen worden uitgevoerd met het materiaal afkomstig van de dieren, maar het gebruik van proefdieren kan nog niet worden overgeslagen. Of een vaccin bescherming kan bieden tegen HIV infectie kan alleen zinvol getest worden in niet humane primaten. De chimpansee is het enige dier dat met HIV-1 geïnfecteerd kan worden. Echter experimenten op chimpansees zijn niet toegestaan. Het enige alternatief vormt de infectie van makaken met Simian Immunodeficiency Virus (SIV) en HIV/SIV recombinant virussen (SHIV). Gehumaniseerde muizen modellen voldoen niet omdat het in deze dieren aangebrachte humane immuun systeem onvoldoende werkt om vaccins te kunnen testen. Voorwaarde voor vaccin studies in niet humane primaten is wel dat producten die in deze dieren getest gaan worden in het eindstadium van de ontwikkeling zijn. In de experimenten in niet-humane primaten kunnen inzichten in effectiviteit en mogelijke bijwerkingen naar voren komen die bij onderzoek met andere diersoorten gemist zouden zijn. Deze stap over te slaan en direct onderzoek met menselijke vrijwilligers te verrichten is in dit stadium van de vaccin ontwikkeling daarom dan ook niet verantwoord.
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. De proefopzet wordt telkens gebaseerd op de concrete experimentele vraagstelling. Het aantal te gebruiken dieren per behandelgroep wordt bepaald met behulp van statische powerberekeningen op basis van de verwachte effect grootte en spreiding van de data. Voor het bepalen van de te gebruiken hoeveelheid virus voor infectie (bijlage 2), wordt het aantal dieren beperkt door een gefaseerde uitvoering, waarbij eerst met grote verdunningsstappen in een beperkt aantal dieren een ruwe bepaling gedaan wordt en daarna in een beperkt tweede experiment waarbij een of twee dosis worden gebruikt een fijne afstemming plaats vindt. Bij het onderzoeken van meerdere vaccin kandidaten binnen een proefopzet zal het aantal controlegroepen beperkt worden.
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. De uitvoering is verfijnd door gebruik te maken van sociaal gehuisveste dieren die goed aan mensen gewend zijn, de dieren zijn bovendien getraind om zo veel mogelijk mee te werken aan bepaalde dier technische handelingen, waardoor ze minder stress ervaren. Sedatie en pijnbestrijding zullen worden toegepast wanneer geïndiceerd. Bij onverwacht grotere welzijnsaantasting dan voorzien zal een humaan eindpunt worden toegepast. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.
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 onderhavige projectaanvraag worden dieren van beide geslachten gebruikt, tenzij vrouwtjes nodig zijn vanwege een intra-vaginale infectie methode.

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. Wanneer het experiment wordt beëindigd voordat infectie met SIV of SHIV plaats vindt zullen de dieren in leven blijven. Dieren waarbij SIV of SHIV is toegediend zullen aan het einde van het experiment worden gedood. Hierdoor wordt voorkomen dat de dieren de ziekte AIDS ontwikkelen indien het vaccin niet beschermend blijkt te werken. Ook indien na toediening van het virus in de dieren geen virus kan worden aangetoond of de dieren na enige tijd virus negatief worden is doden van de dieren noodzakelijk aangezien het virus nog steeds aanwezig kan zijn in de organen. Deze dieren kunnen een risico vormen voor mens en de andere dieren. Daarnaast worden dieren ge-euthanaseerd wanneer humane eindpuntcriteria worden bereikt, dit om verder ongerief te voorkomen (zoals gedefinieerd in de projectaanvraag). Er wordt een passende dodingsmethode gebruikt (conform bijlage IV van de richtlijn).
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. Hergebruik wordt altijd overwogen en ook nagestreefd (binnen de kaders omtrent dierenwelzijn en wetenschappelijke kwaliteit).

NTS

21. Is de niet-technische samenvatting een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd? Naar de mening van de DEC beschrijft de niet-technische samenvatting het project inhoudelijk correct en in begrijpelijke taal.

D. Ethische afweging

1. Benoem de centrale morele vraag. Rechtvaardigt het testen van nieuwe vaccins tegen HIV het ongerief dat niet-humane primaten wordt aangedaan? Is het gebruik van niet-humane primaten in dit geval gerechtvaardigd of kan de gewenste informatie ook verkregen worden door het inzetten van andersoortige proefdieren of andere onderzoeks modellen.
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.

De waarden voor de samenleving zijn gelegen in het ontwikkelen van vaccins tegen HIV. Momenteel is geen effectief vaccin beschikbaar en raken jaarlijks meer dan 2 miljoen mensen besmet met HIV. Meer dan 1 miljoen mensen overlijden jaarlijks aan de gevolgen van AIDS. De voordelen zijn zowel economisch (minder ziekte, minder zorgkosten) als bevorderlijk voor het algemene welzijn van de samenleving (minder doden, minder zieken).

Voor de proefdieren zijn integriteit, welzijn en de autonomie in het geding, door de dieren handelingen met een wetenschappelijk doel te laten ondergaan. Ze kunnen hierdoor ziek worden en enige pijn ondervinden door bloedafnames, injecties, biopten en infectie met SIV/SHIV. Dit resulteert in matig ongerief voor de dieren.

De waarden voor het onderzoeksveld zijn toenemend wetenschappelijk inzicht in de werking van potentiële HIV vaccins en de respons van het immuunsysteem hierop, en in voorkomende gevallen ook de interactie tussen het virus en de gastheer. Dit is een voordeel voor het onderzoeksveld omdat niet-humane primaten goed modelleren voor deze fenomenen bij de mens en dit onderzoek ook bijdraagt aan extrapolatie naar de mens. Daarmee is dit onderzoek informatief en het is de uitdrukkelijke bedoeling om dit te publiceren.

Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit werk leiden tot het verkrijgen van vaccins die beschermen tegen HIV infectie. Het verwachte ongerief voor de dieren valt daardoor moreel te verantwoorden.

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 concludeert dat de belangen van de samenleving die worden nagestreefd in dit project zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de betrokken proefdieren.

Het onderzoek is van groot belang voor mensen, omdat het ontwikkelen van een effectief vaccin HIV infectie kan voorkomen. Daarnaast kan dit onderzoek meer inzicht geven in welke eigenschappen een vaccin moet hebben om effectief te kunnen beschermen tegen HIV en de onderliggende immuun-mechanismen van bescherming.

De kennis en kunde van de aanvragers wordt onderbouwd door eerder onderzoek naar de immunogeniciteit, veiligheid en effectiviteit van vaccins tegen infectieziekten, en de vereiste expertise en voorzieningen voor dergelijk onderzoek met niet-humane primaten. Reeds meer dan 20 jaren wordt er in de instelling onderzoek verricht aan HIV-infectie en vaccins tegen HIV. De gekozen strategie voor infectie en vaccinatie, alsmede het management van dierenwelzijn, is mede gebaseerd op ervaringen uit deze eerdere studies. De keuze voor deze diersoort is gebaseerd op bewezen gevoeligheid voor infectie met sterk op HIV gelijkende virussen en de zeer grote fysiologische en immunologische overeenkomsten met de mens. De dieren zijn specifiek gefokt voor gebruik in onderzoek.

De haalbaarheid van de doelstellingen van dit project wordt als hoog ingeschat. De kandidaat vaccins zijn in gevorderde stadia van ontwikkeling. De kandidaat vaccins zijn tevoren gekarakteriseerd in *in vitro* en *in vivo* (veelal knaagdieren) modellen. In de laatste fase van de preklinische ontwikkeling van kandidaat vaccins is het echter noodzakelijk om de effectiviteit en veiligheid van de kandidaat vaccins te onderzoeken in een diermodel waarin de aard en verloop van de ziekte, alsmede de immuunresponsen, grote overeenkomsten vertonen met de mens. Vaccin kandidaten kunnen niet in andere diermodellen of alternatieve modellen worden getest op bescherming tegen infectie in de mens. De effecten (bijvoorbeeld als gevolg van de complexiteit van immuunresponsen en hun interactie met het infectieus agens) van de kandidaat vaccins kunnen in dit diermodel goed worden onderzocht en ook kunnen eventuele nadelige effecten aan het licht

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

E. Advies

1. Advies aan de CCD
 - De DEC adviseert de vergunning te verlenen.
 - ✓ De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
 - ✓ Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.
 - Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist
 - Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...
 - De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
 - De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen:...
 - De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...
 - De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...
2. Het uitgebrachte advies kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt in de DEC. Indien gebaseerd op een meerderheidsstandpunt, specificieer het minderheidsstandpunt op het niveau van verschillende belanghebbenden en de waarden die in het geding zijn. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus. De belanghebbende die lid is van de DEC heeft geen aandeel gehad in de totstandkoming van dit advies.
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 zijn geen knelpunten ondervonden; de inherente ethische dilemma's zijn hierboven uitgebreid uiteengezet.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag



**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
AVD [REDACTED] 20171544
Bijlagen
2

Datum 24 mei 2017
Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 24 mei 2017. Het gaat om uw project "Evaluation of novel HIV vaccine candidates for immunogenicity and capacity to protect project? against SIV/SHIV virus infection in macaques.". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD5020020171544. 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:

24 mei 2017

Aanvraagnummer:

AVD [REDACTED] 20171544

Datum:
24 mei 2017
Aanvraagnummer:
AVD [REDACTED] 20171544

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: [REDACTED]

Naam instelling of organisatie: [REDACTED]

Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: [REDACTED]

KvK-nummer: [REDACTED]

Straat en huisnummer: [REDACTED]

Postbus: [REDACTED]

Postcode en plaats: [REDACTED]

IBAN: [REDACTED]

Tenaamstelling van het
rekeningnummer: [REDACTED]

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]

Functie: [REDACTED]

Afdeling: [REDACTED]

Telefoonnummer: [REDACTED]

E-mailadres: [REDACTED]

Datum:
24 mei 2017
Aanvraagnummer:
AVD [REDACTED] 20171544

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam:
Functie:
Afdeling:
Telefoonnummer:
E-mailadres:

[REDACTED]

Gegevens gemachtigde

Naam:
Postbus:
Postcode en plaats:

[REDACTED]

Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Nee

Wat mag de gemachtigde doen?

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

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u?

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

Over uw project

Geplande startdatum: 1 januari 2018

Geplande einddatum: 1 januari 2023

Titel project: Evaluation of novel HIV vaccine candidates for immunogenicity and capacity to protect project? against SIV/SHIV virus infection in macaques.

Titel niet-technische samenvatting: Onderzoek naar de werkzaamheid en effectiviteit van nieuwe HIV vaccins.

Naam DEC:

Postadres DEC:

E-mailadres DEC:

Datum:

24 mei 2017

Aanvraagnummer:

AVD [REDACTED] 20171544

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: Melding Machtiging
 DEC-advies

Ondertekening

Naam:

Functie:

Plaats:

Datum: 1 mei 2017



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag



**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
AVD [redacted] 20171544
Bijlagen
2

Datum 24 mei 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur
Factuurdatum: 24 mei 2017
Vervaldatum: 23 juni 2017
Factuurnummer: 171544

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD [redacted] 20171544	€ 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.

Antwoord op vragen van de CCD betreffende project aanvraag AVD █████ 20171544 “Evaluation of novel HIV vaccine candidates for immunogenicity and capacity to protect against SIV/SHIV virus infection in macaques”.

Beste Leden van de CCD. Op onze project aanvraag AVD █████ 20171544 “Evaluation of novel HIV vaccine candidates for immunogenicity and capacity to protect against SIV/SHIV virus infection in macaques” hebben we een aantal vragen ter verdere verduidelijking van u ontvangen. Hieronder vind u onze puntgewijze beantwoording/verduidelijking (gewoon lettertype) op de door u gestelde vragen (vet gedrukt)

-Onderzoek met niet-humane primaten mag alleen worden uitgevoerd als de doelstelling niet kan worden behaald met een andere diersoort. U geeft in uw aanvraag weliswaar aan dat het onderzoek niet in andere diersoorten uitgevoerd kan worden, maar onderbouwt dit maar zeer beperkt. U wordt (per diersoort) verzocht uitgebreider te onderbouwen waarom andere diersoorten niet gebruikt kunnen worden. Indien een deel van het vaccinonderzoek wel met een andere diersoort uitgevoerd kan worden, wordt u verzocht dit ook te beschrijven.

De ontwikkeling van een nieuw kandidaat vaccin tegen HIV vindt in een aantal stadia plaats. In eerste instantie wordt met behulp van in vitro analyse gekeken naar de structurele eigenschappen van het vaccin en eventueel de interactie met diverse celtypen. Vervolgens wordt in een diersysteem gekeken of het vaccin een immuun respons kan opwekken. Hiervoor zijn diverse diersystemen geschikt. Deze experimenten worden veelal in knaagdieren of konijnen verricht. Met behulp van deze informatie wordt duidelijk of een vaccin kandidaat immunogeen is en of in principe de gewenste immuun respons wordt geïnduceerd. Er zijn echter belangrijke immunologische verschillen tussen knaagdieren/konijnen en de mens. Een beschermend vaccin tegen HIV moet een zeer specifieke reactie oproepen die een bepaald type T-cel respons (polyfunctionele CD4 en cytotoxische CD8 respons) en/of antistof respons (gericht tegen bepaalde delen van het HIV envelop deel (o.a. V1V2), waarbij de antistoffen daar ook op een bepaalde manier aan binden). Deze specifieke responsen worden beïnvloed door de opbouw van het immuun systeem en kunnen alleen volledig bestudeerd worden in de mens of in non humane primaten, aangezien deze dieren wat betreft hun adaptive en innate afweersysteem zeer grote overeenkomsten vertonen met de mens. Direct testen in de mens is in dit stadium van de vaccin ontwikkeling niet verantwoord. Er zijn te veel mogelijke vaccin kandidaten. Het is in dit stadium nog niet voldoende duidelijk of al deze kandidaten ook in de mens de gewenste immuun respons zullen opwekken. Ook kan in geen van de bovenstaande diersoorten getest worden of de opgewekte immuunrespons(en) voldoende is (zijn) om bescherming tegen infectie te kunnen geven. Alleen in non humane primaten kan bescherming tegen infectie gemeten worden, aangezien alleen non humane primaten gevoelig zijn voor virussen die in voldoende mate overeenkomen met HIV bij de mens (dit zijn SIV waaruit het HIV-2 virus dat bij de mens voorkomt ontstaan is en HIV/SIV recombinant virussen). Zoals in het

projectvoorstel is beschreven kunnen gehumaniseerde muizen geïnfecteerd worden met HIV-1. Echter in deze dieren is het humane immuun systeem onvoldoende gereconstitueerd om ook een goede immuun respons op te wekken naar vaccinaties. Dus alhoewel in dat model men wel onderzoek kan doen naar HIV-1 infectie kunnen HIV vaccins in dat model niet getest worden. Tenslotte is voorafgaand aan toepassing in de mens nadere analyse van mogelijke bijwerkingen nodig in een aan de mens verwant diermodel, aangezien sommige bijwerkingen juist naar voren kunnen komen wanneer het vaccin interacteert met een op de mens gelijkend immuun systeem. Alhoewel diverse diermodellen een rol spelen in HIV vaccin evaluatie is in het laatste stadium van de vaccin ontwikkeling, voorafgaand aan klinische evaluatie, testen in non humane primaten noodzakelijk aangezien alleen in dit model kan worden vastgesteld of het vaccin in een sterk op de mens gelijkend immuun systeem de gewenste immuun respons zal oproepen en of die respons ook bescherming tegen infectie kan geven en bovendien veilig zijn voor toepassing bij de mens. Bovendien kunnen risico's die ontstaan wanneer het vaccin de context van een humaan immuun systeem wordt toegediend alleen in dit model bepaald worden.

U beschrijft een aantal keuzemomenten en criteria op basis waarvan besluiten worden genomen. Een aantal criteria zijn niet of niet in voldoende mate beschreven.

Keuzemomenten:

1. Besluit om al dan niet door middel van experimentele infectie te testen of een vaccin bescherming kan bieden tegen infectie.
Na vaccinatie wordt zowel inductie van antistoffen als van cellulaire immuun responsen bestudeerd. Zoals in het format projectvoorstel dierproeven onder 3.4.1. is aangegeven wordt experimentele infectie allen uitgevoerd als duidelijk meetbare immuun responsen tegen het virus meetbaar zijn. In bijlage 1 staat beschreven dat deze immuun responsen voldoende sterk moeten zijn om aannemelijk te maken dat bescherming tegen infectie tot de mogelijkheden behoort. Welke responsen dit precies zijn hangt van het type vaccin af. Sommige vaccins zijn met name gericht op het induceren van een sterke cytotoxische T-cel respons die in een vroege fase van de infectie de met HIV geïnfecteerde cellen kan vernietigen. In dit geval is met name een polyfunctionele (productie van meerder cytokines per T-cel tegelijk) en inductie van een CD8 T-cel respons van belang. Indien deze respons duidelijk meetbaar aanwezig is zal worden over gegaan tot experimentele infectie. Bij vaccins die met name gericht zijn op inductie van neutraliserende antistoffen zal de neutraliserende capaciteit van de opgewekte immuun respons eerst in vitro bepaald worden. Er zal alleen tot experimentele infectie worden overgegaan indien neutraliserende activiteit gevonden is tegen het voor de infectie te gebruiken virus.
2. Besluit welk virus gebruikt gaat worden voor de experimentele infectie.
Het te gebruiken virus zal deels afhangen van het te testen vaccin. Een vaccin dat met name gericht is op inductie van een beschermende T-cel respons moet bescherming kunnen bieden tegen SIV. SIV is in dit geval het meest geschikte virus aangezien het wat betreft verloop van de infectie en ziekte beloop sterk vergelijkbaar is met HIV bij de mens. Voor een vaccin dat met name gericht is op inductie van neutraliserende antistoffen zal gekozen worden voor een recombinant virus, waarbij de envelop afkomstig is van HIV en de overige

structurele eiwitten van SIV (SHIV). Er zijn zowel makkelijk als moeilijk neutraliseerbare SHIVs. Zoals aangegeven onder 3.4.1. zal wanneer sprake is van een geheel nieuw vaccin concept waarover nog weinig informatie beschikbaar is in het algemeen gekozen worden voor een SHIV die homoloog is aan het vaccin en meestal relatief makkelijk neutraliseerbaar is. Bij vaccine kandidaten die gebaseerd zijn op een vaccin strategie die reeds eerder, weliswaar in andere vorm, is toegepast zal gekozen worden voor heterologe, moeilijker neutraliseerbare virussen die dicht bij de virussen staan die in de humane populatie circuleerd.

3. Route van experimentele infectie en wijze van toediening.
Veruit de meeste infecties met HIV vinden plaats via de mucosa (zowel rectaal als vaginaal). Dit is dan ook de standaard te gebruiken route van infectie voor het testen van de beschermende werking van een vaccin. Bij deze wijze van infectie zal bij de mens normaal gesproken blootstelling aan een relatief geringe hoeveelheid virus plaats vinden. Doordat blootstelling echter meerdere malen plaats vindt kan uiteindelijk toch infectie optreden. Om dit te modelleren wordt bij non humane primaten daarom voor een repeated low dose challenge methode gekozen. Bij infectie via bloed/bloed contact worden waarschijnlijk relatief grote hoeveelheden virus overgedragen dat zich bovendien snel over het lichaam verspreidt. Bescherming tegen infectie door middel van vaccinatie zal zeer moeilijk te realiseren zijn. Echter onderdrukking van het virus door een vaccin dat een zeer sterke T-cel afweer oproept is misschien wel mogelijk. Alleen voor vaccin kandidaten die een zeer sterke T-cel respons oproepen kan deze route van infectie als test model gebruikt worden. Hierbij wordt gekozen voor een single high dose challenge methode.
4. Bepaling van de te gebruiken hoeveelheid virus (bijlage 2).
De te gebruiken hoeveelheid virus is direct gekoppeld aan het gekozen infectie model. Bij een repeated low dose challenge moet een dosis gekozen worden die 50% van de dieren infecteert per challenge. Er zijn dan gemiddeld 7 challenges nodig om 99% van de dieren (dus alle controle dieren) te infecteren. Indien in de gevaccineerde dieren significant meer challenges nodig zijn om de dieren te infecteren duidt dit op bescherming door het vaccin (zie 3.4.1). Bij een infectie model waarbij een eenmalige hoge dosis virus wordt gebruikt wordt meestal een 10 tot 20 keer hogere hoeveelheid virus gebruikt, zodat alle dieren binnen de controle groep geïnfecteerd zullen raken. In beide gevallen is bepaling van de dosis waarbij 50% van de dieren geïnfecteerd raken (MID_{50}) het uitgangpunt. Het keuzemoment bestaat er uit of voor de bepaling van de juiste hoeveelheid virus een of twee experimenten nodig zijn. Het eerste experiment betreft het toedienen van virus aan telkens twee dieren over een dose range van vier of meer 10 voudige verdunningen. Op deze manier kan met gebruik van een gering aantal dieren een ruwe schatting verkregen worden. Deze fase is alleen nodig als het virus preparaat nog niet eerder is gebruikt op ons of een ander instituut. Indien het virus preparaat al eerder is gebruikt op een ander instituut, maar niet op ons instituut dan is alleen fase twee noodzakelijk. In deze fase wordt maar 1 of hooguit 2 dosis van het virus gebruikt, maar dan in meerdere dieren per dosis. Op deze manier kan een exacte berekening van de MID_{50} plaats vinden.

-U geeft bijvoorbeeld aan dat immunogeniciteit van een

kandidaatvaccin bewezen moet zijn in andere diersoorten, tenzij dit niet mogelijk is vanwege het type vaccin. Aangezien u aangeeft dat onderzoek naar HIV vaccins niet in andere diersoorten plaats kan vinden, is de vraag in hoeverre vooronderzoek in andere diersoorten voorspellend is voor de effectiviteit van een kandidaatvaccin.

Onderzoek in andere diersoorten kan alleen aangeven of een vaccin een immuunreactie zal kunnen oproepen. Door deze eerste evaluatie in andere diersoorten zullen vaccins die niet voldoende immunogeen zijn afvallen en wordt voorkomen dat non humane primaten of de mens onnodig worden blootgesteld aan een vaccin dat totaal onwerkzaam is. Vervolgens kan alleen in non humane primaten vastgesteld worden of een vaccin ook effectief is (dus beschermen kan tegen infectie). Dit kan alleen in non humane primaten aangezien geen enkele andere diersoort gevoelig is voor infectie met virussen die in voldoende mate overeenkomen met HIV. Zowel HIV-1 als HIV-2 zijn uiteindelijk afkomstig van non humane primaten en vanuit deze dieren verspreidt naar de mens.

-Het is bovendien onduidelijk op basis van welke criteria besloten wordt een vaccin dat niet eerst in andere diersoorten getest wordt, in niet-humane primaten te testen.

De voorwaarde waaraan een vaccin moet voldoen dat niet in andere diersoorten getest kan worden is dat in dit geval een sterk vergelijkbaar vaccin, gebaseerd op het zelfde concept, wel in andere diersoorten getest is en daar een goede immuun respons induceerde. Bijvoorbeeld een vaccin dat gericht is op een bepaald molecuul kan soms zo specifiek zijn dat het alleen dit molecuul in mensen en non humane primaten herkend. Echter het kan zijn dat een vergelijkbaar molecuul wel aanwezig is in andere diersoorten. In dit geval moet zijn aangetoond dat een vaccin dat het vergelijkbare molecuul herkend werkzaam is in deze andere diersoort.

-U geeft aan twee soorten makaken te gebruiken. Hoewel de voorkeur gaat uit naar rhesus makaken, zal indien nodig gebruik maken van een andere soort makaak (Macaca fascicularis). De beschreven criteria op basis waarvan besloten wordt voor een van beide soorten te kiezen, lijken niet dusdanig specifiek dat voorkomen kan worden dat een proef uiteindelijk in beide soorten uitgevoerd moet worden.

Beide makaak soorten kunnen gebruikt worden voor immunogeniciteit en effectiviteits studies. De immunologische responsen welke door vaccin kandidaten worden geïnduceerd zijn voor beide soorten gelijk. Vaccins worden ontwikkeld om immuun responsen op te wekken die het virus kunnen neutraliseren waardoor ze het lichaam niet kunnen binnendringen en dus niet (meer) infectieus zijn (zgn sterilizing immunity). Echter er worden ook immuun responsen geïnduceerd om reeds geïnfecteerd cellen (dus het virus is binnen gedrongen in het lichaam) op te ruimen. Met name deze zgn cellulaire immuun responsen zijn van belang om het virus in bedwang te houden zodat het zich niet, of minder snel verspreidt door het hele lichaam. Dit zou betekenen dat er minder snel AIDS verschijnselen zullen optreden.

Nu blijkt uit eerdere studies dat resus makaken (*M. mulatta*) gevoeliger zijn voor ziekte progressie (AIDS) nadat de dieren eenmaal geïnfecteerd zijn dan de Cynomologous makaak (*M. fascicularis*). Willen we dus specifiek vragen beantwoorden over vaccin kandidaten die in staat zijn om immunologische responsen te induceren gericht op handhaving of vermindering van de virale load in de circulatie of in diverse weefsels, en dus het tegengaan of vermindering van ziekte progressie, dan zou de resus makaak hiervoor het beste diermodel zijn. Alleen in uitzonderlijke gevallen, namelijk wanneer een bepaald virus met name in cynomolgus apen zich vermenigvuldigt en daar AIDS induceert is zal voor deze diersoort worden gekozen. Uittesten in beide diersoorten zal nagenoeg niet voorkomen.

-U geeft aan dat er meerdere toedieningswijzen mogelijk zijn. In bijlage 3.4.4.2 wordt de mogelijkheid open gehouden om indien nodig 2 toedieningswijzen te testen. U beschrijft echter niet op basis van welke criteria besloten wordt een specifieke toedieningswijze te testen en hoe voorkomen wordt dat het nodig is de proef te herhalen met een andere toedieningswijze van virus.

U wordt verzocht bovengenoemde criteria (uitgebreider) te beschrijven.

Veruit de meeste infecties met HIV vinden plaats via de mucosa (zowel rectaal als vaginaal). Dit is dan ook de standaard te gebruiken route van infectie voor het testen van de beschermende werking van een vaccin. Bij deze wijze van infectie zal bij de mens normaal gesproken blootstelling aan een relatief geringe hoeveelheid virus plaats vinden. Doordat blootstelling echter meerdere malen plaats vindt kan uiteindelijk toch infectie optreden. Om dit te modelleren wordt bij non humane primaten daarom voor een repeated low dose challenge methode gekozen. Bij infectie via bloed/bloed contact worden waarschijnlijk relatief grote hoeveelheden virus overgedragen dat zich bovendien snel over het lichaam verspreidt. Bescherming tegen infectie door middel van vaccinatie zal zeer moeilijk te realiseren zijn. Echter onderdrukking van het virus door een vaccin dat een zeer sterke T-cel afweer oproept is misschien wel mogelijk. Alleen voor vaccin kandidaten die een zeer sterke T-cel respons oproepen kan deze route van infectie als test model gebruikt worden. Hierbij wordt gekozen voor een single high dose challenge methode.

Het is uit de literatuur gebleken dat voor een vaginale challenge ongeveer een 10 maal hogere virus dosis nodig is voor succesvolle infectie vergeleken met een rectale challenge. Het testen van effectiviteit van een vaccin of vaccinatie strategie zal of via rectale virus toediening of via vaginale virus toediening plaatsvinden. Het uittesten van beide mucosale toedieningsroute zal nagenoeg niet voorkomen.

-De NTS is erg lang. U wordt verzocht deze in te korten. U wordt daarnaast aangeraden de term statische analyse (4.2) aan te passen.

3.1 in ingekort tot:

Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS), het verworven immuundeficiëntie syndroom, wordt veroorzaakt door een infectie met het Human Immunodeficiency Virus (HIV). AIDS is een ziekte met een lange incubatieperiode die zich binnen enkele decennia wereldwijd verspreid heeft. Momenteel zijn meer dan 37 miljoen mensen besmet met HIV. Het merendeel van de geïnfecteerde personen overlijdt doordat het virus het afweersysteem vernietigt. Het lijkt erop dat alleen vaccins de verspreiding van HIV/AIDS een halt kunnen toeroepen. Voor het uittesten van de werking van nieuwe HIV vaccin kandidaten is het nodig om deze te testen in HIV-diermodellen. HIV blijkt alleen mensen en chimpansees te kunnen infecteren. Echter er is een HIV achtig virus (Simian Immunodeficiency Virus: SIV) in makaken dat een vergelijkbaar ziektebeeld geeft als HIV infectie bij de mens. Met behulp van dit apenmodel kunnen de eigenschappen van HIV alsmede de manier waarop infectie met een dergelijk virus leidt tot de ziekte AIDS onderzocht worden. Tevens kan in dit model de beschermende werking van HIV vaccins onderzocht worden. De meeste vaccins hebben als doel om een immuunrespons te stimuleren die erop gericht is te zorgen dat het virus de cel niet kan infecteren. Deze respons is gericht zijn tegen de buitenkant (de zgn. omhulsel of envelop) van het virus. Nu is de envelop van het SIV-virus verschillend van de envelop van HIV. Echter wetenschappers zijn erin geslaagd om het SIV van een HIV omhulsel te voorzien (SHIV) zodat vaccins gericht tegen de buitenkant van HIV kunnen worden getest in makaken. Sommige vaccins hebben als doel om immuun responsen te stimuleren die in staat zijn reeds geïnfecteerde cellen te herkennen en op te ruimen. Hierbij is de respons gericht tegen andere componenten van het virus die minder sterk verschillen tussen HIV en SIV. Hier kan prima gebruik gemaakt worden van SIV.

Het doel van dit project is om nieuwe HIV vaccins in apen te testen om vast te stellen of ze een goede afweerreactie tegen HIV opwekken en of het vaccin bescherming biedt tegen infectie.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag



**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
AVD: [REDACTED] 20171544
Bijlagen
1

Datum 13 juli 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED],

Op 24 mei 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Evaluation of novel HIV vaccine candidates for immunogenicity and capacity to protect project? against SIV/SHIV virus infection in macaques." met aanvraagnummer AVD5020020171544. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 28 juni 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Op ons verzoek heeft u verhelderd waarom uw onderzoek niet met een andere diersoort dan met niet-humane primaten kan worden uitgevoerd, heeft u de keuzemomenten en bijbehorende criteria nader beschreven, en heeft u de NTS ingekort.

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 "Evaluation of novel HIV vaccine candidates for immunogenicity and capacity to protect project? against SIV/SHIV virus infection in macaques." starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 januari 2018 tot en met 31 december 2022. Deze termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat een vergunning niet voor langer dan vijf jaar mag worden afgegeven.

De tijdelijke individuele huisvesting van de dieren, bij uitval van kooigenoten, is besproken. Plaatsen bij een andere kooigenoot zal meer stress opleveren.

Tijdelijke individuele huisvesting van de dieren is om deze reden accoord bevonden.

Datum:
13 juli 2017
Aanvraagnummer:
AVD 20171544

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Beoordeling achteraf

Na afloop van het project zal er een beoordeling plaatsvinden, zoals bedoeld in artikel 10a1, lid 1d en lid 3, in de wet. Meer informatie over de eisen bij een beoordeling achteraf vindt u in de bijlage.

Beoordeling achteraf dient plaats te vinden wegens gebruik van niet-humane primaten.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-BPRC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 22 mei 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).

Datum:

13 juli 2017

Aanvraagnummer:

AVD [REDACTED] 20171544

Centrale Commissie Dierproeven

na [REDACTED]

ir. [REDACTED]

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:

Adres:

Postcode en plaats:

Deelnemersnummer:

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 januari 2018 tot en met 31 december 2022, voor het project "Évaluation of novel HIV vaccine candidates for immunogenicity and capacity to protect project? against SIV/SHIV virus infection in macaques." met aanvraagnummer AVD [REDACTED] 20171544, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-BPRC. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Chairman. De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 24 mei 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per brief op 24 mei 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per brief op 24 mei 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 22 mei 2017, ontvangen op 24 mei 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 28 juni 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1. Vaccine evaluation in macaques				
	Rhesusapen (Macaca mulatta) /	180	100% Matig	
3.4.4.2. SIV/SHIV virus infection (titration)in macaques				
	Rhesusapen (Macaca mulatta) /	56	100% Matig	

Voorwaarden

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

Dit project wordt voorzien van beoordeling achteraf. Deze beoordeling zal uiterlijk december 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.

Aanvraagnummer:

AVD [REDACTED] 0171544

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:

AVD [REDACTED] 0171544

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:

AVL [REDACTED] 0171544

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.

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.