

| Inventaris Wob-verzoek W17-12 |   |                 |      |        |       |                   |        |        |  |      |
|-------------------------------|---|-----------------|------|--------|-------|-------------------|--------|--------|--|------|
| nr.                           | document NTS 20172284                         | wordt verstrekt |      |        |       | weigeringsgronden |        |        |  | 11.1 |
|                               |   | reeds openbaar  | niet | geheel | deels | 10.1.c            | 10.2.e | 10.2.g |  |      |
| 1                             | Origineel aanvraagformulier                   |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |  |      |
| 2                             | NTS   | x               |      |        |       |                   |        |        |  |      |
| 3                             | Projectvoorstel                               |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |  |      |
| 4                             | Bijlage beschrijving dierproeven              |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |  |      |
| 5                             | DEC-advies                                    |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |  |      |
| 6                             | Ontvangstbevestiging                          |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |  |      |
| 7                             | Verzoek om aanvullende informatie             |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |  |      |
| 8                             | Antwoord op verzoek om aanvullende informatie |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |  |      |
| 9                             | Adviesnota CCD                                |                 | x    |        |       |                   |        |        |  | x    |
| 10                            | 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](http://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?<br><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 25800   |  |
|     |   | <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<br>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde<br>KvK-nummer                          | ModiQuest Research<br>[Redacted]<br>09148575   |
| 1.3 | Vul de gegevens van het postadres in.<br><i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i> | Straat en huisnummer<br>Postbus<br>Postcode en plaats<br>IBAN  | Industrielaan 63<br>[Redacted]<br>5349 AE Oss<br>NL41 INGB 0005261629                    |
| 1.4 | Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.  | Tenaamstelling van het rekeningnummer<br>(Titel) Naam en voorletters<br>Functie<br>Afdeling<br>Telefoonnummer<br>E-mailadres | ModiQuest Research<br>[Redacted]<br>[Redacted]<br>[Redacted]<br>[Redacted]<br>[Redacted] |
|     |   |  | <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.                    |
| 1.5 | <i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.  | (Titel) Naam en voorletters<br>Functie<br>Afdeling<br>Telefoonnummer<br>E-mailadres  | [Redacted]<br>[Redacted]<br>[Redacted]<br>[Redacted]<br>[Redacted]                       |
|     |   |  | <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.                               |

- 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  
Functie  
Afdeling  
Telefoonnummer  
E-mailadres

Dhr.  Mw.

- 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 - 12 - 2017  
Einddatum 1 - 12 - 2022

- 3.2 Wat is de titel van het project?

Het opwekken van antistoffen ten behoeve van onderzoek, diagnostiek en therapeutica doormiddel van immunisatie van muis, rat, kip, konijn of lama.

- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?

Het opwekken van antistoffen ten behoeve van onderzoek, diagnostiek en therapeutica doormiddel van immunisatie van muis, rat, kip, konijn of lama.

- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?

Naam DEC RUDEC  
Postadres Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen  
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 055

Datum 22-06-2017

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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

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

### 2 Categorie van het project

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

### 3 Algemene projectbeschrijving

#### 3.1 Achtergrond

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

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

opleidingsprogramma en eindtermen, is gekozen voor dierproeven.

ModiQuest Research B.V. is een bedrijf dat gespecialiseerd is in het genereren van antilichamen voor gerenomeerde farma bedrijven en grote biotech bedrijven in Europa en de VS. Voor aanvang van het project bediscussieerd ModiQuest met de klant uitvoerig het target waar de antilichamen die ModiQuest gaat genereren reactief tegen moeten zijn, wat de eigenschappen van het target (toxisch ja of nee) zijn, in welke assay de antilichamen moeten werken, wat er in het verleden al aan experimenten uitgevoerd is en waarom dit wel of niet gelukt is. Naar aanleiding van dit gesprek wordt er beoordeeld of een immunisatie vereist is, of dat ModiQuest middels hun in vitro humane of lama faagbank de antilichamen kan gaan selecteren. Als het target bijvoorbeeld toxisch is voor dieren, dan is immunisatie geen optie. Mochten er in het verleden al immunisaties zijn uitgevoerd met hetzelfde target, dan wordt eerst beoordeeld of het zinvol is om nogmaals een immunisatie te starten of om de in vitro faagbanken te gebruiken voor antilichaam selectie. In sommige gevallen is er al wel een immunisatie uitgevoerd in muizen, maar is het het advies van ModiQuest om juist geen muizen te immuniseren, maar konijnen of kippen. De keus van de diersoort hangt af van de homologie van het target met het te immuniseren dier en de uiteindelijke toepassing van het antilichaam. Dit laatste is gebaseerd op ervaring en literatuur onderzoek. In sommige projecten is juist in vivo maturatie van het immuunsysteem en dus de maturatie van de antilichamen specifiek tegen het antigeen gebruikt voor immunisatie van belang en kan de faag bank niet gebruikt worden.

De antilichamen welke vervolgens gegeneerd worden, worden door ModiQuest gescreend op reactiviteit en functionaliteit. Vervolgens wordt er samen met de klant een selectie gemaakt van beste antilichamen welke vervolgens naar de klant worden verstuurd om intern verder te ontwikkelen. De klanten gebruiken de antilichamen veelal voor ontwikkeling van therapeutische toepassingen voor de behandeling van kanker, infectieziekten en autoimmuunziekten. De antilichamen in de overige projecten worden gebruikt voor de ontwikkeling van diagnostiek of reagentia voor onderzoek voor dezelfde ziektes.

De slagingskans van de projecten is 95%. In een uitzonderlijk project, is het niet mogelijk om titers op te wekken tegen het target en in sommige projecten is de titer aanwezig, maar is het niet mogelijk om hybridomas te genereren. Van deze laatste groep worden dan de organen opgeslagen zodat er later via een andere techniek toch de gewenste antilichamen geselecteerd kunnen worden (bijvoorbeeld door het maken van een faagbank van het opgeslagen weefsel).

### 3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

- In het geval het project gericht is op één of meer onderzoeksdoelen: op welke vra(a)g(en) dient dit project antwoord(en) te verschaffen?
- In geval het een ander dan een onderzoeksdoel betreft: in welke concrete behoefte voorziet dit project?

Het algemene doel is het genereren van antilichamen voor gerenomeerde pharma en grote biotech bedrijven welke therapeutische of diagnostische assay ontwikkelen met de gegeneerde antilichamen.

Na overleg met de klant zoals beschreven in 3.1 wordt er besloten of er een immunisatie gestart wordt en in welke diersoort. De keuze van de diersoort is afhankelijk van uiteindelijke toepassing van het antilichaam en de verwachte sterkte van de immuun respons bij iedere diersoort. Dit laatste is gebaseerd op literatuur onderzoek naar het target en na overleg met de klant. Naast target specifieke kennis zijn er ook algemene overwegingen die in acht worden genomen voor de keus van de diersoort; lama's/Alpaca's maken andere typen antilichamen dan konijnen, kippen, mensen, muizen en ratten. Naast de klassieke antilichaam variant maken ze ook antilichamen die uit alleen een zware keten (VH) bestaan i.p.v. de combinatie van zware en lichte ketens. Het voordeel van deze VH antilichamen is dat ze kleiner zijn dan de klassieke antilichamen en daardoor makkelijker op moeilijk bereikbare gebieden kunnen komen in

bijvoorbeeld tumoren. Mocht het target erg homologoog zijn aan mensen en muizen dan wordt er veelal gekozen voor een kip of een konijn waarbij beide een andere opbouw van het immuun systeem hebben en dus beide een ander type immuun respons zullen induceren. De keus voor kip of konijn hangt ook samen met de uiteindelijke toepassing van het antilichaam en dus de route voor het isoleren van de monoklonale antilichamen ex vivo. Wanneer het target geen grote homologie heeft met de muis en het target een complexe structuur heeft, dan wordt er vaak gekozen voor een muizen immunisatie. Wanneer er complexe targets worden gebruikt voor immunisatie worden deze geëxprimeerd op autologe tumor cellen welke vervolgens worden geïnjecteerd in muizen. De tumor wordt opgeruimd door het immuunsysteem van de muis en tegelijkertijd wordt er tegen alleen het target een immuun respons geïnduceerd. Tot op heden werkt dit niet in ratten, kippen, konijnen en lama's/Alpaca's. Ratten worden zeer weinig ingezet bij immunisaties, maar worden ingezet voor standaard antigenen/DNA waarna ook grotere hoeveelheden bloed afgenomen moet worden om polyklonale antilichamen te zuiveren.

ModiQuest heeft uitgebreide ervaring met bovengenoemde immunisaties en werkt nauw samen met ervaren biotechnici van de dierenfaciliteit waar de kippen, konijnen, muizen en ratten zijn gehuisvest. Daarnaast is er een boerderij beschikbaar waar lama's/Alpaca's gehuisvest worden. ModiQuest voert dit soort immunisaties uit vanaf 2004 en sindsdien zijn 95% van de projecten succesvol geweest. Aangezien de antilichamen na screening op reactiviteit en functionaliteit naar de klant worden verstuurd voor verdere ontwikkeling, is ModiQuest niet altijd op de hoogte van de resultaten daarvan (vanwege IP van de klant). In een groot intern project waarin we binnen de ModiQuest groep antilichamen hebben ontwikkeld met als doel therapeutische behandeling van reuma is erg succesvol geweest en wordt op dit moment verder uitgezet voor klinisch onderzoek.

---

### 3.3 Belang

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

De antilichamen die worden gegenereerd worden gebruikt voor het ontwikkelen van diagnostische kits en therapeutica voor toepassing in diverse ziekten zoals kanker, infectieziekten en auto-immuunzieke. Het is van belang om goede doelgerichte diagnostica/therapeutica te ontwikkelen om ziekten vroegtijdig op te sporen en te behandelen.

---

### 3.4 Onderzoeksstrategie

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

[Redacted content]



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

De immunisatie zullen worden uitgevoerd volgens de in punt 3.4.1. beschreven immunisaties. Omdat ModiQuest Research immunisaties uitvoert voor derden waarna ModiQuest Research ex vivo monoclonale antilichamen zal genereren dmv diverse technieken, is iedere immunisatie een afzonderlijke proef en hebben immunisaties niet altijd een onderling verband.

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 dieren worden geïmmuniseerd met een antigeen/DNA/Cellen. Na immunisatie en/of boosters wordt bloed afgenomen van de dieren om de antigeen specifieke titer te bepalen. Is de titer voldoende dan krijgen de dieren nog 1 boost waarna het dier zal worden geofferd om de milt, beenmerg en lymfeknopen te verwijderen. Is de titer nog niet voldoende dan wordt er beoordeeld hoe verder te gaan zoals beschreven in 3.4.1.

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

| Volgnummer | Type dierproef                                  |
|------------|---|
| 1          | Immunisatie van muis, rat, kip, konijn of lama. |
| 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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

|     |  |                    |  |
|-----|--|--------------------|--|
| 1.1 | Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.           | 25800              |  |
| 1.2 | Vul de naam van de instelling of organisatie in. | ModiQuest Research |  |
| 1.3 | Vul het volgnummer en het type dierproef in.     | Volgnummer         | Type dierproef                             |
|     |  | 1                  | Immunisatie van muis, rat, konijn of lama. |

*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.

ModiQuest Research B.V. is een bedrijf dat gespecialiseerd is in het genereren van antilichamen voor gerenomeerde farma bedrijven en grote biotech bedrijven in Europa en de VS. Voor aanvang van het project bediscussieerd ModiQuest met de klant uitvoerig het target waar de antilichamen die ModiQuest gaat genereren reactief tegen moeten zijn, wat de eigenschappen van het target (toxisch ja of nee) zijn, in welke assay de antilichamen moeten werken, wat er in het verleden al aan experimenten uitgevoerd is en waarom dit wel of niet gelukt is. Naar aanleiding van dit gesprek wordt er beoordeeld of een immunisatie vereist is, of dat ModiQuest middels hun in vitro humane of lama faagbank de antilichamen kan gaan selecteren. Als het target bijvoorbeeld toxisch is voor dieren, dan is immunisatie geen optie. Mochten er in het verleden al immunisaties zijn uitgevoerd met hetzelfde target, dan wordt eerst beoordeeld of het zinvol is om nogmaals een immunisatie te starten of om de in vitro faagbanken te gebruiken voor antilichaam selectie. In sommige gevallen is er al wel een immunisatie uitgevoerd in muizen, maar is het het advies van ModiQuest om juist geen muizen te immuniseren, maar konijnen of kippen. De keus van de diersoort hangt af van de homologie van het target met het te immuniseren dier en de uiteindelijke toepassing van het antilichaam. Dit laatste is gebaseerd op ervaring en literatuur onderzoek. In sommige projecten is juist in vivo maturatie van het immuunsysteem en dus de maturatie van de antilichamen specifiek tegen het antigeen gebruikt voor immunisatie van belang en kan de faag bank niet gebruikt worden.

Welke adjuvantia gebruikt gaat worden hangt van de immunisatie route, de diersoort en de gewenste antilichamen af. Alle adjuvantia duwen de immuun respons in een bepaalde richting, namelijk Th I of Th II met de daarbij behorende isotypes antilichamen. Immunisaties in muizen met standaard antigenen zijn erg succesvol met het gebruik van CFA tijdens de immunisatie, waarna er tijdens de boost geen adjuvantia meer vereist is. CFA kan op de plaats van injectie een bult van CFA/antigeen mengsel gepaard met ontsteking achterlaten, om dit te voorkomen verdelen we het te injecteren volume over 4 plaatsen (meestal

oksels en liezen) zodat, doordat het kleine volume dat geïnjecteerd wordt, dit ongerief zo laag mogelijk blijft. Idem voor de ratten. Bij konijnen, kippen en lama's/Alpaca's wordt er vaak gebruik gemaakt van CFA tijdens de immunisatie en IFA tijdens de boosters. Ook hier wordt het te injecteren volume laag gehouden en op 4 plekken verdeeld, wederom om het ongerief zo laag mogelijk te houden. Na injectie worden de dieren dagelijks gemonitord om het welzijn te beoordelen. Uit alle voorgaande studies is dit het meest effectieve adjuvantia gebleken waarbij in een korte tijd een goede immuun respons wordt geïnduceerd. Het resultaat is een gemengd IgG2/IgG1 antilichaam inductie wat in veel van de projecten gewenst is. Andere adjuvantia worden gebruikt in immunisaties waarbij de immuun respons een andere type immuun respons moet induceren. Bijvoorbeeld bij TLR4 stimuli wordt een sterke Th1 respons geïnduceerd met de daarbij behorende IgG2 antilichaam inductie en bij voorbeeld aluminium hydroxide heeft de eigenschap om een meer allergische reactie te induceren. Bij het injecteren van levende tumor cellen is geen extra adjuvantia vereist. Bij het gebruik van DNA immunisaties wordt ook DNA geïnjecteerd wat codeert voor adjuvantia, zodat deze in het lichaam tot expressie worden gebracht en niet extra geïnjecteerd hoeft te worden.

Per immunisatie route wordt beoordeeld of verdoving vereist is voor de injectie. Er wordt bij iedere handeling afgewogen of het ongerief van de anesthesie groter/kleiner is dan het ongerief van de handeling. Bijvoorbeeld, bij de injectie van CFA/antigeen mengsel s.c. in muizen in de liezen en oksels kan dit door 1 persoon worden uitgevoerd onder anesthesie, maar kan ook door twee personen worden uitgevoerd waardoor anesthesie niet noodzakelijk is. Er wordt dan gekozen voor de laatste optie zonder anesthesie, omdat de dieren meer ongerief ondervinden van het bijkomen van de anesthesie dan van de injectie. Bij injectie van DNA gevolgd door electroporatie is anesthesie vereist.

De primary uitkomst parameters zijn de antigeen specifieke titers welke worden bepaald in serum van de geïmmuniseerde dieren.

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 beoogde behandeling is weergegeven in onderstaande tabellen. De dieren worden gemerkt middels een oorlabel, er wordt pre-immuun bloed afgenomen als titer 0-punt en vervolgens geïmmuniseerd met het antigeen waarna de dieren antilichamen zullen gaan ontwikkelen tegen het antigeen. Dit antigeen kan worden toegediend als eiwit oplossing, als DNA injectie wanneer het dier zelf het eiwit/antigeen in de goede conformatie zal produceren of door middel van een cel injectie welke het eiwit/antigeen tot expressie brengt in de juiste conformatie. Afhankelijk van de gekozen immunisatie route zal er 1-5 weken na de immunisatie een eerste boost (enkele of dubbele) gegeven worden. Afhankelijk van de immunisatie route en diersoort wordt er gekozen voor een enkele of dubbele boost. Muizen en ratten geïmmuniseerd met een standaard antigeen krijgen een dubbele boost, maar konijnen, kippen en lamas/Alpaca's krijgen maar een enkele boost. Het is uit voorgaande immunisaties en literatuur onderzoek gebleken dat dit optimale resultaten geeft voor alle diersoorten. Deze dieren krijgen na 1-5 weken nogmaals een boost waarna er bloed wordt afgenomen om de geïnduceerde titer te analyseren. Mocht de titer voldoende hoog zijn, dan krijgt het dier met de beste titer een laatste boost en wordt er een paar dagen later de milt, beenmerg en lymfeknopen verwijderd. Vervolgens wordt er gestart met de monoklonale fase ex vivo. Mocht de titer nog niet voldoende hoog zijn, dan krijgen de dieren nog 2 enkele of dubbele boosters en wederom een titerbepaling. De dieren krijgen maximaal 14 booster injecties; 7 dubbele of 14 enkele. Dit is met uitzondering van de levende cel immunisaties waarin we maximaal 4 boosters geven. Uit voorgaande immunisaties met standaard antigeen is gebleken dat vaak 2 dubbele boosters voldoende is voor het verkrijgen van een goede titer, maar dat DNA immunisaties met complexe eiwitten een groter aantal boosters vereist voor het krijgen van een goede immuun respons.

[Redacted content]



Iedere titer bepaling is er een GO/NO-GO punt waar wordt bekeken hoe verder te gaan; starten met ex vivo werk, het geven van extra boosters waarbij wordt beoordeeld bij een lage titer om de immunisatie strategie aan te passen (dosis, injectie route) of te stoppen met de immunisatie.

| Nr. | handeling   |                                      | ongerief                              |        |            | Code ongerief |
|-----|---|--------------------------------------|---------------------------------------|--------|------------|---------------|
|     |   |                                      | Omschrijving handeling                | duur   | frequentie |               |
| 1   | Nummering dieren d.m.v. tatoeëren/oor-label                                     | 1 dag voor start experiment          | i.d. (tattoo) of oor-label            | 1 min  | 1          | Licht         |
| 2   | Afname pre-immuun bloed (indien nodig onder anesthesie)                         | 1 dag voor start experiment          | Voor handelingen per dier zie tabel 2 | 1 min. | 1          | Licht         |
| 3   | Weefsel afname  | Dag -2 tot -20                       | Ten behoeve van fibroblast isolatie   | 1 min  | 1-2        | Licht         |
| 4   | Immunisatie met antigeen + adjuvant%/cellen/DNA (indien nodig onder anesthesie) | Dag 0                                | Voor handelingen per dier zie tabel 3 | 5 min. | 1-2        | Licht/matig   |
| 5   | Bloedafname (indien nodig onder anesthesie)                                     | Dag 7-275                            | Voor handelingen per dier zie tabel 2 | 5 min. | 1-8        | Licht         |
| 6   | Booster antigeen +/- adjuvant%/cellen/DNA (indien nodig onder anesthesie)       | 1-7 weken na immunisatie en of boost | Voor handelingen per dier zie tabel 3 | 5 min. | 1-14       | Licht         |
| 7   | Verdoven, verbloeden en milt, beenmerg en lymfe knopen verwijderen              | 3-7 dagen na laatste boost           | Voor handelingen per dier zie tabel 4 | 5 min. | 1          | Terminaal     |

*% Per antigeen en immunisatie route wordt gekeken welk adjuvant het beste voldoet voor het genereren van de gewenste immuun respons tegen het gekozen antigeen. In onze standaard procedures wordt er o.a. gebruik gemaakt van Complete Freund's adjuvant (ongerief; licht/matig), Incomplete Freund's adjuvant (ongerief; licht/matig), Squalaan (ongerief; licht/matig), Tetanus Toxin (ongerief; licht/matig), aluminum hydroxide (ongerief; licht/matig), toll -like receptor stimuli (ongerief; licht/matig), MF-59 (ongerief; licht/matig). We prefereren een adjuvantia dat het minste ongerief geeft.*

| Diersoort     | Handeling   | Verdoving         | Locatie handeling                                   |
|---------------|-------------|-------------------|---|
| Muis          | Bloedafname | -                 | Wang punctie  |
| Rat           | Bloedafname | Isofluraan (2-3%) | Staartader (alleen bij moeilijk hanteerbare ratten) |
| Konijn        | Bloedafname | -                 | Oorarterie/vene                                     |
| Kip           | Bloedafname | -                 | Vleugelvene   |
| Lama/Alpaca's | Bloedafname | -                 | Halsader  |

Tabel 2: bloedafname

| Diersoort     | Handeling               | Verdoving <sup>@</sup>  | Locatie handeling   |
|---------------|-------------------------|---|---|
| Muis          | Immunisatie/<br>booster | Isofluraan<br>(2-4%)  | s.c, i.d. (tattoo, gene gun,<br>electroporatie), i.v., intraspleen, i.m.,<br>i.p., voetzool, i.n. |
| Rat           | Immunisatie/<br>booster | Isofluraan<br>(2-4%)  | s.c, i.d. (tattoo, gene gun,<br>electroporatie), i.v., intraspleen, i.m.,<br>i.p., voetzool, i.n. |
| Konijn        | Immunisatie/<br>booster | Metedomidine<br>(0.5mg/kg) in<br>combinatie<br>met ketamine<br>(25mg/kg)  | i.m., i.d. (tattoo, gene gun,<br>electroporatie), s.c., i.v., voetzool, i.n.                      |
| Kip           | Immunisatie/<br>booster | Isofluraan<br>(2-4%)/<br>lidocaine zalf   | i.m., i.d. (tattoo, gene gun,<br>electroporatie), s.c., i.v., i.n.                                |
| Lama/Alpaca's | Immunisatie/<br>booster | Alpaca:<br>Metedomidine<br>(0.05mg/kg) in<br>combinatie<br>met ketamine<br>(1mg/kg) i.m.<br>Lama:<br>Metedomidine<br>(0.05-<br>0.06mg/kg) in<br>combinatie<br>met ketamine<br>(1mg/kg) i.m. | i.m., i.d. (tattoo, gene gun,<br>electroporatie), s.c., i.v., i.n.                                |

Tabel 3: Immunisatie route

<sup>@</sup> Er wordt alleen gebruik gemaakt van anesthesie als de immunisatie of booster dit vereisen (bijvoorbeeld bij electroporatie).

| Diersoort     | Handeling   | Verdoving  | Methode   |
|---------------|---|--|---|
| Muis          | Verdoven, verbloeden/<br>euthanasie en verwijderen<br>milt, beenmerg en<br>lymfeknopen. | Isofluraan<br>(5%)   | Oogextractie gevolgd door<br>nekstrekking   |
| Rat           | Verdoven, verbloeden/<br>euthanasie en verwijderen<br>milt, beenmerg en<br>lymfeknopen. | Isofluraan<br>(5%)   | Hartpunctie gevolgd door<br>nekstrekking  |
| Konijn        | Verdoven, verbloeden/<br>euthanasie en verwijderen<br>milt, beenmerg en<br>lymfeknopen. | Metedomidine<br>(0.5mg/kg) in<br>combinatie met<br>ketamine<br>(25mg/kg)<br>en/of<br>euthasaat | i.m. toediening verdoving /<br>s.c. toediening verdoving<br>gevolgd door verbloeden<br>(hartpunctie)<br><br>i.v. toediening euthasaat |
| Kip           | Verdoven, verbloeden/<br>euthanasie en verwijderen<br>milt, beenmerg en<br>lymfeknopen. | Isofluraan<br>(5%)<br>en/of<br>euthasaat   | Verbloeden (hartpunctie)<br>i.v. toediening euthasaat   |
| Lama/Alpaca's | n.v.t. alleen bloedafname   | -  | -   |

Tabel 4: verdoving/euthanasie

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

Muis: Na immunisatie met een standaard oplosbaar antigeen of DNA wordt er in **minimaal** 50% van de dieren een goede immuun respons opgewekt, waardoor we 2 dieren per groep immuniseren. Omdat het per antigeen verschilt welke stam er goed reageert op het antigeen, worden gemiddeld 3 groepen van 2 dieren geïmmuniseerd. Hierop is 1 uitzondering, namelijk dat 1 stam een hogere mortality rate heeft (SJL), waardoor we hiervan 3 dieren in de groep opnemen. Wanneer er immunisaties worden verricht met levende cellen, worden er per groep 9 of 12 dieren geïncludeerd. Deze groep wordt onderverdeeld in subgroepen van 3 dieren welke ieder een unieke kloon van de antigeen-expresserende levende cellen krijgt toegediend. Per target varieert het of er verwacht wordt om 3 of 4 subgroepen van 3 dieren te includeren om de gewenste respons op te wekken.

Kip, rat, konijn, lama/Alpaca's; immunisatie van 2 dieren per groep levert goede resultaten, ook hier is het slagingspercentage voor een goede antigeen specifieke titer **minimaal** 50%.

## B. De dieren

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

Afhankelijk van het gewenste antilichaam, het antigeen en de uiteindelijke toepassing van het antilichaam, zal worden beoordeeld of de beste immunisatie resultaten verwacht worden in muis, rat, kip, konijn, of lama/Alpaca's.

Daarnaast hebben bepaalde stammen de voorkeur voor het genereren van een antilichaam respons tegen een specifiek target. De stammen vernoemt in deze tabel zijn de meest voorkomende stammen. Voor het gebruik van andere stammen zal dit uitvoerig met de IVD overlegd worden.

Er is gekozen om alleen vrouwen te includeren in de proef, **omdat we in het verleden met regelmaat dieren uit de proef hebben moeten halen of solitair hebben moeten huisvesten vanwege ontstane agressie bij mannelijke dieren. Agressie met de daarbij ontstane wonden en stress kunnen een negatief effect op de immuun respons hebben.** Het gebruik van vrouwen heeft geen nadeling effect voor het uiteindelijke antilichaam dat als therapeutica kan worden gebruikt. In het verleden is dit bewezen omdat antilichamen gegenereerd in vrouwelijke muizen als therapeutica zijn geïnjecteerd in mannelijke dieren (reuma model). Er werd geen ander effect gezien dan de verwachte therapeutische behandeling.

| Diersoort     | Stam  | Sexe | Aantal per jaar | Range leeftijd of gewicht | Herkomst  |
|---------------|---|------|-----------------|---------------------------|---|
| Muis          | Diverse inteelt en outbred wild type stammen waaronder Balb/c, Swiss, SJL/J, DBA/J1, C57BL/6, C3H, BiozziABH, CD-1, NZBW, transgenic mice | V    | 200             | 6-8 weken                 | Charles River/Harlan /Janvier/Jax                         |
| Kip           | Diverse inteelt en outbred wild type stammen waaronder Barnevelder, White Leghorn   | V    | 30              | 15-20 weken               | Grutters of Derks   |
| Konijn        | Diverse inteelt en outbred wild type stammen waaronder Nieuw Zeelander, wild type parental b9 allo-type rabbits, basilea strain rabbits   | V    | 30              | 2 kg                      | Charles River/Harlan                                      |
| Rat           | Diverse inteelt en outbred wild type stammen waaronder Wistar, transgenic rats  | V    | 10              | 6-8 weken                 | Charles River/Harlan                                      |
| Lama/Alpaca's | Diverse stammen   | V    | 20              | ~1 jaar                   | Tijdelijk gebruik landbouw huisdieren, na afloop in leven |



|  |  |  |  |  |                                 |
|--|--|--|--|--|---------------------------------|
|  |  |  |  |  | gelaten en terug naar eigenaar. |
|--|--|--|--|--|---------------------------------|

Tabel 5: Diersoorten en stammen

### 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.

Vermindering: In voorgaande studies onder vergelijkbare projectaanvragen is geoptimaliseerd wat het minimum aantal dieren per groep moet zijn om goed resultaat te behalen. Dit aantal is onderbouwd onder 2A.

Vervanging/vermindering: Zoals in het projectvoorstel is uitgeschreven, wordt er voorafgaand aan de studie beoordeeld of een immunisatie noodzakelijk is of dat we ook een selectie kunnen uitvoeren ex vivo met ModiQuest's humane of lama faagbank. Dit is nog niet voor ieder target effectief, sommige benaderingen vereisen een in vivo maturatie stap door het immuun systeem waardoor immunisatie noodzakelijk is.

Verfijning: Er wordt per immunisatie bekeken of het gebruik van adjuvantia noodzakelijk is en indien noodzakelijk dan wordt het ongerief afgewogen tegen het verwachte slagingskans per type adjuvantia in combinatie met het antigeen en waar mogelijk wordt er gekozen voor het minst irriterend antigeen. Bij gebruik van CFA kunnen er ontstekingen plaatsvinden rond de injectiepunten, om dit te voorkomen wordt het CFA/antigeen mengsel verdeeld over 4 plekken.

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.

Per immunisatie wordt de immunisatie strategie afgewogen tegen het verwachte succes met dat specifiek antigeen na injectie middels een van de hierboven benoemde immunisatie methodes en het ongerief wat het dier zal hebben na deze injectie. Er wordt gestreefd naar de methode met een zo laag mogelijke ongeriefscore. Daarnaast worden de dieren dagelijks gemonitord. Bij niet goed functioneren van het dier wordt meteen bekeken hoe dit te kunnen ondervangen en toekomstige behandelingen binnen de gekozen immunisatie strategie worden aangepast.

## 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.

NVT

## 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.

Pijnbestrijding wordt alleen toegepast als het ongerief van de injectie methode groter is dan het bijkomen van de anesthesie. Bij injectie middels electroporatie wordt anesthesie toegepast. Bij moeilijk hanteerbare ratten kan er voor gekozen worden om anesthesie toe te passen om bloed af te nemen. Verdere pijnbestrijding wordt niet toegepast, omdat dit het immuun systeem kan remmen.

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Ieder immunisatie project wordt uitgevoerd met een uniek antigeen. Voorafgaand aan de immunisatie wordt beoordeeld of het antigeen geen verwachte toxische effecten heeft op het dier. Deze beoordeling wordt uitgevoerd door ModiQuest in samenspraak met de klant, wie uitgebreide kennis heeft van het antigeen. Mocht dit niet voldoende zijn, dan wordt er literatuur onderzoek verricht. Als er ongerief wordt voorspeld, dan worden er alternatieven voorgesteld zoals faag display. Als er geen ongerief wordt voorspeld, dan kan er soms onverwacht alsnog ongerief optreden. Afhankelijk van het type ongerief wordt er actie ondernomen. In enkele gevallen kan de injectieplek wat opgezwollen zijn, het is bekend uit voorgaande studies dat deze redelijk snel wegtrekken (afhankelijk van de dier soort). Daarnaast hebben we in enkele studies ervaren dat het antigeen een erg heftige immuun respons had opgewekt waardoor een enkel dier in een shock kwam en geëuthanaseerd moest worden. Een langere periode van rust en aanpassing van de hoeveelheid antigeen heeft deze shock in de overige dieren uit de groep voorkomen. Injecties met levende tumor cellen welke het antigeen van interesse tot expressie brengt groeit uit tot een tumor (waar de dieren geen zichtbare hinder van hebben). Binnen 14 dagen wordt deze tumor uit het lichaam verwijderd door het immuun systeem. In 5% van de geïmmuniseerde dieren wordt de tumor niet opgeruimd en treed er verlamming op, waarna het dier moet worden afgevoerd. Rond deze periode zullen de dieren dagelijks gemonitord worden op gedrag en uiterlijk om bij mogelijk aankomend ongerief de dieren eerder af te voeren, dan te wachten tot de totale verlamming.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Zie bovenstaande tekst.

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

Zie bovenstaande tekst.

### 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.

Afwijkend gedrag, visueel afname van lichaamsgewicht gevolgd door wegen en vergelijking met littermates, geen/slechte mobiliteit, geen/weinig opname van water/voer. Bij zichtbaar lijden wordt het dier uit de proef gehaald.

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

<1% bij standaard eiwit immunisaties en DNA immunisaties en ~5% na levende tumor cell immunisaties.

### K. Classificatie van ongerief

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

Licht: 84%

Matig: 15%

Ernstig: <1%

## 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.

Na immunisatie worden milt, beenmerg en lymfeknopen gebruikt om monoclonale antilichamen te genereren, met uitzondering van de lama's/Alpaca's (alleen bloedafname).

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: 2017-0026
2. Titel van het project: Het opwekken van antistoffen ten behoeve van onderzoek, diagnostiek en therapeutica door middel van immunisatie van muis, rat, kip, konijn of lama
3. Titel van de NTS: Het opwekken van antistoffen ten behoeve van onderzoek, diagnostiek en therapeutica door middel van immunisatie van muis, rat, kip, konijn of lama
4. Type aanvraag:
  - nieuwe aanvraag projectvergunning
  - wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
  - naam DEC: RUDEC
  - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED] bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9:00 tot 15:00 uur
  - e-mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
  - ontvangen door DEC: 30-03-2017
  - aanvraag compleet
  - in vergadering besproken: 02-05-2017
  - anderszins behandeld
  - termijnonderbreking(en) van 08-05-2017 tot 06-06-2017
  - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
  - aanpassing aanvraag: 06-06-2017
  - advies aan CCD: 16-06-2017
7. De inhoud van dit project is afgestemd met de IvD en deze heeft geen bezwaren tegen de uitvoering van het project binnen deze instelling.
8. Eventueel horen van aanvrager: n.v.t.
9. Correspondentie met de aanvrager:
  - Datum vragen: 08-05-2017
  - Datum antwoorden: 06-06-2017
  - Gestelde vragen en antwoorden:

### Description of Animal Procedures:

\*DAP1

-A2: Graag de woorden terminaal, licht, matig en ernstig i.p.v. de codes gebruiken voor het ongerief.

*Antwoord: Zie geel gearceerde aanpassingen in het document "beschrijving dierproeven".*

-A2: Tabel 1, nr. 3: waarom is het nodig om weefsel af te nemen voor fibroblast isolatie? In de aanvraag is niet uitgelegd waar de fibroblasten voor nodig zijn.

*Antwoord: Zie geel gearceerde aanpassingen in het document "beschrijving dierproeven".*

*Voor het opwekken van een immuun repons tegen complexe membraan eiwitten wordt gebruik gemaakt van cellen welke het target tot expressie brengen, welke vervolgens worden*

*geïnjecteerd in de dieren. De cellijn die gebruikt wordt voor levende cel immunisaties is niet voor iedere muizen stam of diersoort geschikt. Om in andere muizenstammen/diersoort deze immuun respons op te wekken wordt gebruik gemaakt van dier-eigen fibroblasten welke na isolatie worden getransfecteerd/getransduceerd met het target waartegen de immuun respons opgewekt moet worden. Na goed meetbare expressie van het target op deze cellen, worden de cellen geïnjecteerd in het dier waar de fibroblasten van afkomstig zijn. Door middel van deze techniek zal het dier geen immuun respons ontwikkelen tegen de gebruikte cel, maar wel tegen het geëxprimeerde target.*

-A2: Graag de tabellen zodanig invullen dat zij overeenkomen met de tekst en met elkaar, en ook beter herleidbaar is welk type immunisaties (antigeen+adjuvant, cellen, DNA) er met elke diersoort wordt gedaan.

Er wordt bijvoorbeeld in de tekst vermeld dat de dieren onder anesthesie gaan wanneer een injectie met DNA wordt gevolgd door electroporatie ('anesthesie vereist'). Deze methode wordt bij lama's vermeld (tabel3), terwijl deze dieren niet onder anesthesie gaan.

*Antwoord: De verdoving voor de lama's is toegevoegd aan tabel 3. Naar aanleiding van het advies gesprek met de dierenarts en wildlife arts is besloten om Alpaca's aan het protocol toe te voegen. Per proef zal er met de dierenarts/IVD worden overlegd of er lama's of Alpaca's zullen worden ingezet. De keuze hangt af van de injectie methode, duur van de proef en huisvestingsmogelijkheden.*

-A3: "Er wordt in maximaal 50% van de dieren een goede immuunrespons opgewekt". In dat geval lijkt het de commissie niet raadzaam om slechts twee dieren te gebruiken, omdat de kans groot is dat er geen respons gevonden wordt wanneer er maar twee dieren worden gebruikt per immunisatie. Bedoelen de onderzoekers minimaal 50%?

*Antwoord: Er wordt inderdaad minimaal 50% bedoeld, dit is aangepast in de tekst.*

-B: De reden voor het gebruik van alleen vrouwen is onvoldoende onderbouwd.

*Antwoord: Zie geel gearceerde aanpassingen in het document "beschrijving dierproeven".*

-B: Waarop zijn de aantallen in tabel 5 gebaseerd?

*Antwoord: De aantallen zijn gebaseerd op de aantallen geïmmuniseerd in het verleden onder een vergelijkbaar project voorstel (DEC) en het verwachte aantal immunisaties in komende jaren.*

-J: Waarom kan de tumorgroei leiden tot verlamming?

*Antwoord: De levende tumoren worden geïnjecteerd i.v. via de staartvene. Het is bewezen dat deze tumoren zich nestelen in de lymfeorganen en zullen na i.v. injectie gaan delen in de lymfe knopen dicht bij het uiteinden van de staart waar ook de spieren/zenuwen van de benen zich bevinden. Door ongeremde uitgroei van de tumoren zullen deze zenuwen/spieren geblokkeerd worden en kan het dier verlamd raken.*

-K: Waarop is de onderverdeling in licht, matig, en ernstig ongerief gebaseerd? Hoe verhoudt zich dit tot de eerste tabel? De commissie kan deze onderverdeling niet volgen. Is deze onderverdeling voor alle diersoorten hetzelfde? Kan het ernstig ongerief niet worden voorkomen door het toepassen van humane eindpunten? De beschrijving van de humane eindpunten lijkt geen situaties van ernstig ongerief te bevatten.

*Antwoord: Het verwachte ongerief bij alle dieren na immunisatie is licht. Na immunisatie onder anesthesie of na heftigere immuunreactie dan verwacht is het ongerief licht/matig. Deze percentages zijn een schatting, omdat dit vooraf niet altijd te voorspellen is. Het percentage 20% is hoog geschat, dus er wordt verwacht dat het ongerief van de meeste*

dieren licht zal zijn. Om deze reden is het percentage naar 15% bijgesteld. Het percentage vernoemd bij ernstig (5%) is afgeleid van het mogelijke percentage dat kan uitvallen na levende cel immunisaties door tumoruitgroei. Echter is dit percentage 5% van de met tumorcellen geïmmuniseerde dieren, niet van het totaal. Daarom is dit percentage verlaagd in bijgevoegd aangepast project voorstel (schatting is dat ongeveer ¼ van de muizen met levende tumor cellen geïmmuniseerd gaan worden). Alle dieren worden dagelijks gemonitord en zeker de dieren die met levende cellen zijn geïmmuniseerd worden goed bekeken in de periode waarin mogelijk ernstig ongerief op kan treden zodat ze uit de proef kunnen worden gehaald wanneer dit punt lijkt te naderen. Hierdoor zal het humaan eindpunt net niet bereikt worden. In sommige muizen kan de verlamming zich ineens uiten waardoor het humaan eindpunt wel wordt bereikt (bijvoorbeeld bij uiting 's nachts en aantreffen verlamd dier 's ochtends). Dit proberen we uiteraard te voorkomen. Zie laatste 7 regels in "I".

#### **Niet-technische samenvatting:**

-De onderzoekers worden verzocht na te gaan of de beantwoording van bovenstaande vragen over het Project Proposal en de DAPs ook leidt tot aanpassingen in de NTS.

*Antwoord: Zie geel gearceerde aanpassingen in NTS.*

-3.4: Hier wordt vermeld dat de dieren 'bijna geen hinder' hebben van de immunisaties. Een enkel dier kan 'hinder' hebben. Uit 3.5 blijkt dat het ongerief matig of soms zelfs ernstig zal zijn voor 25% van de dieren. Bovendien zal 75% van de dieren licht ongerief hebben, hetgeen niet hetzelfde is als 'bijna geen hinder'. De aanvrager wordt verzocht een realistischer beschrijving van het ongerief te geven

*Antwoord: Zie geel gearceerde aanpassingen in NTS.*

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag

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

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

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Er is geen betrokkenheid van DEC-leden bij deze projectaanvraag, waardoor onafhankelijkheid en onpartijdigheid zijn gewaarborgd.

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

1. Deze aanvraag heeft een concrete doelstellingen en kan getypeerd worden als een project. De opzet komt het best overeen met voorbeeld 1 uit de handreiking 'Invulling definitie project' van de CCD, welke voor alle te genereren antilichamen afzonderlijk wordt doorlopen. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft beschreven op basis van welke criteria zij zal besluiten het project voort te zetten. 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 weet is er geen "tegenstrijdige" wetgeving die het uitvoeren van de experimenten in de weg zou kunnen staan.



3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.

#### *Belangen en waarden*

4. Het directe doel van het project is het genereren van antilichamen voor derden. Deze derden zullen hiermee therapeutische of diagnostische assays ontwikkelen (uiteindelijk doel). De instelling maakt de antilichamen op verzoek van en tegen betaling door derden. Het is aannemelijk dat dit alleen plaatsvindt indien er een grote kans is dat het antilichaam ook daadwerkelijk gebruikt zal kunnen worden in een therapeutische of diagnostische assay voor toepassing bij diverse ziekten zoals kanker, infectieziekten en auto-immuunziekten. Er is een directe relatie tussen het directe doel van deze projectaanvraag (genereren van antilichamen) en het uiteindelijke doel (ontwikkeling van assays), ondanks het feit dat het uiteindelijke doel geen onderdeel uitmaakt van deze aanvraag.
5. De belangrijkste belanghebbenden in deze projectaanvraag zijn de proefdieren, de aanvrager en de doelgroep/patiënten.  
Voor de proefdieren geldt dat hun welzijn en integriteit worden aangetast. De dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en pijn ondergaan. Uiteindelijk zullen ze in het kader van het onderzoek gedood worden. De dieren hebben er belang bij hiervan gevrijwaard te blijven.  
Voor de aanvrager geldt dat het maken van kwalitatief goede antilichamen belangrijk is voor de bedrijfsvoering en een commercieel belang vertegenwoordigt. Dit 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 maatschappelijke en wetenschappelijke doelen dient (gezondheid, kennis).  
Voor patiënten is dit onderzoek van belang, omdat het kan leiden tot de ontwikkeling van betere diagnostiek en/of nieuwe behandelingen voor ziekten. De te genereren antilichamen zullen gebruikt worden voor de ontwikkeling van therapeutische of diagnostische assays voor diverse ziekten zoals kanker, infectieziekten en auto-immuunziekten. Gerichte behandeling op basis van mechanistisch inzicht kan bijdragen aan een betere diagnostiek en behandeling met minder bijwerkingen. Dit kan er toe leiden dat de patiënt weer gezond wordt, dan wel een betere kwaliteit van leven heeft. Kunnen beschikken over adequate behandelingen en diagnostische tests voor ernstige ziekten, zoals kanker, infectieziekten en auto-immuunziekten, is van groot belang voor de samenleving.
6. De aanvrager maakt geen melding van onbedoelde nadelige effecten op het milieu. Er is geen aanleiding voor de DEC om te verwachten dat die er zullen zijn.

#### *Proefopzet en haalbaarheid*

7. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager. De instelling produceert al sinds 2004 antilichamen voor derden. De aanvrager beschikt over voldoende kennis en kunde om te kunnen voldoen aan alle zorgvuldigheidseisen omtrent het verrichten van dierproeven.
8. De doelstellingen van het project zijn realistisch en de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten hier logisch bij aan. Bovendien heeft deze groep veel ervaring in dit

onderzoeksveld en met de voorgestelde dierproeven. De DEC is dan ook van mening dat het project goed is opgezet, en dat deze strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.

#### *Welzijn dieren*

9. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
  - Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
  - Niet-menselijke primaten (10e)
  - Dieren in/uit het wild (10f)
  - Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn)
  - Zwerfdieren (10h)
  - Hergebruik (1e lid 2)
  - Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
  - Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
  - Dodingsmethode niet volgens bijlage IV richtlijn (13c lid 3)
10. De huisvesting en verzorging van de dieren zijn conform de eisen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. De meeste dieren zullen licht ongerief ondervinden als gevolg van de immunisaties. Bij een deel van de dieren worden de immunisaties onder anesthesie gegeven. Die herhaalde anesthesie veroorzaakt matig ongerief voor de dieren. In uitzonderlijke gevallen (<1%) ontstaat ernstig ongerief door een zeer heftige reactie op de immunisatie of door verlamming veroorzaakt door lokaal groeiende tumorcellen waartegen geen adequate immuunrespons ontstaat.
12. De integriteit van dieren wordt in lichte mate aangetast door het instrumentele gebruik dat inherent is aan het doen van dierproeven.
13. De criteria voor humane eindpunten zijn voldoende specifiek gedefinieerd en toegesneden op het experiment. Het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken is op basis van ervaring met immunisaties van de gebruikte diersoorten ingeschat. De commissie is het eens met deze inschatting en de gehanteerde humane eindpunten.

#### *3V's*

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Indien mogelijk worden antilichamen gemaakt met behulp van ex vivo alternatieven. Wanneer dit niet mogelijk is zullen dieren ingezet worden om antilichamen te genereren.
15. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en is proportioneel ten opzichte van de gekozen onderzoeksopzet en de looptijd. De onderzoekers hanteren een goede strategie om ervoor te zorgen dat er met het kleinst mogelijke aantal dieren wordt gewerkt waarmee met zekerheid antilichamen verkregen zullen worden.
16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven. Er wordt

per immunisatie bekeken of het gebruik van adjuvantia noodzakelijk is, waarbij de voorkeur uitgaat naar een adjuvans dat het minst irriterend is en tevens een goede slagingskans biedt. De DEC is ervan overtuigd dat de beschreven proefopzet de meest verfijnde is en dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.

17. Het betreft geen wettelijk vereist onderzoek, maar routinematige productie.

*Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef*

18. De aanvrager zal in het project alleen gebruik maken van vrouwelijke dieren. De aanvrager geeft hiervoor de volgende onderbouwing: 'Er is gekozen om alleen vrouwen te includeren in de proef, omdat we in het verleden met regelmaat dieren uit de proef hebben moeten halen of solitair hebben moeten huisvesten vanwege ontstane agressie bij mannelijke dieren. Agressie met de daarbij ontstane wonden en stress kunnen een negatief effect op de immuunrespons hebben. Het gebruik van vrouwen heeft geen nadelig effect voor het uiteindelijke antilichaam dat als therapeutica kan worden gebruikt'. De DEC is van mening dat de aanvrager in voldoende mate heeft onderbouwd dat het om de doelstellingen met zo min mogelijk dieren en zo min mogelijk ongerief te bereiken noodzakelijk is om de proeven met alleen vrouwelijke muizen, konijnen, kippen en ratten uit te voeren. De commissie vermoedt dat dit voor lama's en alpaca's in mindere mate geldt.

19. De dieren zullen in het kader van het project gedood worden (met uitzondering van de lama's en alpaca's). Dit is noodzakelijk om verschillende weefsels te kunnen onderzoeken voor het beantwoorden van bepaalde onderzoeksvragen. De gebruikte dodingsmethode staat vermeld in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU.

20. Er worden in deze projectaanvraag landbouwhuisdieren (lama's en alpaca's) gebruikt. Deze worden niet gedood, maar gaan na afloop terug naar de eigenaar.

*NTS*

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

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

1. Rechtvaardigt het belang van de doelstelling van het project het ongerief dat de dieren wordt aangedaan, en is aan alle zorgvuldigheidseisen (3V's) voldaan?

2. Er vindt een lichte of matige aantasting van welzijn en integriteit van de proefdieren plaats (beschreven in C9 tot C20). De doelstellingen kunnen niet zonder dieren behaald worden. De onderzoekers doen al het mogelijke om het lijden van de dieren en het aantal dieren te beperken.

Voor patiënten is dit onderzoek van belang, omdat het kan bijdragen aan een verbetering van hun gezondheid en kwaliteit van leven. De DEC kent daar veel gewicht aan toe om de volgende redenen. Therapeutische en diagnostische assays op basis van antilichamen zijn van groot belang voor een adequate diagnose en/of behandeling van diverse ziekten zoals vele vormen van kanker, infectieziekten of autoimmuunziekten. De resultaten van dit project zullen bijdragen aan de ontwikkeling van deze assays. Het is aannemelijk dat de doelstellingen op termijn behaald zullen worden. De commissie acht de productie van deze assays van substantieel belang.

3. De DEC is overtuigd van het belang van de doelstellingen: het genereren van antilichamen voor derden, zodat zij daarmee therapeutische of diagnostische assays kunnen ontwikkelen op het gebied van diverse ziekten zoals kanker, infectieziekten of autoimmuunziekten. De DEC is van mening dat de belangen van de patiënten voldoende zwaar wegen om het schaden van de belangen van de proefdieren (om gevrijwaard te blijven van een aantasting van hun welzijn en integriteit) te rechtvaardigen. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager. De DEC is van mening dat het project goed is opgezet, en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn, dat het doel niet met minder dieren behaald kan worden, dat de gebruikte aanpak de meest verfijnde is en dat zij zal kunnen voorkomen dat mens, dier en het milieu onbedoelde negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven. De DEC is van oordeel dat het hier boven geschetste belang de onvermijdelijke nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren, in de vorm van angst, pijn of stress, rechtvaardigt. Aan de eis dat het belang van de experimenten op dient te wegen tegen het ongerief dat de dieren wordt berokkend, is voldaan.

## E. Advies

### 1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen

De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden

- X Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.
- Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist
- Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...

De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

- De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen:...
- De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...
- De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...

### 2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

### 3. Er zijn geen knelpunten of dilemma's geconstateerd – zowel binnen als buiten de context van het project - die de verantwoordelijkheid en competentie van de DEC overstijgen.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

ModiQuest Research

Industrielaan 63

5349 AE OSS



**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  
AVD2580020172284

**Bijlagen**

2

Datum 23 juni 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 22 juni 2017. Het gaat om uw project "het opwekken van antistoffen ten behoeve van onderzoek, diagnostiek en therapeutica door middel van immunisatie van muis, rat, kip, konijn of lama.". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD2580020172284. 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](http://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:**


AVD2580020172284



**Datum:**  
23 juni 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD2580020172284

### **Gegevens aanvrager**

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 25800  
Naam instelling of organisatie: ModiQuest Research  
Naam portefeuillehouder of  
diens gemachtigde:   
KvK-nummer: 09148575  
Straat en huisnummer: Industrielaan 63  
Postcode en plaats: 5349 AE OSS  
IBAN: NL41INGB0005261629  
Tenaamstelling van het  
rekeningnummer: ModiQuest Research

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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



**Datum:**  
23 juni 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD2580020172284

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

Naam:

Functie:

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 december 2017

Geplande einddatum:

1 december 2022

Titel project:

het opwekken van antistoffen ten behoeve van onderzoek, diagnostiek en therapeutica door middel van immunisatie van muis, rat, kip, konijn of lama.

Titel niet-technische samenvatting:

het opwekken van antistoffen ten behoeve van onderzoek, diagnostiek en therapeutica door middel van immunisatie van muis, rat, kip, konijn of lama.

Naam DEC:

RUDEC

Postadres DEC:

Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen

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:

Plaats:

OSS

Datum:

22 juni 2017

**Datum:**

23 juni 2017

**Aanvraagnummer:**

AVD2580020172284



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

ModiQuest Research

Industrielaan 63

5349 AE OSS



**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  
AVD2580020172284

**Bijlagen**

2

Datum 23 juni 2017

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 23 juni 2017

Vervaldatum: 23 juli 2017

Factuurnummer: 172284

| Omschrijving  | Bedrag    |
|---|-----------|
| Betaling leges projectvergunning dierproeven<br>Betreft aanvraag AVD2580020172284 | € 1035,00 |

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

ModiQuest Research

Industrielaan 63

5349 AE OSS



**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  
AVD2580020172284

Datum 4 juli 2017

Betreft aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 22 juni 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "het opwekken van antistoffen ten behoeve van onderzoek, diagnostiek en therapeutica door middel van immunisatie van muis, rat, kip, konijn of lama." met aanvraagnummer AVD2580020172284. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

### **Welke informatie nog nodig**

Wij hebben de volgende informatie van u nodig om uw aanvraag verder te kunnen beoordelen:

### **Onduidelijkheden**

In de NTS staan enkele spelfouten, indien u dit wenst, kunt u een nieuwe NTS sturen.

Kunt u aangeven over de lama's en alpaca's worden hergebruikt? Indien dit het geval is, kunt u dit dan in een nieuwe Bijlage Dierproeven aanpassen?

### **Leges**

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

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

**Opsturen binnen veertien dagen**

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via NetFTP. Stuurt u het per post op, gebruik dan het formulier dat u bij deze brief krijgt.

**Datum:**

4 juli 2017

**Aanvraagnummer:**

AVD2580020172284

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven





**Aanvraagnummer: AVD2580020172284**

**POSTAL ADDRESS** Pivot Park – RE2142  
 Industrielaan 63  
 5349 AE Oss  
 The Netherlands

**TELEPHONE** +31 (0) 412 – 846 000  
**FAX** +31 (0) 412 – 846 009

**E-MAIL** [REDACTED]  
**WEBSITE** [www.modiquestresearch.com](http://www.modiquestresearch.com)

Datum 5 juli 2017  
 Betreft reactie brief CCD 4 juli 2017

Geachte CCD,

Naar aanleiding van uw brief verstuurd op 4 juli 2017 met betrekking tot project aanvraag met titel “Het opwekken van antistoffen ten behoeve van onderzoek, diagnostiek en therapeutica door middel van immunisatie van muis, rat, kip, konijn of lama”, vind u hieronder de antwoorden op uw vragen:

In de NTS staan enkele spelfouten, indien u dit wenst, kunt u een nieuwe NTS sturen.  
*Er is een nieuwe NTS ingestuurd via NetFTP.*

Kunt u aangeven over de lama's en alpaca's worden hergebruikt? Indien dit het geval is, kunt u dit dan in een nieuwe Bijlage Dierproeven aanpassen?  
*De lama's en alpaca's worden niet hergebruikt, maar worden wel in leven gelaten en op de boerderij verder gehuisvest als landbouwhuisdier. Hierdoor is de bijlage dierproeven niet aangepast. Mocht dit wel noodzakelijk zijn, dan hoor ik dat graag van u.*

De leges die u verschuldigd bent zijn nog niet door ons ontvangen of de betaling is nog niet verwerkt.  
*Er is een bewijs van betaling ingestuurd via NetFTP.*

Mocht u nog verdere vragen hebben dan verneem ik dat graag.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]  
 ModiQuest Research

confidential

**TRADE REGISTER** Arnhem 09148575  
**V.A.T.** NL 8140.81.058.B01  
**BANK ACCOUNT** ING 5261629  
**IBAN** NL41 INGB 0005261629  
**SWIFT/BIC** INGBNL2A



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

ModiQuest Research

[REDACTED]

Industrielaan 63

5349 AE OSS



**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

AVD2580020172284

**Bijlagen**

1

**18 JULI 2017**

Datum 17 juli 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 22 juni 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "het opwekken van antistoffen ten behoeve van onderzoek, diagnostiek en therapeutica door middel van immunisatie van muis, rat, kip, konijn of lama." met aanvraagnummer AVD2580020172284. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 5 juli 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Dit betrof het hergebruik van dieren.

### **Beslissing**

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

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 "het opwekken van antistoffen ten behoeve van onderzoek, diagnostiek en therapeutica door middel van immunisatie van muis, rat, kip, konijn of lama." starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 december 2017 tot en met 30 november 2022. Deze termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat een vergunning een looptijd van maximaal 5 jaar kan hebben.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

**Beoordeling achteraf**

Na afloop van het project zal er een beoordeling plaatsvinden, zoals bedoeld in artikel 10a1, lid 1d en lid 3, in de wet. Meer informatie over de eisen bij een beoordeling achteraf vindt u in de bijlage.

Er is sprake van ernstig ongerief.

**Datum:**

17 juli 2017

**Aanvraagnummer:**

AVD2580020172284

**Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie RUDEC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 16 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.

**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](http://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



# Projectvergunning

## gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: ModiQuest Research

Adres: Industrielaan 63

Postcode en plaats: 5349 AE OSS

Deelnemersnummer: 25800

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 december 2017 tot en met 30 november 2022, voor het project "het opwekken van antistoffen ten behoeve van onderzoek, diagnostiek en therapeutica door middel van immunisatie van muis, rat, kip, konijn of lama." met aanvraagnummer AVD2580020172284, volgens advies van Dierexperimentencommissie RUDEC. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]. Voor de uitvoering van het project is [REDACTED] verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 22 juni 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 22 juni 2017;
  - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 5 juli 2017;
  - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 16 juni 2017, ontvangen op 22 juni 2017.
  - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 5 juli 2017

**Aanvraagnummer:**  
AVD2580020172284

| Naam proef  | Diersoort/ Stam  | Aantal dieren | Ernst   | Opmerkingen |
|---|--|---------------|---|-------------|
| <b>3.4.4.1 Immunisatie van muis, rat, kip, konijn of lama</b> |  |               |   |             |
|   | Muizen ( <i>Mus musculus</i> ) /                       | 1.000         | 1%<br>Ernstig<br>15%<br>Matig<br>84%<br>Licht |             |
|   | Ratten ( <i>Rattus norvegicus</i> ) /                  | 50            | 1%<br>Ernstig<br>15%<br>Matig<br>84%<br>Licht |             |
|   | Kippen /   | 150           | 1%<br>Ernstig<br>15%<br>Matig<br>84%<br>Licht |             |
|   | Konijnen ( <i>Oryctolagus cuniculus</i> ) /            | 150           | 1%<br>Ernstig<br>15%<br>Matig<br>84%<br>Licht |             |
|   | Andere zoogdieren (andere Mammalia) /<br>Lama / Alpaca | 100           | 1%<br>Ernstig<br>15%<br>Matig<br>84%<br>Licht |             |

**Aanvraagnummer:**  
AVD2580020172284

**Voorwaarden**

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

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet en wordt daarom voorzien van beoordeling achteraf. Deze beoordeling zal uiterlijk maart 2023 plaatsvinden. Er zal dan beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt. Daarnaast wordt bekeken of de schade die de dieren hebben ondervonden, het aantal en soorten proefdieren en de ernst de dierproeven conform de vergunning waren.

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

In artikel 10, lid 1 sub a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in afstemming met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarde wijzigen of intrekken.





**Aanvraagnummer:**  
AVD2580020172284

## 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:**  
AVD2580020172284

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.

| <b>Inventaris Wob-verzoek W17-12</b> |                                    | <b>wordt verstrekt</b> |             |               |              | <b>weigeringsgronden</b> |               |               |             |
|--------------------------------------|------------------------------------|------------------------|-------------|---------------|--------------|--------------------------|---------------|---------------|-------------|
| <b>nr.</b>                           | <b>documenten NTS20172349</b>      | <b>reeds openbaar</b>  | <b>niet</b> | <b>geheel</b> | <b>deels</b> | <b>10.1.c</b>            | <b>10.2.e</b> | <b>10.2.g</b> | <b>11.1</b> |
| 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                                    | Bijlage beschrijving dierproeven 3 |                        |             | x             |              |                          |               |               |             |
| 7                                    | DEC-advies                         |                        |             |               | x            |                          | x             | x             |             |
| 8                                    | Ontvangstbevestiging               |                        |             |               | x            |                          | x             | x             |             |
| 9                                    | Advies CCD                         |                        | x           |               |              |                          |               |               | x           |
| 10                                   | Beschikking en vergunning          |                        |             |               | x            |                          | x             | x             |             |

2439

1.

## Centrale Commissie Dierproeven



29 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](http://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?<br><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   11200<br><input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen |  |
| 1.2 | Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.   | Naam instelling of organisatie   | Vrije Universiteit te Amsterdam  |
|     |   | Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde  | [REDACTED]   |
|     |   | KvK-nummer   | 53815211   |
| 1.3 | Vul de gegevens van het postadres in.<br><i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i> | Straat en huisnummer   | de Boelelaan   1105  |
|     |   | Postbus  |  |
|     |   | Postcode en plaats   | 1081HV   Amsterdam   |
|     |   | IBAN   |  |
|     |   | Tenaamstelling van het rekeningnummer  | [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 checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
|     |   | Functie  | [REDACTED]   |
|     |   | Afdeling   | [REDACTED]   |
|     |   | Telefoonnummer   | [REDACTED]   |
|     |   | E-mailadres  | [REDACTED]   |

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

## 2 Over uw aanvraag

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

## 3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- |            |            |
|------------|------------|
| Startdatum | 01-11-2017 |
| Einddatum  | 31-10-2022 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Onderwijs en training in eenvoudige en complexe handelingen met proefdieren
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Onderwijs en training in eenvoudige en complexe handelingen met proefdieren
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- |             |   |
|-------------|---|
| Naam DEC    | DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum |
| Postadres   | Amsterdam   Nederland                       |
| E-mailadres |   |

## 4 Betaalgegevens

|   |  |
|---|--|
| 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?   | <input checked="" type="checkbox"/> Nieuwe aanvraag Projectvergunning € € 1.541,- Lege   |
|   | <input type="checkbox"/> Wijziging € Lege  |
| 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.  | <input type="checkbox"/> Via een eenmalige incasso   |
|   | <input checked="" type="checkbox"/> Na ontvangst van de factuur *  |
| <i>Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.</i> | <p>* Wanneer de factuur direct naar de financiële afdeling van de VU of het VUmc dient te gaan moet hier een inkoopordernummer en factuuradres worden toegevoegd .<br/> <i>Inkoopordernummer: kostenplaatnummer 3008101</i><br/> <i>Factuuradres: [REDACTED]</i></p> <p>Graag verzoeken we de CCD om het bovenstaande inkoopordernummer aan de factuur toe te voegen en de factuur te versturen naar het factuuradres.</p> |

## 5 Checklist bijlagen

|                                  |  |
|----------------------------------|--|
| 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee? | Verplicht  |
|                                  | <input checked="" type="checkbox"/> Projectvoorstel              |
|                                  | <input checked="" type="checkbox"/> Niet-technische samenvatting |
|                                  | Overige bijlagen, indien van toepassing                          |
|                                  | <input checked="" type="checkbox"/> Melding Machtiging           |
|                                  | <input type="checkbox"/>   |

## 6 Ondertekening

|  |   |
|--|---|
| 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar: | <p>Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondergetekende verklaart:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.</li> <li>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.</li> <li>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.</li> <li>dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.</li> <li>dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.</li> </ul> |
| Centrale Commissie Dierproeven<br>Postbus 20401<br>2500 EK Den Haag  |   |
| Naam   | [REDACTED]  |
| Functie  | [REDACTED]  |
| Plaats   | Amsterdam   |
| Datum  | 26 - 06 - 2017  |
| Handtekening   | [REDACTED]  |



## Format

### Projectvoorstel dierproeven

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

### 1 Algemene gegevens

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

### 2 Categorie van het project

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

### 3 Algemene projectbeschrijving

#### 3.1 Achtergrond

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

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



Binnen de VU, het VUmc worden dierproeven uitgevoerd in het kader van verschillende opleidingen voor art. 9 (promovendi, postdocs en onderzoekers) en art. 12/6 personen (dierverzorgers en biotechnici), hoger beroepsonderwijs (HBO), middelbaar beroepsonderwijs (MBO), beroepsbegeleidende leerweg (BBL), beroepsopleidende leerweg (BOL), universitaire studenten (BSc, MSc) en voor het opleiden van artsen. Daarnaast moeten sommige bevoegde medewerkers en gastonderzoekers getraind worden voor het updaten van hun competenties en worden dierproeven uitgevoerd om de haalbaarheid van nieuwe technieken te onderzoeken. Dit project is onder de leiding van de gezamenlijk dierfaciliteit voor VU en VUmc in nauwkeurige samenwerking met de IvD opgesteld. Dierproeven zullen worden uitgevoerd met zebavissen, muizen, ratten, cavia's, konijnen, geiten, schapen en varkens. Dit project omvat het trainen van de meest voorkomende handelingen die uitgevoerd worden met deze diersoorten maar ook het oefenen van nieuwe technieken die in verband met nieuwe vergunde CCD projecten worden ingevoerd.

### **Bekwaamheid en bevoegdheid medewerkers**

Medewerkers van beide instellingen (VU en VUmc) die betrokken zijn bij de dierproeven of de uitvoering daarvan moeten bevoegd en bekwaam zijn. De dierverzorgers en biotechnici of zoölogisch analisten hebben allemaal tijdens hun opleiding deze bevoegd- en bekwaamheid gekregen. Daarnaast zijn alle instituten gekwalificeerd om studenten van universiteiten, HBO, MBO, BBL, BOL opleidingen stageplekken te bieden. Hier wordt regelmatig gebruik van gemaakt. Master studenten of medewerkers afkomstig uit het buitenland met een vergelijkbare opleiding nemen deel aan externe cursussen betreffende proefdierkunde waardoor zij de bevoegdheid krijgen voor het mogen uitvoeren van dierproeven. Maar succes in deze cursussen (bereiken van bevoegdheid) is vaak onvoldoende om in de praktijk de bekwaamheid te waarborgen, die noodzakelijk is voor de uitvoer op de werkvloer. Dit geldt in het bijzonder voor ingrepen en handelingen die voor specifiek onderzoek noodzakelijk zijn, maar in de proefdiercursussen niet worden behandeld. Met het inwerking treden van de herziene Wod op 14 december 2014 zijn de opleidingseisen voor art. 9 functionarissen en art. 12/6 personen (biotechnici en dierverzorgers) veranderd. Er worden nu eisen gesteld aan de competentie en dus aan de opleiding van diegenen die (A) het project en de dierproef opzetten, (B) dierproeven verrichten en (C) dieren verzorgen en doden.

### **Scholing voor studenten van een HBO, MBO, BBL of BOL opleiding**

Voor deze studenten die dierproeven verrichten of de dieren verzorgen en dieren doden wordt het grootste gedeelte van de opleiding hiertoe verzorgd door de scholen. Tijdens de stages zal dit de dagelijkse verzorging en controle op gezondheid van de dieren zijn. Daarnaast moeten deze studenten ook handelingen aan dieren geoefend worden totdat deze uiteindelijk onafhankelijk van (maar in aanwezigheid) van experts of begeleiders kunnen uitvoeren. Het betreft zowel eenvoudige als complexe handelingen. Ook nadat de opleiding is afgerond moeten deze handelingen en nieuwe handelingen aan dezelfde of andere diersoorten geoefend worden zodat zij de handelingen conform de wet kunnen uitvoeren. Hierbij zijn op VU en VUmc gemiddeld ~20 personen per jaar betrokken.

### **Scholing van Bachelor (BSc) of Master (MSc) studenten**

De VU en het VUmc bieden BSc en MSc, PhD en MD studenten de mogelijkheid om in het kader van hun opleiding stage te lopen. Voor al deze studenten wordt een stageplan opgesteld waarin de handelingen aan proefdieren zijn beschreven en die ter goedkeuring wordt voorgelegd bij de IvD VU/VUmc. Goedkeuring vindt alleen plaats als deze handelingen niet resulteren in het gebruik van meer proefdieren of meer ongerief. Daarnaast moeten deze handelingen altijd uitgevoerd worden onder leiding van een begeleider die bevoegd en bekwaam is en mogen de studenten nooit zonder begeleiding met de dierproef bezig zijn. Hierbij zijn op VU en VUmc gemiddeld 40 personen per jaar betrokken.

Voor alle nieuwe medewerkers die geautoriseerd zijn om proefdieronderzoek binnen VU/VUmc uit te voeren is een intake bij de proefdierfaciliteit verplicht om hun bekwaamheid in fundamentele handelingen bij muis en/of rat te waarborgen en bij te scholen. Dit zijn in totaal rond 80 medewerkers per jaar.



### **Bijscholing projectmedewerkers en gastmedewerkers**

Er bestaat ook de mogelijkheid om op grond van Dierproevenregeling Artikel 6 lid 2 een ontheffing aan te vragen voor hetgeen bepaald wordt in Dierproevenregeling Artikel 6 lid 1a. Hiervan wordt gebruik gemaakt wanneer personen niet over de geëiste bevoegdheid beschikken maar wel bekwaam zijn of middels een kort opleidingstraject bekwaam kunnen worden. Daarnaast komen ook met enige regelmaat gastonderzoekers, gemiddeld 10-20 per jaar, naar één van de instituten om een techniek te introduceren of om technieken te leren van VU/VUmc medewerkers.

### **Nieuwe technieken**

Het komt voor dat een onderzoeker een project vergund heeft gekregen of wil gaan schrijven en daarin een techniek of handeling beschrijft waarmee binnen het instituut geen ervaring is. Het is wenselijk om hier enige ervaring bij een klein aantal dieren mee op te doen om inzicht te krijgen over de geschiktheid van de diersoort, de haalbaarheid, bijkomend ongerief en het aantal benodigde dieren. Op basis van voorgaande jaren wordt het aantal onderzoekers dat hiervan gebruik gaat maken geschat op ~20 medewerkers per jaar.

### **Competentie Dossier**

Om invulling te kunnen geven aan de wettelijke eisen en om de bevoegd- en bekwaamheid van de medewerkers te kunnen garanderen wordt van alle medewerkers, die dierproeven (willen) gaan uitvoeren of proefdieren (willen) gaan verzorgen, een Competentie Dossier op VU en VUmc ingevoerd. In dit digitale dossier worden relevante opleidingen vermeld en wordt vastgelegd welke handelingen of groepen van handelingen bij welke diersoort de medewerker beheerst. Ook wordt hierin bijgehouden of de handelingen nog recent uitgevoerd zijn of dat een opfriscursus nodig is. Als het een nieuwe handeling of een bekende handeling bij een andere diersoort betreft, wordt een oefentraject onder leiding van een (externe) trainer opgesteld.

Het Competentie Dossier kan door de leden van de Instantie van Dierenwelzijn (IvD) van de VU/VUmc geraadpleegd worden bij de behandeling van werkprotocollen die onder CCD vergunde projecten worden uitgevoerd. Het is daarbij de taak van de IvD om toezicht te houden en deze bevoegd- en bekwaamheid te controleren en te waarborgen.

Binnen de VU en VUmc waren afgelopen jaar in ~35 onafhankelijke afdelingen ~450 bevoegde personen (art. 9 en art. 6/12) actief betrokken bij proefdieronderzoek met een verloop van 10-20% per jaar. In totaal ligt het aantal van personen dat jaarlijks betrokken is bij training en onderwijs binnen VU en VUmc bij ~150 personen. Dit is onafhankelijk van hun proefdieronderzoek op de basis van vergunde CCD projecten en DEC protocollen (nog tot eind 2017).

---

## **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 directe doelstelling van dit project is om verschillende cursisten, studenten en medewerkers, in de appendices gezamenlijk 'medewerkers' genoemd, te trainen in een aantal eenvoudige of complexe handelingen aan proefdieren in het kader van hun onderzoek, opleiding of stage. Hiertoe voeren al bevoegde en nog onbevoegde medewerkers handelingen aan proefdieren uit voor het onderhouden of (lege artes) leren uitvoeren van technieken beschreven in de werkprotocollen van vergunde CCD projecten of nog geldige DEC protocollen (tot 1-1-2018) of om ervaring op te doen met een nieuwe techniek uit een nog te schrijven nieuwe projectaanvraag.

De uiteindelijke doelstelling is om te bereiken dat medewerkers goed gekwalificeerd en getraind zijn om op succesvolle wijze proefdieren te verzorgen en dierproeven uit te voeren. Hierdoor worden zij geacht in

staat te zijn om eventuele pijn, stress en ongerief te signaleren en dit door optimale pijnbestrijding en adequate anesthesie of op andere manieren te verminderen. Ook moeten zij in staat zijn humane eindpunten te formuleren en/of toe te passen.

Een vooraf aangewezen trainer bepaalt of de handelingen zoals vereist worden uitgevoerd. Als er ontheffing voor een aantal eenvoudige handelingen wordt aangevraagd voor personen die niet de gewenste bevoegdheid hebben zullen deze handelingen geleerd worden en daarna gevolgd worden door een toetsing van de uitvoering en onderdeel uitmaken van de gevraagde ontheffing. Nieuwe technieken zullen op kleine schaal uitgevoerd worden om hier de noodzakelijke expertise mee op te doen.

Voor dit project wordt een looptijd van 5 jaar aangevraagd. Binnen deze looptijd zal de doelstelling voor een groot aantal personen bereikt worden. Omdat het echter een dynamische populatie van komende en gaande personen betreft en ook zittende medewerkers (in kader van leven-lang leren) hun technieken of handelingen moeten onderhouden of leren zal na het verstrijken van de looptijd van dit project een herhaling of aanpassing van dit project worden aangevraagd om aan de wettelijke eisen te kunnen voldoen.

---

### 3.3 Belang

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

#### **Wetenschappelijk belang:**

Binnen de VU en het VUmc wordt fundamenteel en biomedisch onderzoek uitgevoerd resulterend in publicaties in belangrijke internationale journals, proefschriften of reviews. Dit levert onder andere de fundamentele kennis voor het begrijpen van mechanismes van ziektes om targets voor toekomstige interventies te ontdekken. Het is wettelijk vereist dat dit proefdieronderzoek door bevoegde en bekwaame personen wordt uitgevoerd.

#### **Maatschappelijk belang:**

Proefdieronderzoek vereist maatschappelijke verantwoording en onderbouwing waarom deze dierproeven noodzakelijk zijn. De kennis die is opgedaan dankzij fundamenteel onderzoek levert een belangrijke bijdrage aan de diagnostiek, behandeling en genezing van verschillende ziektes (b.v. Alzheimer en kanker). Dit is van groot maatschappelijk belang, daarom is het belangrijk om te investeren in goede huisvesting van de proefdieren en in opleiding en scholing van personeel. Het welzijn van de dieren staat hierbij voorop en de overtuiging dat goed proefdieronderzoek betere en betrouwbaardere resultaten oplevert. Dit resulteert in een vermindering van het aantal proefdieren en een vermindering van het ongerief. Bovendien gaat het hierbij om de verfijning van de technieken, de ontwikkeling van alternatieven voor dierproeven en om de verbetering van de huisvesting van de dieren.

---

### 3.4 Onderzoeksstrategie

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

**Het doel** van dit project is trainingen van handelingen aan proefdieren mogelijk te maken in het kader van de opleiding van art. 9 (promovendi, postdocs en onderzoekers) en art. 12/6 personen (dierverzorgers en technici), HBO, MBO, BBL, BOL en universitaire studenten, en artsen als ook het trainen van bekwaamheden van reeds bevoegde medewerkers in kader van het Competentie Dossier of de haalbaarheid van nieuwe technieken.

Alle trainingen starten met de vaststelling van het trainingsprogramma voor de betreffende doelgroep. Voor elke training wordt in overleg met IvD en de dierfaciliteit vastgesteld welke handeling geleerd moet worden en wie hiervoor de trainer wordt. Criteria hierbij zijn eisen van de opleiding, noodzaak en wenselijkheid en aanwezigheid van geldige DEC protocollen of CCD vergunningen. Deze worden afgewogen tegen het aantal dieren, het ingeschatte ongerief en het aantal trainingssessies. Het initiatief voor een training kan komen van zowel de IvD, art. 13f functionaris, als de medewerkers zelf. Voor de verschillende diersoorten is een lijst met handelingen opgesteld die gebaseerd is op de aanwezige

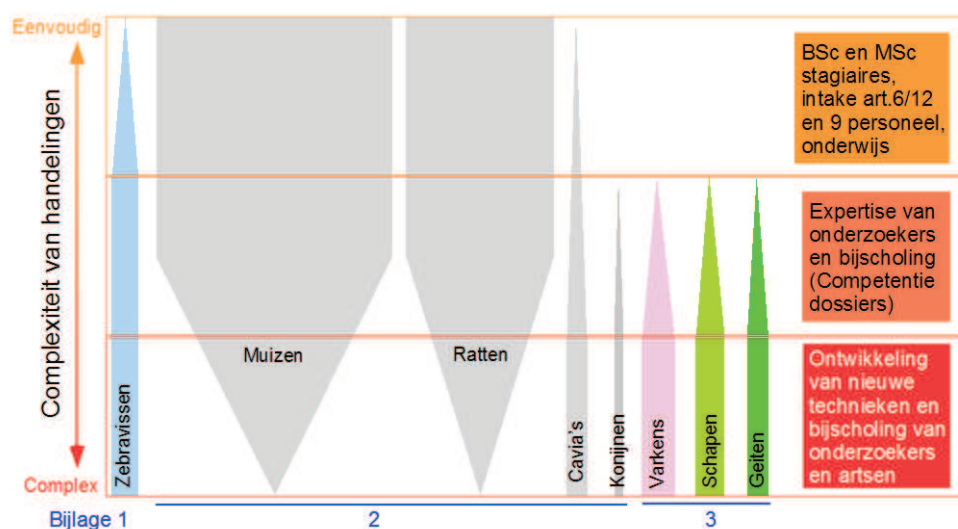
diersoorten binnen de VU waar dierproeven worden uitgevoerd. Daarnaast is ook geïnventariseerd welke handelingen of technieken bij de verschillende diersoorten worden toegepast en in geldige DEC protocollen of CCD vergunningen worden beschreven.

De voorwaarde is dat het ongerief in alle trainingen maximaal matig mag zijn alleen voor een beperkt aantal dieren. Het grootste deel van de handelingen zijn terminaal. Handelingen waarbij ernstig ongerief optreedt vallen buiten de scope van dit project en zullen in andere projectaanvragen aangevraagd en vergund moeten worden. In elke training of onderwijsmodule zal het hanteren en werken met dieren voorafgegaan worden door een theoretisch gedeelte zodat kennis van anatomie, fysiologie, herkennen van pijn, lijden en angst en anesthesie/analgesie aanwezig is voordat met een training met dieren zelf begonnen wordt. Deze kennis kan verkregen worden op onderwijsinstellingen of maakt deel uit van de proefdierkundecursus. Indien deze kennis niet aanwezig is zal voorafgaand aan de trainingen deze kennis bijgespijkerd moeten worden.

De trainingen die onder de vergunning van dit project zullen worden uitgevoerd beginnen met een uitleg van de handelingen indien mogelijk aan de hand van een standard operating procedure (SOP), een instructiefilm en een demonstratie door de trainer. Indien mogelijk wordt eerst geoefend met demonstratiemateriaal, kunstrat of kadaver. De training bestaat uit maximaal drie trainingssessies, in de eerste sessie kijkt de medewerker mee met de trainer, in de tweede sessie mag de medewerker met hulp van de trainer de handeling zelf uitvoeren en in de derde sessie wordt de medewerker geacht te handeling zelf uit te kunnen voeren en wordt hij of zij ook op de uitvoering daarvan beoordeeld. Het deelnemen aan de trainingen wordt benoemd in het persoonlijk Competentie Dossier, op het certificaat of document waarin ontheffing wordt verleend. Niet alle trainingen zullen uit 3 sessies bestaan, in geval van onderwijs voor art. 9 functionarissen en studenten bij voorbeeld kan de training ook bestaan uit de eerste twee sessies.

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

Dit project omvat drie bijlages waarvan de inhoud gebaseerd is op de vraag vanuit de opleidingen, het lopende en toekomstig onderzoek (zie figuur 1). Alle handelingen waarin getraind moet worden staan per diergroep vermeld.



Figuur 1: Overzicht van eenvoudige tot complexe handelingen in verschillende diersoorten (met informatie over de opsplitsing in drie bijlages) met betrekking tot verschillende subdoelen. De breedte van de blokken voor verschillende diersoorten toont de relatieve hoeveelheid van de aantallen (hoogst: muizen, laagst: konijnen). Het grootste aantal muizen en ratten is voor simpele handelingen nodig. Bij andere diersoorten (van cavia tot geiten) worden alleen complexere specifieke handelingen toegepast of beperkte aantallen in het kader van onderwijs (cavia's) gebruikt.

1. Handelingen aan zebravissen (in detail beschreven in bijlage 1).

De in deze appendix getraind handelingen zijn naast genotypering, opereren onder anesthesie en doden gevolgd door verzamelen van organen.

2. Handelingen aan knaagdieren en haasachtige (muis, rat, cavia en konijn) (in detail beschreven in bijlage 2).

Er zijn verschillende handelingsgroepen waarin getraind moet worden: Verzorging, toediening- en injectietechnieken, bloedafname, non-invasieve handelingen, invasieve handelingen en handelingen die uitgevoerd worden na euthanasie.

3. Handelingen aan landbouwhuisdieren (varkens, geiten en schapen) (in detail beschreven in bijlage 3).

Deze handelingen zijn complexer en worden alleen voor specifieke ingrepen geoefend, vaak in speciale operatiecursussen voor chirurgische medewerkers.

De bestaande onderzoeksprotocollen (DEC protocollen) voor het oefenen van nieuwe technieken en de intake van nieuwe medewerkers zullen onderdeel worden van dit project (zie tabel 1 in de bijlagen voor het overzicht van de aantallen).

---

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 samenhang tussen de verschillende appendices is dat zij samen de training mogelijk maken die nodig is voor cursisten, studenten en medewerkers om bekwaam te worden of te blijven in handelingen aan proefdieren en in dierproeven.

---

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

| Volgnummer | Type dierproef  |
|------------|---|
| 1          | Handelingen aan zebravissen   |
| 2          | Handelingen aan knaagdieren en haasachtige (muis, rat, cavia en konijn) |
| 3          | Handelingen aan landbouwhuisdieren (varkens, geiten en schapen)         |
| 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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

|  |                                 |                             |
|--|---------------------------------|-----------------------------|
| 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.           | 11200                           |                             |
| 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in. | Vrije Universiteit te Amsterdam |                             |
| 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.     | Volgnummer                      | Type dierproef              |
|  | 1                               | Handelingen aan zebravissen |

*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.

Doelstelling van deze appendix is om personen te trainen in een aantal (al dan niet complexe) handelingen aan zebravissen in het kader van stage, opleiding, geldig DEC protocol (tot eind 2017) of CCD onderzoeksvergunningen. Hiertoe worden reeds bevoegde en nog onbevoegde medewerkers geleerd handelingen aan vissen uit te voeren die beschreven staan in het opleidingsplan, DEC protocol (tot eind 2017) of CCD project. Ook biedt deze appendix bevoegde onderzoekers de mogelijkheid om nieuwe technieken op kleine schaal uit te voeren om hier de noodzakelijke expertise mee op te doen en de haalbaarheid daarvan te kunnen inschatten.

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.

In de volgende tabel 1 staan de handelingen en technieken beschreven waarin getraind kan worden. Keuze voor deze handelingen en technieken is gebaseerd op het lopend onderzoek en het onderwijs zoals dat momenteel gegeven wordt. Voor alle handelingen zijn of worden standard operating procedures (SOPs) geschreven.

**Tabel 1:** Overzicht van de alle geplande handelingen bij zebravissen.

| Nr. | Handeling  | Bijzonderheid  | Duur   | Ongerief inschatting                                    |
|-----|--|--|--|---|
| 1   | Geslachtsbepaling  | Visueel  | enkele min                                     | geen  |
| 2   | Vinknippen<br>Vanaf week 10                                | Onder anesthesie   | enkele min                                     | licht   |
| 3   | Over of inzetten,<br>hanteren                              | Met pipet voor juvenielen tot 5 weken en met netje vanaf 5 weken                       | binnen 1 min                                   | licht   |
| 4   | Euthanasie   | Middels tricaine methanesulfonate  | enkele min                                     | terminaal (onder anesthesie)                            |
| 5   | Euthanasie   | Middels onderdompeling in ijswater   | binnen 1 min<br>bedwelmt, dood<br>binnen 5 min | terminaal (verdoofd door hypothermie, ijswater)         |
| 6   | Verzamelen organen, oog netvlies                           | Na euthanasie volgens SOP (ex vivo)  | euthanasie binnen 1 min, daarna variabel       |   |
| 7   | Decapitatie, gevolgd door doorboren hersenen en ruggenmerg | Zonder anesthesie, alleen te gebruiken als het interfereert met read-out van onderzoek | enkele sec                                     | zonder anesthesie: licht of onder anesthesie: terminaal |
| 8   | Injecteren ip of iv  | Onder anesthesie   | enkele min                                     | licht   |
| 9   | Cryobeschadiging deel hart                                 | Onder anesthesie   | enkele min                                     | terminal (onder anesthesie)                             |
| 10  | Andere biotechnische handelingen en nieuwe technieken      | Test voor haalbaarheid en toekomstige projecten  | variabel                                       | terminaal (onder anesthesie)                            |

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

Het doel is het bereiken van de juiste bekwaamheid van de medewerkers. Het is vooraf niet exact aan te geven hoeveel dieren er per trainingsvraag en per medewerker nodig zijn. Statistische methoden en technieken zijn hier niet van toepassing. Per trainingsvraag wordt gekeken hoeveel vissen gebruikt moeten worden. Hierbij zal er indien mogelijk gebruik worden gemaakt van surplus dieren (fokoverschot) en ook zullen verschillende handelingen gecombineerd getraind worden.

## B. De dieren

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

Zebravissen (*Danio rerio*) komen van een geregistreerde leverancier uit EU of USA of uit eigen fok. De training betreft juveniele zebravissen van dag 6 tot week 14 en adulte zebravissen, van beide geslachten. Voor de trainingen wordt zoveel mogelijk gebruik gemaakt van surplus dieren (fokoverschot).

Het te gebruiken aantal zebravissen wordt op basis van voorgaande jaren als volgt geschat:

Indien mogelijk worden de handelingen nr. 1 - 6 gecombineerd met als restrictie maximaal 3 handelingen per vis.

**Handelingen 1 – 6:** Elke te trainen medewerker zal een handeling in een training bestaande uit maximaal 3 trainingssessies leren, nl 1x voorgedaan, 1x met hulp oefenen en laatste keer zelfstandig en ter toetsing op bekwaamheid.

Wij verwachten 5 medewerkers te trainen per jaar. Van deze 5 medewerkers zijn max. 2 stagiaires en studenten en de overige 3 personen voor het bijhouden van het Competentie Dossier. Het aantal vissen per training zal variëren maar gemiddeld zal een medewerker maximaal 7 vissen per training gebruiken.

1 (set van maximaal 3 handelingen) x 5 (medewerkers) x 5 (jaar) x 7 (aantal vissen) = 175 zebravissen per 5 jaar.

**Handelingen 7 – 10:** Medewerkers zullen deze handelingen ook in een training bestaande uit maximaal 3 sessies moeten leren. We verwachten hiervoor 5 medewerkers per jaar, 3 personen voor bijhouden van het

Competentie Dossier en 2 personen voor nieuwe technieken. Gemiddeld zal een medewerker max. 6 vissen per training gebruiken.

4 (handelingen) x 5 (medewerkers) x 5 (jaar) x 6 (aantal vissen/handeling) = 100 zebravissen per 5 jaar. 40% van de vissen is juveniel en 60% adult.

**In totaal** worden maximaal  $100 + 175 = 275$  zebravissen/5 jaar gebruikt.

De hier berekende en aangevraagde aantallen dieren betreffen een maximaal aantal dieren, het is zeer goed mogelijk dat het werkelijke aantal dieren dat per jaar gebruikt gaat worden lager zal uitvallen.

### 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.

Als het trainingen met geen of gering ongerief betreft zullen de dieren in zoveel mogelijk andere trainingen gebruikt worden. Als het ongerief hoger zou worden dan licht worden de dieren gedood en niet hergebruikt. Dat wordt hier nooit verwacht.

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 training wordt voorafgegaan door een theoretische scholing gevolgd door uitleg van de te leren handeling aan de hand van een filmpje, SOP en demonstratie op dood dier (indien mogelijk). Dit kan helaas het gebruik van proefdieren niet compleet vervangen en is alleen een bijdrage tot vermindering.

**Vermindering:** In het algemeen zijn ingrepen zo ontworpen dat een minimaal aantal dieren wordt gebruikt om bekwaam te worden. Waar mogelijk worden de handelingen gecombineerd en zijn meerdere personen betrokken om het aantal dieren zo laag als mogelijk te houden. Het streven is om de trainingen uit te voeren met deze surplus dieren die anders zonder bestemming afgevoerd zouden worden.

**Verfijning:** De medewerkers worden individueel begeleid zodat er optimaal rendement uit training gehaald kan worden. Door een duidelijke instructie en het herhalen van de training worden de handelingen stapsgewijs geleerd en wordt onnodig lijden voorkomen. Om het ongerief zoveel mogelijk te vermijden wordt indien nodig gebruik gemaakt van adequate anesthesie en pijnbestrijding. Grotendeels worden invasieve ingrepen in een terminaal experiment onder anesthesie geleerd. Hierbij geldt wel de voorwaarde dat het cumulatieve ongerief voor het individuele dier licht is en niet hoger mag zijn. De voorkeur is meer vissen met minder ongerief (alleen licht of terminaal) te gebruiken. Deze ingrepen hebben als doel dat medewerkers door ervaring bekwaam worden om het ongerief van zebravissen bij toekomstige uitvoer van dierproeven te kunnen verminderen.

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 het ongerief zoveel mogelijk te vermijden wordt indien nodig gebruik gemaakt van adequate anesthesie. Waar mogelijk wordt de techniek in een terminaal experiment onder anesthesie geleerd.

---

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

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

Het betreft geen wettelijk voorgeschreven dierproeven. Dierproeven beschreven in deze appendix worden uitgevoerd in kader van onderwijs of opleiding en hiermee wordt voldaan aan de wettelijke eisen betreffende bevoegd en bekwaamheid.

## 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.

De zebravissen worden genarcotiseerd met tricaine methanesulfonate of door onderdompeling in ijswater, om zo onnodige pijn te voorkomen.

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Er worden geen andere vormen van welzijnsaantasting voorzien.



Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

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

Indien er sprake is van meer dan het vooraf ingeschatte ongerief (licht) zal de training onmiddellijk worden beëindigd.

#### J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

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

#### K. Classificatie van ongerief

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

Licht ongerief (30%), terminaal ongerief (70%).

De meeste dieren (70%) ondergaan alleen handelingen onder narcose en worden hierna gedood (terminaal ongerief). Een deel van de dieren ondergaat licht ongerief als gevolg van injecties, hanteren of vin knippen (30%), zie tabel 1 bij onderdeel A.

### 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.

Het onderzoek zal waar mogelijk worden uitgevoerd met surplus dieren waarvoor de bestemming altijd het doden is. Daarnaast is het doden van het dier onderdeel van de training.

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.

Het betreft in sommige gevallen het leren van de handelingen die in vergunde projecten zijn beschreven. Naast het gebruik van tricaine methanesulfonate worden zebravissen ook gedood door onderdompeling in ijswater. Voor deze methode is door de NVWA toestemming verleend. Ook worden zebravissen gedecapiteerd om weefsel te verzamelen.

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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

## 1

### Algemene gegevens

| 1.1        | Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.  | 11200   |            |                |   |   |
|------------|---|---|------------|----------------|---|---|
| 1.2        | Vul de naam van de instelling of organisatie in.  | Vrije Universiteit te Amsterdam   |            |                |   |   |
| 1.3        | Vul het volgnummer en het type dierproef in.<br><br><i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i> | <table><thead><tr><th>Volgnummer</th><th>Type dierproef</th></tr></thead><tbody><tr><td>2</td><td>Handelingen aan knaagdieren en haasachtige (muis, rat, cavia en konijn)</td></tr></tbody></table> | Volgnummer | Type dierproef | 2 | Handelingen aan knaagdieren en haasachtige (muis, rat, cavia en konijn) |
| Volgnummer | Type dierproef  |   |            |                |   |   |
| 2          | Handelingen aan knaagdieren en haasachtige (muis, rat, cavia en konijn)   |   |            |                |   |   |

## 2 Beschrijving dierproeven

### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Doelstelling van deze appendix is om personen te trainen in een aantal (al dan niet complexe) handelingen aan muis of rat in het kader van hun stage, opleiding, geldig DEC-protocol of onderzoeksproject. Hiertoe worden reeds bevoegde en nog onbevoegde medewerkers geleerd handelingen aan muizen, ratten, cavia's of konijnen uit te voeren die beschreven staan in hun opleidingsplan of project. Ook biedt deze appendix bevoegde onderzoekers de mogelijkheid om nieuwe (complexe) technieken op kleine schaal uit te voeren om hier de noodzakelijke expertise mee op te doen en de haalbaarheid daarvan te kunnen inschatten.

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.

In de volgende tabel 1 staan de handelingen en technieken waarin getraind kan worden. Keuze voor deze handelingen en technieken is gebaseerd op het lopend onderzoek en het onderwijs zoals dat momenteel gegeven wordt. Voor alle handelingen zijn of worden momenteel standard operating procedures (SOPs) geschreven.

Tijdens een trainingssessie wordt maximaal één handeling aan hetzelfde dier uitgevoerd. Dus bij voorbeeld bij de toediening en injectietechnieken of intraperitoneale injectie of intramusculaire injectie en bij de invasieve handelingen of het plaatsen van een pompje of het plaatsen van een window. Bij de handeling verzorging worden vanzelfsprekend wel verschillende methodes /onderdelen gecombineerd uitgevoerd.

De methodes die in deze appendix genoemd worden onder invasieve handelingen zullen eerst altijd in een terminaal experiment onder anesthesie uitgevoerd worden. Indien wenselijk zal een beperkt aantal dieren pas in een volgende trainingssessie mogen bijkomen uit anesthesie. Andere techniek is een verzamelnaam

voor handelingen of operaties waarvan nu niet bekend is of ze gebruikt gaan worden en of er een noodzaak is deze te trainen. De noodzaak deze te trainen zal altijd met onderbouwing voorgelegd worden aan de IvD. In alle gevallen zal de techniek eerst in een terminaal experiment onder anesthesie getraind worden voordat besloten wordt het dier bij te laten komen uit anesthesie.

**Tabel 1:** Overzicht van alle geplande handelingen bij muizen, ratten, cavia's en konijnen.

| Groep van handelingen/<br>individuele handelingen  | Omschrijving van de handeling   | Duur (maximaal) | Ongerief<br>inschatting |
|--|---|-----------------|-------------------------|
| <b>1. Basale handelingen zonder anesthesie</b>   |   |                 |                         |
| Hanteren en fixeren  |   | enkele min      | licht                   |
| Plug en dracht controle  |   | <1 min          | licht                   |
| Controle gebit   |   | enkele min      | licht                   |
| Oraal toedienen(gavage)  | alleen bij rat en muis  | enkele min      | licht                   |
| Injectie en toedienings-<br>technieken, bloedafname-<br>technieken                       | alle gangbare en nieuwe technieken<br>waarvoor geen anesthesie is vereist     | enkele min      | licht                   |
| Oor-, teen- of staart-knip   | tot PND8  | <1 min          | licht                   |
| staart-knip vanaf speen-leeftijd   | Onder inhalatie anesthesie  | <5 min          | licht                   |
| Testen en valideren van<br>gedragsopstellingen   | Nieuwe gedragstesten en systemen  | max. 2 uren     | licht                   |
| <b>2. Handelingen onder anesthesie</b>   |   |                 |                         |
| Anesthesie   | alle gangbare en nieuwe technieken  | max. 2 uren     | terminaal*/<br>matig**  |
| Tracheale intubatie en<br>plaatsen larynxmaske   | alle gangbare en nieuwe technieken  | max. 2 uren     | terminaal*/<br>matig**  |
| Beademing  | alle gangbare en nieuwe technieken  | max. 2 uren     | terminaal*/<br>matig**  |
| Identificatie en DNA collectie<br>voor genotype controle                                 |   | <1 min          | terminaal*              |
| Injectie en toedienings-<br>technieken, bloedafname-<br>technieken                       | alle gangbare en nieuwe technieken<br>waarvoor anesthesie is vereist          | enkele min      | terminaal*              |
| Testen en valideren van<br>apparatuur  | alle gangbare en nieuwe technieken<br>waarvoor anesthesie is vereist          | max. 2 uren     | terminaal*              |
| Transverse aortic constriction<br>en sham operatie                                       |   | max. 1 uur      | terminaal*/<br>matig**  |
| Left arterial ascending artery<br>ligatie (inductie myocard<br>infarct) en sham operatie |   | max. 1 uur      | terminaal*/<br>matig**  |
| Verwijderen of transplanteren<br>van organen of structuren                               |   | max. 2 uren     | terminaal*              |
| Spierisolatie  |   | max. 1 uur      | terminaal*/<br>matig**  |
| Oogoperaties   |   | max. 2 uren     | terminaal*/<br>matig**  |
| Plaatsen telemetrisch senders<br>en meetapparatuur                                       |   | max. 1 uur      | terminaal*/<br>matig**  |
| Cannulatie van arterien,<br>venen en ducti   | (b.v. jugulari, femoralis of galgang)   | max. 1 uur      | terminaal*/<br>matig**  |
| Stereotactische operaties en<br>injecties  | injecties in specifieke hersengebieden  | max. 1 uur      | terminaal*/<br>matig**  |
| Operaties aan de weke delen  |   | max. 2 uren     | terminaal*              |
| Operaties aan de botten  |   | max. 2 uren     | terminaal*              |
| Microchirurgisch operaties   | (b.v. plaatsen van craaniale windows,<br>plaatsen van osmotisch mini-pompjes) | max. 2 uren     | terminaal*/<br>matig**  |
| Implantatie of injectie van<br>cellen of embryo's  |   | max. 1 uur      | terminaal*/<br>matig**  |
| Plasmid injectie   | (b.v. in het hart)  | max. 1 uur      | terminaal*/<br>matig**  |
| Echocardiografie en  |   | max. 1 uur      | terminaal*/             |

|                                   |  |            |                    |
|-----------------------------------|--|------------|--------------------|
| contrastechografie                |  |            | matig**            |
| Hyperinsulinemische clamp         |  | max. 1 uur | terminaal          |
| Andere technieken*                |  | max. 2 uur | terminaal*/matig** |
| Ectomie organen                   | Bij neonatale en volwassen dieren na doden van dieren (b.v. darmisolatie voor practicum)                         | max. 1 uur | terminaal*         |
| Doden                             | alle gangbare en nieuwe technieken waarvoor anesthesie is vereist  | <5 min     | terminaal*         |
| Doden van pups                    | tot PND6: gekoeld op ijswater gevolgd door decapitatie   | enkele min | terminaal*         |
| Doden                             | vanaf PND6: CO <sub>2</sub> /O <sub>2</sub> gevolgd door CO <sub>2</sub> en andere technieken (b.v. decapitatie) | <5 min     | terminaal*         |
| <b>3. Postmortale handelingen</b> |  |            |                    |
| Dissectie, Obductie               | Weefsel ontnaam en/of orgaancollectie (b.v. T cellen isoleren voor onderwijs: minor experimentele immunologie)   | Na doden   | terminaal*         |

Afkortingen: PND = postnataal dag; \*onder narcose; \*\*als dieren weer uit de narcose bijkomen

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

Het doel is het bereiken van de juiste bekwaamheid van de medewerkers. Het is vooraf niet exact aan te geven hoeveel dieren er per trainingsvraag en per medewerker nodig zijn. Statistische methoden en technieken zijn hier niet van toepassing. Per trainingsvraag wordt gekeken hoeveel muizen of ratten gebruikt moeten worden. Hierbij zal er gebruik worden gemaakt van surplus muizen of ratten (fokoverschot) zover als mogelijk.

## B. De dieren

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

Muis (*Mus musculus*, zowel wildtype als genetische gemodificeerde muizen), rat (*Rattus norvegicus*, zowel wildtype als genetische gemodificeerde ratten), cavia (*Cavia porcellus*) en konijn (*Oryctolagus cuniculus*), waarbij geen sprake mag zijn van constitutioneel ongerief. Alle dieren komen van een geregistreerde leverancier uit EU of uit eigen fok. In het merendeel van de trainingen zal gebruik gemaakt worden van surplus dieren (b.v. fokoverschot). Zoals duidelijk wordt uit bovenstaande tabel betreft handelingen die getraind moeten worden met dieren in verschillende levensstadia. In principe is er geen voorkeur voor mannen of vrouwen tenzij de handelingen gekoppeld zijn aan het geslacht (b.v. verzamelen van embryo's uit geanestheseerd dier).

Het te gebruiken aantal muizen en ratten wordt op basis van voorgaande jaren als volgt berekend op de basis van intakes van nieuwe medewerkers per jaar en vroegere DEC vergunningen voor oefenprotocollen en onderwijs:

Een medewerker zal maximaal 5 handelingen trainen. Elke medewerker zal één handeling in een training bestaande uit maximaal 3 sessies leren, namelijk 1x voorgedaan, 1x met hulp oefenen en laatste keer zelfstandig en ter toetsing op bekwaamheid. Wij verwachten ~150 medewerkers per jaar te trainen. Van deze zijn rond 80 stagiaires, studenten en art. 9/12 intakes, 25 personen voor bijscholing, 20 personen voor nieuwe technieken en de overige 25 personen voor bijhouden van het Competentie Dossier. Het aantal muizen of ratten per training zal variëren maar gemiddeld zal een medewerker max. 6 dieren per training, gebruiken (afhankelijk van de complexiteit van de ingreep). Cavia's en konijnen worden alleen voor heel specifieke handelingen gebruikt of in enkele gevallen voor weefselontnaam in het onderwijs.

Voor ratten en muizen is de inschatting zoals beneden vermeldt:

54 (medewerkers) x 3 (handelingen: range 1-6) x 3 (ratten range 2-6) x 5 (jaar) = 2430 dieren

97 (medewerkers) x 3 (handelingen: range 1-6) x 3 (muizen: range 2-6) x 5 (jaar) = 4365 dieren

Voor cavia's en konijnen is de inschatting zoals beneden vermeldt:

Cavia's: 7 (medewerkers) x 4 (cavia's) x 5 (jaar) = 140 cavia's

Cavia's (onderwijs VUmc): 7 cavia's/jaar x 5 jaar = 35 cavia's  
**in totaal** 175 cavia's

Konijnen: 10 (medewerkers) x 2 (konijnen) x 5 (jaar) = 100 konijnen

In totaal zal het aantal dieren voor 5 jaar zijn:

4365 muizen voor 5 jaar  
2430 ratten voor 5 jaar  
175 cavia's voor 5 jaar  
100 konijnen voor 5 jaar  
Σ = 7070 dieren voor 5 jaar

De hier berekende en aangevraagde aantallen dieren betreffen een maximaal aantal dieren. Daarom is zeer goed mogelijk dat het werkelijke aantal dieren dat per jaar gebruikt gaat worden lager zal uitvallen.

### 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.

De afgelopen jaren bleek het mogelijk het merendeel van de trainingen uit te voeren met surplus dieren. Zie hiervoor ook vraag D. Daarom is er ook voor gekozen om maar een invasieve handeling per dier uit te voeren en niet verschillende invasieve handelingen te combineren om het ongerief per dier zo laag mogelijk te houden. Wanneer het een niet-invasieve handeling betreft, in tabel 1 zijn dat handelingen die onder verzorging/basale handelingen, gedragstesten en imaging technieken vallen, kunnen in kader van vermindering de (surplus) dieren hergebruikt worden.

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 training wordt voorafgegaan door een theoretische scholing gevolgd door uitleg van de te leren handeling aan de hand van een filmpje, SOP en demonstratie op dood dier (indien mogelijk). Dit kan helaas het gebruik van proefdieren niet compleet vervangen en is alleen een bijdrage tot vermindering.

**Vermindering:** In het algemeen zijn ingrepen zo ontworpen dat met een minimaal aantal dieren wordt gebruikt om bekwaam te worden. Waar mogelijk worden de handelingen gecombineerd en meerdere personen betrokken om het aantal dieren zo laag als mogelijk te houden. Het streven is om de trainingen uit te voeren met grotendeels surplus dieren (fokoverschot) die anders zonder bestemming afgevoerd zouden worden.

**Verfijning:** De medewerkers worden individueel begeleid zodat er optimaal rendement uit training gehaald kan worden. Door een duidelijke instructie en het herhalen van de training worden de handelingen stapsgewijs geleerd en wordt onnodig lijden voorkomen. Om het ongerief zoveel mogelijk te vermijden wordt indien nodig gebruik gemaakt van adequate anesthesie en pijnbestrijding. Grotendeels worden invasieve ingrepen in een terminaal experiment onder anesthesie geleerd. Hierbij geldt wel de voorwaarde dat het cumulatieve ongerief voor het individuele dier licht is en niet hoger mag zijn. Alleen in een beperkt aantal experimenten is het ongerief matig, omdat de dieren weer bijkomen om zo optimaal herstel na ingrepen te kunnen waarborgen. De voorkeur is meer dieren met minder ongerief (licht of terminaal) te

gebruiken. Deze ingrepen hebben als doel dat medewerkers door ervaring bekwaam worden om het ongerief van knaagdieren en konijnen bij de toekomstige uitvoer van dierproeven te kunnen verminderen. Verbeteringen van operatietechnieken m.b.t. nieuwe methodieken worden ingevoerd als deze het ongerief van het proefdier kunnen verminderen.

De training wordt voorafgegaan door een theoretische scholing gevolgd door uitleg van de te leren handeling aan de hand van een filmpje, SOP en demonstratie op dood dier. De training wordt gegeven door ervaren medewerkers. De medewerkers worden individueel begeleid zodat er optimaal rendement uit training gehaald kan worden. Het streven is om de trainingen uit te voeren met deze surplus dieren die anders zonder bestemming afgevoerd zouden worden. Er kunnen wel verschillende niet-invasieve handelingen op 1 dier geoefend worden om het aantal dieren zo laag mogelijk te houden. Door een duidelijke instructie (standard operating procedures, SOPs) en het herhalen van de training wordt de handelingen stapsgewijs geleerd en worden onnodig lijden voorkomen.

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 het ongerief zoveel mogelijk te vermijden wordt indien nodig gebruik gemaakt van adequate anesthesie en eventueel analgesie. Grotendeels wordt de techniek in een terminaal experiment onder anesthesie geleerd.

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

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

Het betreft geen wettelijk voorgeschreven dierproeven m.b.t. onderzoek. Dierproeven beschreven in deze bijlage worden uitgevoerd in kader van onderwijs of opleiding en hiermee wordt voldaan aan de wettelijke eisen betreffende bevoegd en bekwaamheid.

## 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.

Indien noodzakelijk worden de dieren op adequate wijze genarcotiseerd en wordt indien noodzakelijk (b.v. bijkomen na het ingreep) ook analgesie toegepast. In het merendeel van de experimenten zal het een training onder terminale anesthesie betreffen. Als de dieren na een chirurgische ingreep bijkomen uit anesthesie worden ze dagelijks gemonitord op hun gewicht, gedrag, uiterlijk en reacties op prikkels.

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Er worden geen andere vormen van welzijnsaantasting voorzien.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

n.v.t.

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

Indien er sprake is van meer dan het vooraf ingeschatte ongerief zal de training onmiddellijk worden beëindigd en het dier gedood.

### 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.

Dieren worden dagelijks gecontroleerd op afwijkend gedrag en uiterlijk. Zodra hun gewicht meer dan 15% afneemt t.o.v. van hun gewicht voor de operatie worden de dieren gedood.

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

<1%

### K. Classificatie van ongerief

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

De classificatie van cumulatief ongerief ingeschat op de basis van de verschillende ingrepen bij de verschillende knaagdiersoorten is:

Muizen: terminaal = 65%; licht = 25%, matig = 10%

Ratten: terminaal = 50%; licht = 40%, matig = 10%

Cavia's: terminaal = 85%; licht = 10%, matig = 5%

Konijnen: terminaal = 85%; licht = 10%, matig = 5%

De meeste dieren (85%) ondergaan alleen handelingen onder narcose en worden hierna gedood (terminaal ongerief). Een deel van de dieren ondergaat licht ongerief als gevolg van handelingen zonder anesthesie, zoals hanteren, injecties of bloedafname (10%) en in 5-10% van de gevallen zullen de dieren matig ongerief ondergaan, omdat ze na een ingreep bijkomen, zie tabel 1 bij onderdeel A. Dit is nodig om het herstel van de operatie te kunnen monitoren. Alle dieren worden gedood voordat het ongerief de ongeriefclassificatie 'matig' overstijgt.

## 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.

Het onderzoek zal waar mogelijk worden uitgevoerd met surplus dieren waarvoor de bestemming altijd het doden is. Daarnaast kan het doden van het dier onderdeel of einddoel van de training zijn.

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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef  |
|------------|---|
| 3          | Handelingen aan landbouwhuisdieren (varkens, schapen en geiten) |
- 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.

Doelstelling van deze appendix is om personen te trainen in een aantal complexe handelingen aan varkens, geiten en schapen in het kader van hun opleiding, geldig DEC project (tot 1-1-2018) of verleende CCD projectvergunning. Hierbij leren reeds bevoegde medewerkers handelingen aan varkens, geiten en schapen uit te voeren die beschreven staan in het opleidingsplan, DEC protocol (tot 1-1-2018) of CCD project. Ook biedt deze appendix bevoegde onderzoekers de mogelijkheid om nieuwe technieken op kleine schaal uit te voeren om hier de noodzakelijke expertise mee op te doen en de haalbaarheid daarvan te kunnen inschatten.

En groot aandeel van de dieren is nodig voor het trainen van medisch professionals. Ze hebben geen art. 12 of 9 maar mogen wel getraind worden op proefdieren zoals beademingscursussen voor intensivisten en anesthesiologen, en allerlei chirurgische cursussen voor chirurgen al dan niet in opleiding. Hiervoor worden grotendeels varkens gebruikt.

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.

In de onderstaande tabel 1 staan de handelingen en technieken beschreven waarin getraind kan worden. De keuze voor deze handelingen en technieken zijn gebaseerd op het lopend onderzoek en het onderwijs zoals dat momenteel gegeven wordt. Voor alle handelingen zijn of worden momenteel standard operating procedures (SOPs) geschreven.

**Tabel 1:** Overzicht van de alle geplande handelingen en technieken bij varkens, geiten en schapen.

| Groep van handelingen/<br>individuele handelingen                                     | Omschrijving van de handling   | Duur (maximaal) | Ongerief inschatting |
|---|--|-----------------|----------------------|
| <b>1. Basale handelingen zonder anesthesie</b>  |  |                 |                      |
| Hanteren en fixeren   |  | enkele min      | licht                |
| Injectie en toedienings-<br>technieken, bloedafname-<br>technieken                    | alle gangbare en nieuwe technieken<br>waarvoor geen anesthesie is vereist                                  | enkele min      | licht                |
| Hoeven bekappen   | # Alleen bij geiten en schapen   | enkele min      | licht                |
| <b>2. Handelingen onder anesthesie</b>  |  |                 |                      |
| Anesthesie  | alle gangbare en nieuwe technieken   | max. 8 uren     | terminaal*           |
| Tracheale intubatie en<br>plaatsen larynxmasker                                       | alle gangbare en nieuwe technieken   | max. 2 uren     | terminaal*           |
| Beademing   | alle gangbare en nieuwe technieken   | max. 2 uren     | terminaal*           |
| Injectie en toedienings-<br>technieken, bloedafname-<br>technieken                    | alle gangbare en nieuwe technieken<br>waarvoor anesthesie is vereist                                       | enkele min      | terminaal*           |
| Testen en valideren van<br>apparatuur   | alle gangbare en nieuwe technieken<br>waarvoor anesthesie is vereist                                       | max. 2 uur      | terminaal*           |
| Verwijderen of transplanteren<br>van organen of structuren                            |  | max. 2 uren     | terminaal*           |
| Spierisolatie   |  | max. 1 uur      | terminaal*           |
| Oogoperaties  |  | max. 2 uren     | terminaal*           |
| Plaatsen telemetrisch senders<br>en meetapparatuur                                    |  | max. 1 uur      | terminaal*           |
| Cannulatie van arterien,<br>venen en ducti  | (b.v. jugulari, femoralis of galgang)  | max. 1 uur      | terminaal*           |
| Operaties aan de weke delen   |  | max. 2 uren     | terminaal*           |
| Microchirurgisch operaties  | (b.v. plaatsen van craaniale windows,<br>plaatsen van osmotisch mini-pompjes)                              | max. 2 uren     | terminaal*           |
| Orthopedisch operaties  | # (b.v. botimplantatie, etc.) alleen bij<br>geiten en schapen  | max. 8 uren     | terminaal*           |
| Hartoperaties: katheders<br>plaatsen, hartvatten openen,<br>pacemakers plaatsen, etc. | voor de invoer van nieuwe<br>operatietechnieken en pacemakers bij<br>varkens en schapen i.v.m. hartziektes | max. 8 uren     | terminaal*           |
| andere nieuwe technieken die<br>momenteel nog niet bekend<br>zijn                     | andere nieuwe technieken die<br>momenteel nog niet bekend zijn   | max. 8 uren     | terminaal*           |
| Euthanaseren  | alle gangbare en nieuwe technieken<br>waarvoor anesthesie is vereist                                       | <5 min          | terminaal*           |
| <b>3. Postmortale handelingen</b>   |  |                 |                      |
| Dissectie, Obductie   | Weefselontname en/of orgaancollectie   | Na euthanaseren | terminaal            |

\*onder narcose

Bijna alle handelingen zullen bij alle drie de diersoorten onder narcose worden uitgevoerd (# sommige ingrepen zijn alleen voor geiten en schapen), tenzij het basale handelingen zonder anesthesie betreft (dit veroorzaakt licht ongerief). Na handelingen onder anesthesie zullen de dieren in de proef worden gedood. Daarom is de inschatting van het ongerief voor de meeste ingrepen 'terminaal' voor alle drie de diersoorten (varkens, geiten en schapen).

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

Het doel is het bereiken van de juiste bekwaamheid van de medewerkers. Het is vooraf niet exact aan te geven hoeveel dieren er per trainingsvraag en per medewerker nodig zijn. Statistische methoden zijn hier niet van toepassing. Per trainingsvraag wordt gekeken hoeveel varkens gebruikt moeten worden. Dit wordt afgestemd met de Instantie van Dierenwelzijn (IvD).

## B. De dieren

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

Varkens (*Sus scrofa domestica*), geiten (*Capra hircus*) komen en schapen (*Ovis aries*) komen van geregistreerd leveranciers uit de EU. De training betreft dieren waar mogelijk mannetjes en vrouwtjes van een gewicht van 5 kg (beademing van biggen als model voor neonaten) tot volwassen dieren. In principe is er geen voorkeur voor mannen of vrouwen tenzij de handelingen gekoppeld is aan het geslacht, maar uit ervaring weten we dat bij geiten en schapen vaak vrouwen worden geleverd.

Het te gebruiken aantal dieren wordt op basis van voorgaande jaren als volgt geschat:

Er worden tijdens de anesthesie zo veel mogelijk verschillende handelingen uitgevoerd zolang het verenigbaar is met het leven.

**Handelingen:** Elke te trainen medewerker zal een handeling in een training bestaande uit maximaal 3 trainingssessies leren, namelijk 1x voorgedaan, 1x met hulp oefenen en laatste keer zelfstandig ter toetsing op bekwaamheid.

Wij verwachten ~96 medewerkers en artsen te trainen per jaar. Voor het bijhouden van het Competentie Dossier en om ervaring op te doen voor operaties. Het aantal varkens per training zal variëren maar gemiddeld zullen meerdere professionals (gemiddeld 2) worden getraind per varken. Bij bepaalde ingrepen is herhaling (~2 dieren/medewerker) noodzakelijk zoals bij bot implantatie bij geiten en/of schapen.

Voor het ontwikkelen en testen van nieuwe hartoperatietechnieken zijn voor een cardiovasculaire onderzoeksgroep per jaar 15 varkens en 15 schapen nodig.

63 (aantal varkens) x 5 (jaar) = 315 varkens per 5 jaar

25 (aantal geiten) x 5 (jaar) = 125 geiten per 5 jaar

40 (aantal schapen) x 5 (jaar) = 200 schapen per 5 jaar

**In totaal** worden maximaal 640 landbouwhuisdieren in 5 jaar gebruikt.

De hier berekende en aangevraagde aantallen dieren betreffen een maximaal aantal dieren, het is zeer goed mogelijk dat het werkelijke aantal dieren dat per jaar gebruikt gaat worden lager zal uitvallen.

### 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 training wordt voorafgegaan door een theoretische scholing gevolgd door uitleg van de te leren handeling aan de hand van een filmpje, SOP en demonstratie op dood dier (indien mogelijk). Dit kan helaas het gebruik van proefdieren niet compleet vervangen en is alleen een bijdrage tot vermindering.

**Vermindering:** In het algemeen zijn ingrepen zo ontworpen dat met een minimaal aantal dieren wordt gebruikt om bekwaam te worden. Waar mogelijk worden de handelingen gecombineerd en meerdere personen betrokken om het aantal dieren zo laag als mogelijk te houden. Bij operaties zijn meerdere medewerkers aanwezig om hun theoretisch kennis tijdens de ingrepen te verbeteren ook als alleen één medewerker de ingrepen uitvoert. Alle handelingen zoals aangegeven in Tabel 1 worden gecombineerd om

het aantal benodigde proefdieren zo laag als mogelijk te houden (b.v. max. 3 sessies per medewerker).

**Verfijning:** De medewerkers worden individueel begeleid zodat er optimaal rendement uit training gehaald kan worden. Door een duidelijke instructie en het herhalen van de training worden de handelingen stapsgewijs geleerd en wordt onnodig lijden voorkomen. Om het ongerief zoveel mogelijk te vermijden wordt indien nodig gebruik gemaakt van adequate anesthesie en pijnbestrijding. Grotendeels worden invasieve ingrepen in een terminaal experiment onder anesthesie geleerd. Hierbij geldt wel de voorwaarde dat het cumulatieve ongerief voor het individuele dier licht is en niet hoger mag zijn.

Alleen in een beperkt aantal experimenten is het ongerief licht, vanwege hanteren en fixeren, injecties, bloedafname of hoeven bekappen. De voorkeur is meer dieren met minder ongerief (licht of terminaal) te gebruiken. Deze ingrepen hebben als doel dat medewerkers door ervaring bekwaam worden om het ongerief van de landbouwhuisdieren bij toekomstige uitvoer van dierproeven te kunnen verminderen. Verbeteringen van operatietechnieken m.b.t. nieuwe methodieken worden ingevoerd als deze het ongerief van het proefdier kunnen verminderen.

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

Alle ingrepen worden onder adequate anesthesie met pijnstilling uitgevoerd in een terminaal experiment dat lijden/ongerief bij de dieren voorkomt.

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

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

Het betreft geen wettelijk voorgeschreven dierproeven. Dierproeven beschreven in deze appendix worden uitgevoerd in kader van onderwijs of opleiding en hiermee wordt voldaan aan de wettelijke eisen betreffende bevoegd- en bekwaamheid en bijscholing van operatietechnieken bij medisch personeel (artsen).

## 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.

Pijnstilling is toegepast voor en tijdens de operatie zoals geselecteerd op de basis van ervaring.

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Er worden geen andere vormen van welzijnsaantasting voorzien i.v.m. terminale ingrepen.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

n.v.t.

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

n.v.t.

### J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

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

### K. Classificatie van ongerief

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

Varkens: licht ongerief (20%) en terminaal ongerief (80%)

Geiten: licht ongerief (20%) en terminaal ongerief (80%)

Schapen: licht ongerief (20%) en terminaal ongerief (80%)

De meeste dieren (80%) ondergaan alleen handelingen onder narcose en worden hierna gedood (terminaal ongerief). Een deel van de dieren ondergaat licht ongerief als gevolg van handelingen zonder anesthesie, zoals hanteren, injecties, hoeven bekappen of bloedafname (20%), zie tabel 1 bij onderdeel A.

## 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.

Het doden van het dier is onderdeel van de training omdat dit een terminale proef is en om weefsel voor postmortale handelingen te verzamelen.

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:  
*Het NVWA nummer is 11200*
2. Titel van het project:  
*Onderwijs en training in eenvoudige en complexe handelingen met proefdieren*
3. Titel van de NTS:  
*Onderwijs en training in eenvoudige en complexe handelingen met proefdieren*
4. Type aanvraag:  
*Nieuwe aanvraag projectvergunning*
5. Contactgegevens DEC:
  - naam DEC: *Vrije Universiteit Amsterdam / VU medisch centrum*
  - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
  - e-mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
  - ontvangen door DEC: *02-05-2017*
  - aanvraag compleet: *02-05-2017*
  - in vergadering besproken: *09-05-2017*
  - anderszins behandeld: *n.v.t*
  - termijnonderbreking(en) van / tot: *09-05-2017 tot 16-06-2017*
  - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen: *n.v.t.*
  - aanpassing aanvraag: *16-06-2017*
  - advies aan CCD: *21-06-2017*
7. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.
  - Datum advies IvD: *02-05-2017*
  - Strekking advies IvD: *De IvD geeft aan dat de aanvrager het project met de IvD heeft afgestemd en dat deze de instemming heeft van de IvD.*
8. Eventueel horen van aanvrager: *n.v.t.*
9. Correspondentie met de aanvrager

### Vraagronde 1

- Datum: *09-05-2017*
- Strekking gestelde vragen: *1. Hoeveel mensen worden er opgeleid? 2. Geeft meer inzicht in de ingrepen, operaties allemaal onder anesthesie? 3 Ook licht ongerief vermelden bij zebravissen en landbouwhuisdieren 4. In de bijlagen meer uitleg bij de 3 V's toevoegen.*
- Datum antwoord: *16-06-2017*
- Strekking van de antwoord(en): *1. In totaal rond 450 medewerkers (studenten, promovendi, postdocs, onderzoekers, diervverzorgers, technici en artsen), onder wie rond 100 met art.12/6 en rond*

350 met art.9. Daarnaast leert men hoe complexe operaties optimaal kunnen worden uitgevoerd, deze zijn ook voor toepassing voor artsen die moeten oefenen voor ze humane ingrepen uitvoeren. 2. Er wordt een breed spectrum van ingrepen uitgevoerd bij verschillende proefdieren, van lichte handelingen zonder narcose tot complexe operaties onder narcose. De meeste dieren ondergaan alleen handelingen onder narcose en worden hierna gedood (terminaal ongerief). Een deel van de dieren ondergaat licht ongerief als gevolg van handelingen zonder anesthesie, zoals hanteren, injecties of bloedafname en bij de knaagdieren/konijnen zal een klein deel van de dieren (5-10%) matig ongerief ondergaan, omdat ze na een ingreep bijkomen. Dit is nodig om het herstel van de operatie te kunnen monitoren. Alle dieren worden gedood voordat het ongerief de ongeriefclassificatie matig overstijgt. 3. Is aangepast 4. De 3 V's zijn opgesplitst en uitgebreid vermeldt, zie onderdeel D van de bijlagen.

- De antwoorden hebben wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag: Ja, de antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

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

## B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunning plichtig. Het omvat dierproeven in de zin der wet.
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om over deze projectvergunningaanvraag te adviseren. De benodigde expertise op dit wetenschappelijk terrein is aanwezig binnen de DEC.
4. Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom: n.v.t., geen van de leden is betrokken bij dit project.

## 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).

*De DEC is van mening dat deze aanvraag een concrete doelstelling heeft en dat het een samenhangend geheel is, het kan getypeerd worden als een project. Het gaat hier om een project waarbij medewerkers worden getraind in eenvoudige en complexe handelingen met proefdieren. Om zo de uitvoer van onderzoek op een hoger niveau te brengen, het aantal benodigde dieren en het ongerief te verminderen en de kennis van nieuwe technieken te verhogen. Daarnaast worden artsen opgeleid en getraind in chirurgische ingrepen. De DEC is er daardoor van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien het bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.*

2. Signaleer of er mogelijk tegenstrijdige wetgeving is die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan. Het gaat hier om wetgeving die gericht is op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort (bijvoorbeeld Wet dieren en Wet Natuurbescherming).: n.v.t.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie hoger onderwijs of opleiding is in overeenstemming met de hoofddoelstelling. De doelstelling is helder omschreven.



### **Belangen en waarden**

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen. Beoordeel of het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld.

*Het doel van dit project is om VU- en VUmc-medewerkers, studenten en artsen te trainen in een aantal eenvoudige of complexe handelingen aan verschillende proefdiersoorten in het kader van hun onderzoek, opleiding of stage. Men leert pijn, stress en ongerief te herkennen en te verminderen door optimale verdoving en pijnbestrijding toe te passen, of op andere manieren, zoals aangepaste huisvesting. Daarnaast leert men hoe complexe operaties optimaal kunnen worden uitgevoerd.*

*Het uiteindelijke doel is om de uitvoer van onderzoek op een hoger niveau te brengen om het aantal benodigde dieren in onderzoeksprojecten te kunnen verminderen, door het verlagen van de uitval en het ongerief en het verhogen van de kennis van nieuwe technieken. Daarnaast zullen artsen getraind worden in chirurgische ingrepen, om daarmee de kwaliteit van ingrepen bij patiënten te verbeteren. Er is een reële relatie tussen deze beide doelstellingen.*

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 project zijn: De proefdieren, medewerkers en de maatschappij. De waarden die voor proefdieren in het geding zijn: De integriteit en het welzijn van de dieren zal worden aangetast vanwege lichte ingrepen zonder narcose en omdat de dieren worden gedood. De waarde van deze proef voor de medewerker is: Het vergroten van de kennis over het optimaal omgaan met proefdieren en uitvoeren van dierproeven in het kader van hun onderzoek, opleiding of stage. De waarden voor de maatschappij: Het belang van goed onderzoek en een goede training en opleiding van artsen.*

6. Is er aanleiding voor de DEC om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken?: n.v.t

### **Proefopzet en haalbaarheid**

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw beoordeling toe.

*Naar de overtuiging van de DEC beschikt de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen om de projectdoelstelling met de gekozen strategie/aanpak op de juiste wijze te realiseren. Alle technische voorzieningen zijn voorhanden, evenals voldoende deskundigheid en financiering. Ervaring binnen het onderzoeksinstituut met vergelijkbare trainingen van medewerkers, studenten en artsen waarborgt het technisch succesvol uitvoeren hiervan.*

8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw beoordeling toe.

*De aanvraag heeft een navolgbare opbouw en is naar de mening van de DEC goed opgezet. De voorgestelde experimenten/trainingen zijn helder en sluiten aan bij de aangegeven doelstellingen. De gevraagde looptijd van 5 jaar acht de DEC reëel gezien het aantal personen*

*(medewerkers, studenten en artsen) dat jaarlijks betrokken is bij training en onderwijs binnen VU en VUmc en de ervaring met het opleiden van deze personen.*

### **Welzijn dieren**

9. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren: *n.v.t.*

*Alle dieren worden gefokt voor het gebruik in dierproeven. Het onderzoek zal waar mogelijk worden uitgevoerd met surplus dieren waarvoor de bestemming altijd het doden is. Er is geen sprake van bedreigde diersoorten, niet-menselijke primaten, zwerfdieren en/of dieren in/uit het wild. De locatie is binnen de instelling van de vergunninghouder. De dieren krijgen adequate verdoving en pijnbestrijding.*

10. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU.

*De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de richtlijn.*

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

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

*Het ongerief is terminaal, licht of matig. Bij terminaal ongerief zijn er naast het doden geen andere negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren te verwachten, omdat het hier ingrepen onder anesthesie betreft. Een deel van de dieren zal licht ongerief ervaren als gevolg van handelingen zonder anesthesie, zoals injecties of bloedafname.*

*Voor zebravissen is het ongerief bij 70% terminaal en bij 30% licht. Bij de landbouwhuisdieren is sprake van 80% terminaal en 20% licht ongerief. Voor de knaagdieren en konijnen is het ongerief bij 50-85% van de dieren terminaal, bij 10-40% licht en 5-10% matig.*

*Een gedeelte van de knaagdieren (muizen, ratten, cavia's) en konijnen (5 tot 10% ) zal matig ongerief ervaren als gevolg van het bijkomen uit een operatie. Dit is nodig om het herstel van de dieren na de operatie te kunnen monitoren. Alle dieren zullen worden gedood voordat het ongerief de ongeriefclassificatie 'matig' overstijgt.*

12. Het uitvoeren van dierproeven zal naast het ongerief vaak gepaard gaan met aantasting van de integriteit van het dier. Beschrijf op welke wijze er sprake is van aantasting van integriteit.

*De integriteit van de dieren zal worden aangetast omdat de dieren handelingen ondergaan en worden gedood.*

13. Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. Licht uw beoordeling toe.

*Wanneer het ongerief terminaal is, is er geen sprake van humane eindpunten. De knaagdieren (muizen, ratten, cavia's) en konijnen die bijkomen uit een operatie, worden dagelijks gecontroleerd op gedrag en uiterlijk. Zodra hun gewicht meer dan 15% afneemt t.o.v. van hun*

*gewicht voor de operatie worden de dieren gedood (de kans hierop is <1%).*

### **3V's**

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

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

*Voor het goed en adequaat uitvoeren van onderzoek met levende dieren is het cruciaal dat de betreffende verzorgers/onderzoekers de juiste vaardigheden leren en deze getoetst kunnen worden. Hiervoor moet men oefenen met levende dieren. Het behalen van een basisset aan vaardigheden is het entree-criterium voor medewerkers die voor proefdieronderzoek geautoriseerd zijn (art.12/6, art.9). Voor de training wordt gebruik gemaakt van een instructiefilm en een demonstratie op een dood dier. Daarnaast worden zoveel mogelijk dieren gebruikt die al moesten worden afgevoerd (surplus vanwege leeftijd/overtolligheid).*

*De keuze voor het gebruik van zebrafissen, knaagdieren plus konijnen en landbouwhuisdieren is naar het oordeel van de DEC gerechtvaardigd. De keuze voor de verschillende diersoorten is gebaseerd op het lopende -en voorgenomen onderzoek bij de VU en het VUmc en op het onderwijs in beide instellingen zoals dat nu plaatsvindt. De keuze van de diersoort is afhankelijk van de techniek die moet worden aangeleerd en/of het soort experiment dat wordt toegepast.*

15. Beoordeel of het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en of er een heldere strategie is om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Licht uw beoordeling toe.

*In het project wordt optimaal tegemoetgekomen aan de vereiste van de vermindering van dierproeven.*

*Voorafgaand aan iedere training wordt bepaald of de training daadwerkelijk nodig is en hoeveel dieren hiervoor gebruikt mogen worden met inachtneming van de alternatieven zoals hierboven geschetst om zo het aantal dieren zo laag mogelijk te houden. Waar mogelijk worden de handelingen gecombineerd. Hierbij geldt de voorwaarde dat het cumulatieve ongerief voor het individuele dier maximaal matig mag zijn.*

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

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

*Het doel is om optimale bekwaamheid van de medewerkers, studenten en artsen te bereiken. Om bij toekomstige ingrepen het ongerief bij de proefdieren zoveel mogelijk te beperken en de uitval van dieren tijdens complexe proeven te verminderen. Alleen personen die geautoriseerd/bevoegd zijn in het hanteren en behandelen van deze dieren worden getraind. Om de mate van ongerief zoveel mogelijk te verminderen wordt er indien nodig gebruik gemaakt van adequate anesthesie en analgesie. Het laatste onderdeel van de training is een toetsing van de verkregen bekwaamheid*

*zodat al het proefdieronderzoek, dat vervolgens wordt uitgevoerd, goede en betrouwbare resultaten oplevert en resulteert in een vermindering van het aantal dieren en het ongerief.*

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.

*Beide geslachten zullen worden gebruikt. Er is geen voorkeur voor mannen of vrouwen, tenzij de handelingen gekoppeld zijn aan het geslacht (b.v. verzamelen van embryo's uit een geanestheseerd vrouwelijk dier).*

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

*Het doden van het dier is een onderdeel of einddoel van de training. Daarnaast wordt er weefsel verzameld voor postmortale handelingen. Het onderzoek zal waar mogelijk worden uitgevoerd met surplus dieren waarvoor de bestemming altijd het doden is.*

*Voor het doden van de knaagdieren, konijnen en landbouwhuisdieren wordt een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast. Zebravissen zullen worden gedood door het gebruik van tricaine methanesulfonate, gedecapiteerd of door onderdompeling in ijswater (voor deze methode is door de NVWA toestemming verleend).*

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

*Herplaatsing of hergebruik van landbouwhuisdieren is niet mogelijk, omdat het hier (terminale) experimenten met de dood als eindpunt betreft.*

***NTS***

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

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

## D. Ethische afweging

### 1. Benoem de centrale morele vraag

*Rechtvaardigen de doeleinden van dit project het voorgestelde gebruik van de dieren?*

*Bij deze dierproef is de centrale morele vraag: Rechtvaardigt het trainen van VU- en VUmc medewerkers, studenten en artsen in eenvoudige of complexe handelingen aan verschillende proefdiersoorten voor hun onderzoek of opleiding het gebruik van maximaal 275 zebavissen, 7070 knaagdieren/konijnen en 640 landbouwhuisdieren in de dierproeven die daarvan terminaal, licht of matig ongerief ondervinden?*

### 2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn, ten opzichte van elkaar af.

*De waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal worden aangetast omdat de dieren handelingen ondergaan en/of worden gedood. Dit zorgt voor licht tot matig nadeel voor deze proefdieren. De waarden voor de medewerkers: veel voordeel vanwege het opdoen van kennis en vaardigheden in het kader van hun onderzoek of opleiding. De waarden voor de maatschappij: Het belang van een goede training en opleiding van artsen.*

*De DEC is van mening dat de baten van dit project, de kennisontwikkeling van de medewerkers en het op een hoger niveau brengen van de uitvoer van dierproeven dankzij dit project, zwaarder wegen dan de belangen van de 275 zebavissen, 7070 knaagdieren/konijnen en 640 landbouwhuisdieren die hiervoor als proefdieren gebruikt worden. Er zijn op dit moment geen alternatieven voor deze dierproeven beschikbaar waarmee men de doelstellingen kan bereiken.*

### 3. Beantwoord de centrale morele vraag. Maak voor het beantwoorden van deze vraag gebruik van bovenstaande afweging van morele waarden.

*Volgens de DEC rechtvaardigen de doeleinden van dit project het voorgestelde gebruik van dieren. Het directe doel van deze studie is het opleiden en trainen van medewerkers en artsen in handelingen aan proefdieren. Het verwachte resultaat, in het kader van het verbeteren van de uitvoer van onderzoek, het verminderen van het aantal benodigde dieren of het ongerief en het verhogen van de kennis van nieuwe technieken en het vervaardigen van chirurgische technieken, is afgewogen tegen het, als terminaal tot matig geschatte ongerief en het doden van de dieren in de proef.*

*De DEC onderschrijft dat de doelstellingen niet zonder het gebruik van proefdieren kunnen worden behaald en acht het gebruik van maximaal 75 zebavissen, 7070 knaagdieren/konijnen en 640 landbouwhuisdieren en de daarmee samenhangende schade aan deze dieren gerechtvaardigd. Bij het uitvoeren van de dierproeven wordt een adequate invulling gegeven aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en verfijning van de dierproeven. Het project is van substantieel belang en van goede kwaliteit.*

*Dit onderzoek is van belang voor de opleiding van medewerkers en is ook bij wet verplicht voor de bekwaamheid van de medewerkers. Daarnaast maakt men efficiënt gebruik van dieren die over zijn via fok of andere wijze. De DEC acht het waarschijnlijk dat op basis van dit project de uitvoer van proefdieronderzoek op een hoger niveau komt; de kennis van nieuwe technieken wordt vergroot en het aantal benodigde dieren/de mate van ongerief in dierproeven verminderd.*

*Samenvattend kan worden gesteld dat de belangen van het project naar het oordeel van de DEC opwegen tegen het gebruik van maximaal 275 zebravissen, 7070 knaagdieren/konijnen en 640 landbouwhuisdieren en het daarbij verwachte terminale tot matige ongerief.*

## **E. Advies**

### 1. Advies aan de CCD

*De DEC adviseert de vergunning te verlenen.*

### 2. Het uitgebrachte advies kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt in de DEC.

*Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.*

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

*Er zijn geen dilemma's geconstateerd.*



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Amsterdam



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD1120020172349

**Bijlagen**

2

Datum 27 juni 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 26 juni 2017. Het gaat om uw project "Onderwijs en training in eenvoudige en complexe handelingen met proefdieren". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1120020172349. 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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

**Datum:**

27 juni 2017

**Aanvraagnummer:**

AVD1120020172349

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:



- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur



**Datum:**  
27 juni 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD1120020172349


### **Gegevens aanvrager**

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 11200  
Naam instelling of organisatie: Vrije Universiteit Amsterdam  
Naam portefeuillehouder of  
diens gemachtigde:   
KvK-nummer: 53815211  
Straat en huisnummer: BoeIelaan 1105  
Postcode en plaats: 1081 HV AMSTERDAM  
Tenaamstelling van het  
rekeningnummer: 

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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



**Datum:**  
27 juni 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD1120020172349

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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



Gegevens gemachtigde

BSN:  
Naam:  
Adres:  
Postcode en plaats:  
Wilt u een nieuwe machtiging  
afgeven? Ja



Wat mag de gemachtigde  
doen?

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

**Over uw aanvraag**

Wat voor aanvraag doet u?

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

**Over uw project**

Geplande startdatum: 1 november 2017  
Geplande einddatum: 31 oktober 2022  
Titel project: Onderwijs en training in eenvoudige en complexe handelingen met proefdieren  
Titel niet-technische samenvatting: Onderwijs en training in eenvoudige en complexe handelingen met proefdieren  
Naam DEC: DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum  
Postadres DEC: [REDACTED] Amsterdam Nederland  
E-mailadres DEC: [REDACTED]

**Datum:**

27 juni 2017

**Aanvraagnummer:**

AVD1120020172349

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 1.541,-  
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

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

**Ondertekening**

Naam: [REDACTED]  
Functie: [REDACTED]  
Plaats: Amsterdam  
Datum: 26 juni 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  
AVD1120020172349  
**Bijlagen**  
2

Datum 27 juni 2017  
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 27 juni 2017  
Vervaldatum: 27 juli 2017  
Factuurnummer: 172349  
Ordernummer: Inkoopordernummer: kostenplaatnummer 3008101

| Omschrijving  | Bedrag     |
|---|------------|
| Betaling leges projectvergunning dierproeven<br>Betreft aanvraag AVD1120020172349 | € 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

Vrije Universiteit Amsterdam



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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD1120020172349  
**Bijlagen**  
1

Datum 19 juli 2017  
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 

Op 26 juni 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Onderwijs en training in eenvoudige en complexe handelingen met proefdieren" met aanvraagnummer AVD1120020172349. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

#### **Beslissing**

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

U kunt met uw project "Onderwijs en training in eenvoudige en complexe handelingen met proefdieren" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 november 2017 tot en met 31 oktober 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

#### **Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum gevoegd. Dit advies is opgesteld op 21 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. 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.

**Datum:**

19 juli 2017

**Aanvraagnummer:**

AVD1120020172349

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](http://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

**Bijlagen:**

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



# Projectvergunning

## gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

**Naam:** Vrije Universiteit Amsterdam

**Adres:** Boelelaan 1105

**Postcode en plaats:** 1081 HV AMSTERDAM

**Deelnemersnummer:** 11200

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 november 2017 tot en met 31 oktober 2022, voor het project "Onderwijs en training in eenvoudige en complexe handelingen met proefdieren" met aanvraagnummer AVD1120020172349, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 26 juni 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 26 juni 2017;
  - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 26 juni 2017;
  - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 21 juni 2017, ontvangen op 26 juni 2017.

**Aanvraagnummer:**  
AVD1120020172349

| Naam proef   | Diersoort/ Stam                       | Aantal dieren | Ernst   | Opmerkingen |
|--|---------------------------------------|---------------|---|-------------|
| <b>3.4.4.1 Handelingen aan zebravissen</b>   |                                       |               |   |             |
|  | Zebravissen ( <i>Danio rerio</i> ) /  | 275           | 70%<br>Terminal<br><br>30%<br>Licht                 |             |
| <b>3.4.4.2 Handelingen aan knaagdieren en haasachtige (muis, rat, cavia en konijn)</b> |                                       |               |   |             |
|  | Muizen ( <i>Mus musculus</i> ) /      | 4.365         | 65%<br>Terminal<br><br>10%<br>Matig<br>25%<br>Licht |             |
|  | Ratten ( <i>Rattus norvegicus</i> ) / | 2.430         | 50%<br>Terminal<br><br>10%<br>Matig<br>40%<br>Licht |             |



**Aanvraagnummer:**  
AVD1120020172349

|  |   |     |  |  |
|--|---|-----|--|--|
|  | Cavia's ( <i>Cavia porcellus</i> ) /        | 175 | 85%<br>Terminal<br><br>5%<br>Matig<br>10%<br>Licht |  |
|  | Konijnen ( <i>Oryctolagus cuniculus</i> ) / | 100 | 85%<br>Terminal<br><br>5%<br>Matig<br>10%<br>Licht |  |
| <b>3.4.4.3 Handelingen aan landbouwhuisdieren (varkens, schapen en geiten)</b> |   |     |  |  |
|  | Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> ) /  | 315 | 80%<br>Terminal<br><br>20%<br>Licht                |  |
|  | Schapen ( <i>Ovis aries</i> ) /             | 200 | 80%<br>Terminal<br><br>20%<br>Licht                |  |

**Aanvraagnummer:**  
AVD1120020172349

|  |   |     |                                     |  |
|--|---|-----|-------------------------------------|--|
|  | Geiten ( <i>Capra aegagrus hircus</i> ) / | 125 | 80%<br>Terminal<br><br>20%<br>Licht |  |
|--|---|-----|-------------------------------------|--|



**Aanvraagnummer:**

AVD1120020172349

## 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:**  
AVD1120020172349

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.

| Inventaris Wob-verzoek W17-12 |                                   |                 |      |        |       |                   |        |        |  |      |
|-------------------------------|-----------------------------------|-----------------|------|--------|-------|-------------------|--------|--------|--|------|
| nr.                           | document NTS 20172364             | wordt verstrekt |      |        |       | weigeringsgronden |        |        |  | 11.1 |
|                               |                                   | reeds openbaar  | niet | geheel | deels | 10.1.c            | 10.2.e | 10.2.g |  |      |
| 1                             | Origineel aanvraagformulier       |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |  |      |
| 2                             | NTS                               | x               |      |        |       |                   |        |        |  |      |
| 3                             | Projectvoorstel                   |                 |      | x      |       |                   |        |        |  |      |
| 4                             | Bijlage beschrijving dierproeven  |                 |      | x      |       |                   |        |        |  |      |
| 5                             | DEC-advies                        |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |  |      |
| 6                             | Ontvangstbevestiging              |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |  |      |
| 7                             | Verzoek om aanvullende informatie |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |  |      |
| 8                             | Adviesnota CCD                    |                 | x    |        |       |                   |        |        |  | x    |
| 9                             | Beschikking en vergunning         |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |  |      |

2364

1.



12 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](http://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?<br><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 50400<br><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   | Triskelion BV  |
|     |   | Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde  | [REDACTED]   |
|     |   | KvK-nummer   | 51382997   |
| 1.3 | Vul de gegevens van het postadres in.<br><i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i> | Straat en huisnummer   |  |
|     |   | Postbus  | 844  |
|     |   | Postcode en plaats   | 3704 HE Zeist  |
|     |   | IBAN   | NL101NGB0654470189   |
|     |   | Tenaamstelling van het rekeningnummer  | Triskelion B.V.  |
| 1.4 | Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.  | (Titel) Naam en voorletters  | <input 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  | [REDACTED]   |
|     |   | 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 | 01 - 01 - 2018 |
| Einddatum  | 01 - 01 - 2023 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- In vivo research involving mouse tumor models for the development of and improvement of anti-cancer immunotherapies.
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Dierstudies in het kader van ontwikkeling van nieuwe en verbeterde anti-kanker immuno-therapieën.
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- |             |                        |
|-------------|------------------------|
| Naam DEC    | DEC-TNO                |
| Postadres   | 96800 2509 JE DEN HAAG |
| E-mailadres |                        |

## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?  Nieuwe aanvraag Projectvergunning €1035,00 Lege  
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.  
 Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.
- Via een eenmalige incasso  
 Na ontvangst van de factuur
- s.v.p. uw factuur o.v.v. 'vooruitbetaling' en het bestelnummer 56001154 indienen via e-mail bij [redacted] adres:  
 Triskelion BV T.a.v Crediteurenadministratie  
 Postbus 844, 3700 AV, Zeist  
 + Triskelion bestelnummer 56001154

## 5 Checklist bijlagen

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

## 6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:
- Centrale Commissie  
 Dierproeven  
 Postbus 20401  
 2500 EK Den Haag
- Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondergetekende verklaart:
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
  - dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
  - dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
  - dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
  - dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam [redacted]  
 Functie [redacted]  
 Plaats Den Haag  
 Datum 27 - 06 - 2017  
 Handtekening [redacted]



# Form

## Project proposal

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

The World Health Organization states that cancer is one of the leading causes of morbidity and mortality worldwide, with approximately 14 million new cases and 8.2 million cancer related deaths in 2012. The number of new cases is expected to rise by about 70% over the next 2 decades. Because the average age of men and women will increase in the future, the number of people who die of cancer will greatly

increase. The most occurring types of cancer at this moment are lung cancer, liver cancer, cancer of the gastrointestinal tract, breast or prostate cancer. In total more than 100 different types of cancer exist, and each type requires a different diagnosis and treatment strategy.

The established anti-cancer treatment methods, i.e. chemotherapy and radiotherapy, have been shown to be insufficiently effective in treating cancer patients, and improvement or new anti-cancer therapies are needed. World-wide, pharmaceutical companies, the medical world and scientists are now focussing on a new anti-cancer therapy, namely immunotherapy.

Immunotherapy has been proclaimed to be the most promising anti-cancer treatment of 2013/2014 (Science and the European Journal of Cancer). Recent publications in the European Journal of Cancer and Science show promising results, i.e. that the immune system is able to recognize and attack tumors, thereby treating cancers. The importance of the immune system in eradicating tumors was already known for years, however the biggest breakthroughs were made after the availability of animal models in tumor immunity. In general this has led to the inception of a theory of immune surveillance of cancer ('immunoediting'), indicating that lymphocytes act as sentinels in recognizing and eliminating continuously arising, initial transformed cells. Immunoediting is characterized by changes in the immunogenicity of tumors due to the anti-tumor response of the immune system, resulting in the emergence of immune-resistant variants. It consists of the "3 E's" as most important phases, namely elimination, equilibrium and escape.

During the elimination phase, immune effector cells (innate and/or adaptive) are activated to recognize and eliminate tumor cells. In the equilibrium phase, the tumor cells that have escaped the elimination phase and have a non-immunogenic phenotype are selected for growth. During this period, new tumor cell variants emerge with various mutations that further increase overall resistance to immune attack.

During the escape phase, these new tumor cell variants have breached the host organism's immune defences, with various genetic and epigenetic changes causing further resistance to immune detection. The crosstalk between the immune system and tumor cells determine whether the tumor cells will be a) eliminated, or b) an equilibrium is reached between growth of the tumor and elimination by the immune system, or c) whether the tumor cells escape the immune system and keep growing.

The new anti-cancer immunotherapies are targeting the crosstalk between immune cells and tumor cells. Examples are the clinical successes of the US FDA-approved therapeutic antibody ipilimumab and nivolumab, which are successfully used in the clinic in cancer patients. These immunotherapies focus on optimal activation of the immune system and/or reduce immune suppression by tumor cells. Overall, the patient's own immune system will be activated to attack tumors, and thereby increasing the elimination phase of immunoediting.

The progress and great successes of cancer immunotherapy have led to the development of immunotherapeutic treatments for a subset of patients with advanced cancer. Despite the great successes a part of the patients remain refractory to these treatments and in some cancer types the treatments are not working, indicating a need for improvement and new medication. This has triggered a substantial growth of current animal studies in immunotherapy and clinical trials for a wide variety of cancers. These therapies are based on several approaches such as cell transfer, immune modulating antibodies, cytokines and vaccines; all improving tumor cell recognition and immune cell activation.

This research project is mainly focussing on the preclinical and discovery/developmental phase of new anti-cancer medication. To develop these new anti-cancer strategies the use of *in vivo* mouse tumor models is necessary.

Much has been written about the translation of animal tumor models into diagnostic and clinical applications. Preclinical drug development is limited by the restricted availability of suitable animal tumor models that adequately mimic the dynamics in the human situation. However, in general it is still widely accepted that mouse models are able to provide useful pre-clinical and mechanistic information about novel immunotherapies and cancer therapies (Budhu. S., *Curr.Opin.Genet.Dev.* 2014, 24: 46-51 and Böck B.C., *Cancer Res.* 2014, 74(17); 4671-5). The ultimate model would be a humanized mouse tumor

model with a human tumor and a full human immune system. The goal is to use a mouse for this ultimate model because the mouse is the best organism which can be humanized. However, these kinds of models are still under development and not yet available. At this moment the existing models are the best option (see below).

An argument that is often brought up is that animal studies are uninformative because they are not predictive for results in humans. Inadequacies in experimental designs may have accounted for the failure for translation towards the clinic. Regardless of which type of preclinical model one selects, it is vital to ensure that the proposed models recapitulate and mimic the human disease as closely as possible (e.g. pathology, metastatic potential, stage of disease, angiogenesis, influence of immune cells, microenvironment, pharmacokinetics or -dynamics). Furthermore, the selected model should be able to answer the stated research goal. If these aspects are taken into account at selection of the model, animal tumor models are able to provide useful pre-clinical and mechanistic information about novel immunotherapies and cancer therapies.

The available mouse tumor models can be clustered into two types of models, syngeneic tumor models and xenograft tumor models. These two types of models can be subdivided into three different categories: (i) transplantable tumor models, (ii) genetically engineered (transgenic) models, and (iii) humanized tumor models. Each of these three categories has its own advantages and disadvantages. We have selected two of the three subcategories, namely transplantable tumor models and humanized tumor models (both for the syngeneic and xenograft tumor models).

Genetically engineered (transgenic) models are mostly focussing on the genetic lesions (oncogenes and/or inactivation of suppressor genes) causing tumor development. Our research goal is not focussing on these questions, and are therefore not included in this application.

The focus of this application, as written above, is on immune therapies for cancer. These medications/therapeutics are targeting and influencing the immune system in such a way that it will influence tumor growth and development. As mentioned before these new medications will influence the three different phases of immunoeediting. Because these new medications/therapeutics are targeting the immune system, we need models in which the immune system is present.

Syngeneic models are good models because they are based on the implantation of mouse cancer cells into mice with an existing mouse immune system. These models were therefore selected by our department as suitable models. The syngeneic models are mostly selected for new treatments that are still in the developing phase, in which the compound is directed against mouse targets.

Xenograft models are based on the implantation of human cancer cells or patient tumor tissue into immunodeficient mice. Because these immunodeficient mice lack an immune system, human immune cells can be introduced in the mice. These models are mostly used in studies in which the human medication is available. In these models the part of the immune system in introduced that is of interest for the new therapeutic.

---

### **3.2 Purpose**

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

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

The main objective of this project is to contribute to the development and improvement of new immunotherapies for the treatment of cancer, by using animal tumor models.

For this purpose the following sub-objectives will be focussed on:

- Provide the information on efficacy and systemical mode of action of the new compounds
  - For each tested therapeutic an appropriate animal tumor model will be selected, based on the research question. (detailed information on translatability is given in section 3.4)
  - Continuous validation and optimisation/improvement of the used models
-

This project is highly achievable because Triskelion employs scientists with expertise in Oncology and Immunology. These scientists have worked for many years at different academic groups within the Netherlands with highly appreciated professors in the field of oncology. During these years the scientists worked with several different tumor cell lines and with different parts of the immune system. A lot of experience is present on the action of immunotherapeutics. This knowledge has been used to train our personnel at the animal facility to perform tumor studies. A lot of experience is present on the selected animal tumor models, and several animal tumor models are successfully up and running. We will be able to advise sponsors/sponsors in their choice for testing new immunotherapeutics.

---

### 3.3 Relevance

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

---

According to the World Health Organization is cancer the second leading cause of death globally and accounted for 8.8 million death in 2015. Lung, prostate, colorectal, stomach and liver cancer are the most common types of cancer in men, while breast, colorectal, lung, cervix and stomach cancer are the most common among women. Because the average age of men and women will increase in the future, the number of people who develop cancer will greatly increase. The number of new cases is expected to rise by about 70% over the next 2 decades.

The commonly known and used anti-cancer therapies, like chemotherapy, radiotherapy or surgery, are in most cases insufficient and/or have serious side effects. For example, with chemotherapy or radiotherapy not only cancer cells/tissues are affected, but also the healthy cells/tissues will be affected. Chemotherapy can also cause severe illnesses, fatigue, and/or noxiousness. Secondly, surgery is not always possible (depending on the site of the tumor). Furthermore, metastasis is not always known and repeating treatments may be required. Therefore new therapies are needed that decrease the negative side effects.

For preclinical research concerning the development, improvement and validation of new immunotherapies, the use of animal models is still needed. The first phases in the development of a new anti-cancer therapy are done by using *in vitro* models (e.g. therapeutic selection), however the systemic efficacy and ability to decrease tumor growth needs to be tested in *in vivo* models. These *in vivo* models are at this moment the best option for predicting the efficacy in humans.

Furthermore, with the information gained from these animal models, pharmaceutical companies are able to get their new anti-cancer immunotherapeutic into clinical trials. Therefore, these animal studies are of very high importance to get new immunotherapeutics into the clinic.

---

### 3.4 Research strategy

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

---

In general, in each model (syngeneic or xenograft) different tumor cells can be selected. We have selected for a limited number of tumor cell lines.

We selected our models by first doing literature research. A list was made of the mostly used tumor cell lines described in literature. This list of tumor cell lines have been shown to 5 pharmaceutical companies and academic researchers. We asked them to select the tumor cell lines which are of interest for them and/or with the most importance for testing in the upcoming field of immunotherapeutics. From this list we made our selection. We selected five different cell lines, representing three tumor types, and including both aggressive and non-aggressive tumors. Aggressive tumors react differently to immunotherapy than non-aggressive tumors. The immune system needs to be more efficient to eradicate aggressive tumors compared to non-aggressive tumors. Because of our selection a sponsor is able to test their new immunotherapeutic in both aggressive and non-aggressive tumor settings. This enables a sponsor to test the same medication in two different tumor types. In addition we also based our choice for these cell lines on the in-depth knowledge of these cell lines by our scientists and technicians. Our employees have several years of experience in the tumor immunology field. In these years they have worked with several of these cell lines and can use this knowledge in consulting sponsors and in-house trainings.

In addition, we are convinced that these different selected tumor types are representative to use in new immunotherapeutics. Most immunotherapeutics target the immune system, whereas other immunotherapeutics act on the tumor tissue itself, however thereby also indirectly acting on the immune

---

system. Our mouse models can be used for any immunotherapeutic because the mechanisms in tumor development is independent of the tissue it develops in.

Our selected tumor models are:

For the syngeneic models:

- melanoma B16F10 (aggressive fast growing tumor)
- colon carcinoma CT26 (nonaggressive slow growing tumor)
- prostate cancer TRAMP-C2 (nonaggressive slow growing tumor)

For the xenograft (humanized) models:

- melanoma MV3 (aggressive fast growing tumor)
- B-cell lymphoma Daudi (nonaggressive slow growing tumor)

If in the future sponsors need other tumor cells than the ones mentioned above, we will carefully consider if this is really necessary. For example if a new immunotherapeutic is based on the characteristics of a specific tumor type (e.g. presence of a specific molecule, specific immune suppressive function of a tumor type, etc). We will discuss the use of a new cell line with the animal welfare body (AWB).

Most studies that will be performed under this application will be efficacy studies of new and improved anti-cancer immunotherapeutics. The other part (about 20%) of the studies will focus on (i) improvement of our models (e.g. improvement of tumor measurement, prediction of tumor growth, refinement of animal models, etc), or (ii) setting up new tumor models (e.g. usage of other tumor cell lines).

Before each study is initiated, the need for an animal study will be evaluated in a project team which consists of (senior) scientists, biostatisticians and/or pharmacologists. The project team will evaluate the historical data (provided by the sponsor) and make recommendations on the number of animals per treatment group, doses used, and also on the need for an animal study, etc., to maintain the scientific quality of the project. As a contract research organization, most of this work will be performed by the sponsor. However, in all cases, upon receipt of a study request, a study director (SD, project leader) is appointed, who will form a project team and the project proposal will be discussed scientifically and ethically with the sponsor. The animal welfare body and the designated veterinarian will be consulted on issues of animal welfare. For most studies a 'pre-study briefing' is performed by the study director to ensure understanding of the study objectives and design by the staff involved. During the study, any adverse effects or other concerns concerning animal welfare will be monitored by the study director and discussed with relevant staff.

The information needed to evaluate the need for animal study is collected by doing literature research and discussions with the sponsor. For this purpose information will be gathered from our sponsors about historical data on the compound of interest (e.g. what is done on in vitro studies, and other animal studies). In this way unnecessary use of animals will be prevented.

Secondly the appropriate mouse model will be selected. Which of the two tumor mouse models is selected is based on the following aspects:

- 1) The syngeneic tumor models make use of a mouse, that will be injected with mouse tumor cells. These tumor cells will develop into tumors with a normal functional immune system present. Advantages are: model in full organism, consistency within the model, ideal for rapid screening of new agents and fully characterized in literature/at our experience. A disadvantage is that the tested therapeutics need to be murine based. Therefore most of these models are used in an early stage in therapeutic development.
- 2) The xenograft tumor models make use of an immunodeficient mouse, that will be injected with human tumor cells. These tumor cells will develop into tumors without a normal functional immune system present (immunodeficient mice). Advantages are; model contains human tumor cells, more translatable to humans compared to syngeneic tumor models, and higher diversity of tumor cells can be used. A (partial) human immune system can be introduced (directly injected or introduced by injecting hematopoietic precursor cells) in these animals, if needed. A disadvantage is that the medication needs to be human based. These models are therefore

mostly used in a later stage in therapeutic development.

Thirdly, the mode of action by the compound of interest is of importance in selecting a specific model or a specific cell line. If the immunotherapeutic acts on the immune system, the appropriate immune cell needs to be present in the animal. In the syngeneic models an immune system is present, and in the xenograft models the specific human immune cell/composition need to be introduced in the animal. If the immunotherapeutic acts on the tumor cell itself, the appropriate tumor cell needs to be present in the model. This will influence the selection of a tumor cell line. Furthermore, the (predicted) mode of action of the compound will also determine whether an aggressive or non-aggressive tumor cell line can be used. In general it is very difficult to influence the growth/development of aggressive tumors, though therefore the need for an adequate medication is very high. In the early phase or within the first *in vivo* tests, mostly non-aggressive tumors will be selected. In these models the proof of principle can be tested. The influence of a new immunotherapeutic on the tumor growth of a non-aggressive tumor will give an idea if it will work in an aggressive tumor setting.

The most appropriate study design will be determined, based on the information in table 1.

Table 1.

| Question   | Answer   | Model   |
|--|--|---|
| 1. Is the therapeutic human or mouse origin?                 | a) Human<br>b) Mouse                               | a) Xenograft tumor model<br>b) Syngeneic tumor model  |
| 2. What is the mode of action of the therapeutic?            | a) Acts on immune system<br>b) Acts on tumor cells | a) Model needs to have immune system.<br>b) Model needs to have the appropriated tumor present. |
| 3. Which specific kind of tumor is needed for the objective? | Aggressive tumor versus non-aggressive tumor       |   |
| 4. How should the tumor cells be injected (location)?        | a) Primary tumor<br>b) Metastasis                  | a) s.c. tumor injection<br>b) i.v. tumor injection  |

In both models (Syngeneic and Xenograft) the tumor cells can be injected subcutaneously or intravenously. Injection of the tumor cells i.v. is mainly used for a model in which the efficacy of the medication is correlated to metastasis of the tumor. We estimate that 90% of the animal studies will include the subcutaneous models and about 10% the intravenous models.

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 project consists of 3 different components, namely:

- 1) Tumor models for testing anti-cancer therapeutics with subcutaneous injection; A lot of new anti-cancer immunotherapies are developed by the pharmaceutical industry. These sponsors do not have the capacity, knowledge and expertise to perform these tumor studies themselves. With our knowledge and expertise we are able to help them in the development of new therapeutics, and providing information needed to take a next step (for example getting the medication into clinical trials).  
The first question these sponsors have is, is the compound of interest able to inhibit/decrease tumor growth. What is the efficacy and what is the mode of action? This can easily be studied in a subcutaneous injected tumor model.
- 2) Tumor models for testing anti-cancer therapeutics with intravenous injection; Besides the injection of tumors subcutaneously, tumors can also be injected intravenously. If a sponsor has proven that their compound of interest is positively influencing tumor growth, they might also be interested in whether these therapeutics have comparable efficacy in metastasis.

- 3) Set-up, validation, training and improvement of tumor models; Triskelion is constantly following literature, and new ideas on this area. Therefore it is important to be able to improve the models that are running at this moment, and train/keep training employees. In addition, once in a while a sponsor is asking for a new tumor type that is not running at this moment. As written above, good consideration and evaluation of the asked model is done. When the use of a new tumor cell line is needed and approved by the AWB and our in-house scientists, a new model will be set-up/tested

In all components tumor cells will be injected into mice. These mice will then be studied for the outgrowth of a tumor with or without treatment. The treatment can be given prophylactic or therapeutic, as single treatment or in combination with other treatments. At the end of the study additional assays (e.g. immunological analysis, histology) can be done ex vivo to give more information on the therapeutics tested.

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

The subcutaneous, intravenous and validation studies are closely linked together. An intravenous model is a logical step after a subcutaneous model. The subcutaneous models are used as primary tumor models and the intravenous models are used for metastatic tumor models. When a compound is able to inhibit tumor growth of the primary tumor, the sponsor will also be interested in the capacity to inhibit metastatic tumors. In both tumor models (subcutaneous and intravenous) constant validation and refinement of these models are needed.

In case a model is already up and running or is successfully set-up, an efficacy study will be done. In this study a syngeneic or xenograft tumor experiment will be done in which therapeutics can be evaluated. In case a new tumor cell lines/a new model is needed for a study, first a set-up/validation/refinement study will be done. After this is finalized, a 'go/no go' decision will be made whether or not an efficacy study will be done. Examples of criteria for a 'no go' decision might be no/low tumor induction, no validated model, etc.

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             | Tumor models for immunotherapeutics |
| 2             |                                     |
| 3             |                                     |
| 4             |                                     |
| 5             |                                     |
| 6             |                                     |
| 7             |                                     |
| 8             |                                     |
| 9             |                                     |
| 10            |                                     |



## Appendix

### Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website ([www.centralecommissiedierproeven.nl](http://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'. | 50400           |                                     |
| 1.2 Provide the name of the licenced establishment.  | Triskelion B.V. |                                     |
| 1.3 List the serial number and type of animal procedure.   | Serial number   | Type of animal procedure            |
|  | 1               | Tumor models for immunotherapeutics |

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

#### 2 Description of animal procedures

##### A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

The project consists of different components:

Efficacy studies, prophylactic or therapeutic studies with immunotherapeutics in either the syngeneic or xenograft tumor models and in some cases the set-up and validation of new tumor models, improvement of tumor models.

The outline of the animal procedures is comparable for these components. In general, in all studies the animals will be injected with tumor cells. The animals will receive or not receive a treatment that decreases tumor growth. The tumor growth will be monitored by measuring the tumor size and/or bodyweight loss and/or presence of clinical symptoms.

A study design contains:

- Tumor cells will be injected into the mice, i.e. subcutaneously or intravenously (depending on the model).
- These injected tumor cells will be allowed to grow into a tumor, which will be monitored. In the case of subcutaneous injection tumor growth will be monitored by determining tumor volume (e.g. in mm<sup>3</sup>). Tumor volume/tumor growth will be the primary parameter. Secondly, clinical symptoms and body weight will be monitored. In the case of intravenous injection measurement of tumor growth is not a primary parameter because the tumors will mainly develop in the liver and lungs. In these intravenous models, the clinical symptoms and body weight will be the primary readout. Both parameters will therefore be closely monitored and/or measured. With these parameters examples of main focus will be respiration capacity, jaundice, etc. Furthermore, with i.v. models literature research will be done to determine whether there are more monitoring possibilities, and those will be discussed with the AWB.



- After injection of the tumor cells the animals can be treated with the selected treatments. The treatment can be given either therapeutically or prophylactic. Which treatment strategy will be used, is depending on the treatment (the drug type) and the tumor type (e.g. aggressive or non-aggressive tumor).
- The animals will be taken out of the study before or immediately when reaching a humane endpoint (see section J). In case of intravenous injection, new humane endpoints will be established (as described in "Code of practice for cancer research").
- After the animal is taken out of the study, tumor tissues and/or other organs (e.g. lymphoid organs, lungs) can be collected for further analysis.

At any given moment during the study a human immune system (human immune cells) might be introduced (injected) into the mice. How the human immune system will be injected will always be in compliance of the Code of Practice of Diehl, (*Journal of applied toxicology*, 2001; 21: 15-23) and will be communicated/discussed with the AWB.

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

In total, two different classes of groups can be specified in these studies, namely "Untreated groups" and "Treated groups".

The animal procedures will be described for these two classifications. In each experiment only one group will be untreated. The number of treatment groups may differ per experiment and will be communicated with the AWB. For example, in efficacy studies at least one group will be treated with a positive control, and the number of new therapeutics might differ. However a maximum of 12 groups will be used in these experiments. This maximum is based on ensuring a good model and monitoring quality with the current staff capacity and possibilities.

In the case of a set-up study, different concentrations of tumor cells can be injected. The number of different concentrations will be determined on the basis of literature research. Another example is that in a validation study, multiple possible positive controls can be tested, depending on the number of positive control therapeutics which are available, literature research will help in selecting treatments to validate the model, etc. However, from historical data it is envisaged that an average of about 6 groups will be used in these experiments. These groups will include a positive control, negative control, and 2-3 different cell concentrations.

General study design:

| Group         | Animals/group | Tumor cell injection | Treatment   | Measurement tumor volume | Blood sampling | Euthanasia                            |
|---------------|---------------|----------------------|-------------|--------------------------|----------------|---------------------------------------|
| 1-X           | 8-10          | Day 0                | Day -x to x | minimal<br>2x/week       | Day -x to x    | End of the study or when reaching HEP |
| Control group | 8-10          | Day 0                | Day -x to x | minimal<br>2x/week       | Day -x to x    | End of the study or when reaching HEP |

Additional information on the study design:

- day -x until day 0:  
~ min. 1x/week measurement bodyweight  
~ min. 1x/day observing clin.signs
- day 0 until end of the study:  
~ min. 1x/week measuring body weight  
~ min. 1x/day observing clin.signs
- After euthanasia several tissues (like tumor tissue, lymphoid organs, blood) can be isolated for further analysis.
- Shaving of one of the legs before tumor cell injection.

- Tumor injection will be done either subcutaneously or intravenously.
- Tumor injection will be done under anesthesia (isofluorane) in case of s.c. injected tumors
- The design of treatment regime, dose and route will be in line with "Code of Practice" by Diehl, and communicated with the AWB.
- Blood withdrawal might be done via one of the accepted methods in line with "Code of Practice" by Diehl (route, volume, frequency) and communicated with the AWB.
- Humane endpoints will be in line with Code of Practice in cancer research, and communicated with the AWB.
- Euthanasia of the animals according to the European directive 2010/63/EU annex IV

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

The total number of animals per group will be based on historical data (in the case of improvement/efficacy studies), and based on literature research (in the case of a set-up and validation study).

Furthermore, a statistical analysis plan will be part of the protocol/study plan to determine the number of animals needed (a 'Power Analysis'). This is calculated with the sample size calculations tool made available by the University of Boston (<http://www.bu.edu/orccommittees/iacuc/policies-and-guidelines/sample-size-calculations/>).

Literature research will help in minimizing the number of animals used in both efficacy and set-up/validation studies. This is also written in part A, where we state that literature research is done, for example to determine the concentration of injected cells. Or for example to first determine cell growth *in vitro*, determining whether the cells selected are the right cells, show good growth, have the right genetic profile, etc.

Also, the knowledge on the experimental variation within the tumor model, built-up during the set-up/validation studies will be used for sample calculation, and the statistical analysis plan.

## **B. The animals**

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

In these studies mice will be used. The strain and gender of the mice depends on the tumor model and/or the tumor cell line which is used. In all studies, the cells need to be injected into the same strain and/or gender as the background of the tumor cells (for syngeneic models). The xenograft models are injected into immune deficient animals. The details of the mouse strain and sexe will be provided to the AWB. In general the following mouse strains will be used:

- For syngeneic models: Balb/c, C57Bl/6 (all immune competent mouse strains)
- For xenograft models: NSG, NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup> Il2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ, BNX, Nude (all immunodeficient mouse strains)

All selected animals (species) will be obtained from a registered animal supplier.

The studies are always conducted in young adult animals, about 6-8 weeks old at tumor cell injection. If the age of the mice at tumor cell injection need to be different arguments will be provided to and discussed with the AWB.

Based on number of studies performed in the last years, the following number of animals will be used for the upcoming 5 years:

Based on historical data, the number of mice per group is estimated at 8-12 mice per group. Exact numbers per group necessary in a study will be verified with power calculations. For the estimation of the total number of animals used the following calculations are made:

For the set-up studies, an average of 60 animals per study is used. In general, 3 different cell concentrations injected with or without treatment with a positive control. This gives 6 groups of average 10 mice. For the efficacy studies, an average of 120 animals per study is used. Having about 12 groups

of 10 mice.

An estimation of the total number of animals used will be 6600 mice;

- in total about 2 set-up/validation/improvement studies a year with a maximum of 60 mice per study = 600 mice in 5 years
- in total about 10 efficacy studies a year with a maximum of 120 mice per study = 6000 mice in 5 years

### C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

### D. Replacement, reduction, refinement

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

**Replacement:** Before each study is initiated a consideration will be done on the historical data whether or not an animal study should be the next step or if in vitro assays are more appropriate.

**Reduction:** Before each study is initiated, detailed information will be gathered to determine the best model. Literature research will be done to select the right cell line, treatment for positive control, and method. This will decrease the number of groups and number of studies. Furthermore, each cell line will be cultured and analysed in vitro before injection into the animals.

**Refinement:** When injecting a new tumor cell line, it will be unknown which clinical signs can be expected. The animal caretakers will focus and register all observed clinical signs. These signs will be communicated with the veterinarian and study director. Immediate actions will be taken to decrease any arising suffering, pain or discomfort. When a second or follow up study is done using this new cell line, a plan will be made to avoid the suffering, pain or discomfort of the animal observed in the first study. If needed the humane endpoints will be adjusted.

The clinical signs that surfaced in the set-up/validation studies and showed to be important signs for monitoring animal health, will be recorded. The animal caretakers will focus and register these recorded clinical signs. If the signs are observed, immediate actions will be taken to decrease the suffering, pain or discomfort. If needed the humane endpoints will be used.

At this moment tumor measurement by using the Caliper is the best option for subcutaneous tumors. New methods are under development and if possible we will test these methods. If a new method is decreasing the animal discomfort we will change to this method. In addition tumors can be measured by using scanning methods. This can only be done using genetically changed tumor cell lines. If these cell lines are available to us we will also consider to use these methods when possible.

In addition, the animals will be placed under anaesthesia (conform the code of practice by Diehl) when injecting the tumor cells in subcutaneous models. This will assure that the cells are indeed injected at the right site, therefore decreasing the spread in tumor take/outgrowth.

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

### Animal suffering

Animal suffering is minimised by avoiding, as much as possible, pain caused by a large growing tumor. In the early phases of tumor growth the tumor will not cause suffering/pain. Only when the tumor becomes very large (about a volume of 2000mm<sup>3</sup>, which is determined to be HEP). Concerning the humane endpoint and pain, the guidelines are followed of "Code of practice in cancer research" (Inspectie V&W, 1999). If needed pain relief is given, or the animals are taken out of the study. Furthermore, tumor specific endpoints as determined during set-up of the model will be implemented in follow up studies. If needed the animals are taken out of the study.

#### **Environment**

For research with Genetically Modified Organism (GMO) organisms (for example GMO animal strains) and viral vectors, the facility meets the requirements up to ML-II, DM-II and BSL-III.

### **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.

Procedures may warrant anesthesia and/or analgesia, e.g. injection of tumor cells. In those instances, the AWB is informed on the use of appropriate anaesthesia and/or analgesia.

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

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

Each new tumor model might give new/other adverse effects. Literature research will be done to determine the most likely adverse effects that can be expected. Before a study is initiated a specific plan will be made to minimize the known adverse effects.

When using immune-deficient animals, measures will be taken such as the use of individually ventilated cages, changing stations, using protective clothing by the animal caretakers.

Each therapy might give unexpected adverse effects, if adverse effects are presented in the animals, immediate actions will be taken and discussed with the AWB and veterinarian.

Explain why these effects may emerge.

Tumor growth can not be totally controlled. It might be possible that during tumor growth blood vessels will be formed at the tumor site, and thereby the possibility that a few tumor cells might travel to other places in the body than only staying at the site of injection. If this happens additional adverse effects can appear when these cells form tumors at different sites. We will learn from these adverse effects and use them to make a more specific/detailed plan for future studies, to be able to decrease the adverse effects for these animals.

Because each therapy may be accompanied by adverse effects that have not been observed in the model with other therapeutics.

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

In the studies of a new model or with a new immunotherapeutic, these possible adverse effects will be closely monitored to determine if and which signs are seen. Animals will be closely monitored to make sure that measures will be taken to relieve discomfort or to humanely sacrifice the animal.

### **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.

An animal will be sacrificed when the humane endpoint is reached. The following criteria will be used to determine a humane endpoint. (All according to the "Code of Practice in Cancer studies"):

a) Reduction in bodyweight of:

i) > 15% in 1-2 days

ii) > 20% compared to starting weight

b) Tumor:

i) size  $\geq$  10% of the initial bodyweight of the mouse

ii) maximum size of 2000 mm<sup>3</sup> (in case of subcutaneous injected tumors)

iii) causes severe impairment in normal behavior and movement (for example piloerection; hunched posture, paralysis or leg lameness)

iiii) shows ulcerative wounds/signs (in case of subcutaneous injected tumors)

c) The animal shows severe circulation- and breathing difficulties (in case of intravenously injected tumors)

d) The animal is likely to die within a short time.

These endpoints will constantly/frequently be adjusted if tumor specific clinical signs are observed or when new insight is gained in the discomfort of the animals.

Indicate the likely incidence.

Incidence:

- a) In the case of subcutaneous injected set up studies determining cell concentrations = 0%; for the outgrowth of a tumor it is sufficient to stop the study at a volume of  $\sim 1500\text{mm}^3$ . By the time a tumor reaches  $1500\text{mm}^3$  enough information is gathered about the growth of the tumor. Therefore it is not needed to wait for the tumor to reach humane endpoint.
- b) In the case of intravenous injected set up studies determining cell concentrations = 50-90%; because the humane endpoints need to be determined during these studies, most animals might reach humane endpoint. However, intensive literature research will be done to determine upfront the most expected clinical signs. Therefore a plan will be made before the study starts determining humane endpoint based on literature. When a new tumor cell line (tumor model) is tested in the first pilot study, a plan will be made on which additional possible clinical signs can be expected (e.g. in case of lung tumors for example breathing difficulty). A possible expected clinical symptoms will be closely monitored and registered. At the end of the pilot study a consideration will be made if the HEP need to be altered or not.
- c) Validation/Efficacy studies =  
 Incidence:  $\sim 30\text{-}50\%$  of the animals might reach humane endpoint, depending on the efficacy of the treatment; for the validation it is important that sufficient information is gathered about the possibility of a treatment regime to decrease tumor growth. Therefore the untreated and/or vehicle control animals need to be followed until a volume of  $1900\text{ mm}^3$  is reached. To ensure that a minimum number of animals will reach humane endpoint, animals will be monitored daily when reaching a volume of  $\sim 1300\text{ mm}^3$  and taken out of the study starting at a volume of  $1900\text{ mm}^3$ . However, even if the growth is monitored daily, humane endpoints will be reached because tumor growth is not always predictable. Therefore it might happen that humane endpoint is reached in these groups of mice, though this occurrence will be minimized as much as possible.

#### K. Classification of severity of procedures

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

| Procedures  | Frequency         | Level of discomfort |
|---|-------------------|---------------------|
| Tumor cell injection (under isofluorane anesthesia) | 1x                | Mild                |
| Shaving of leg                                      | 1x                | Mild                |
| Outgrowth of the tumor                              | About 56 days     | Mild or Moderate    |
| Measuring tumor growth (in s.c. tumors)             | Minimally 2x/week | Mild                |
| Measuring body weight                               | Minimally 2x/week | Mild                |
| Treatment with compound                             | Weekly or daily   | Mild or Moderate    |

Cumulative discomfort: Approximately 90% of the animals will reach 'mild', 9% will reach 'moderate' and 1% will reach 'severe' (severe is based on the side effects/clinical symptoms caused by the tumor, in many cases this will be avoided as much as possible and when severe is reached the animal will immediately be taken out of the study). These indications are based on historical data from the last two years.

### End of experiment

#### L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

Animals may be killed for the collection of tissues (like tumors, lymphoid organs, etc) or blood, or the animals might be killed for ethical reasons concerning reaching humane endpoint.

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

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

Yes

---

**A. Algemene gegevens over de procedure**

1. Aanvraagnummer :
2. Titel van het project: *In vivo* research involving mouse tumor models for the development of and improvement of anti-cancer therapies.
3. Titel van de NTS : Dierstudies in het kader van ontwikkeling van nieuwe en verbeterde anti-kanker immuno-therapieën.
4. Type aanvraag:
- nieuwe aanvraag projectvergunning
  - wijziging van vergunning met nummer :
5. Contactgegevens DEC
- Naam DEC: DEC TNO
- Telefoonnummer contactpersoon: ██████████
- Emailadres contactpersoon: ██
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
- ontvangen door DEC: 4-5-2017
  - aanvraag compleet: 4-5-2017
  - in vergadering besproken: 11-5-2017
  - anderszins behandeld:
  - termijnonderbreking(en) van / tot : van 15-5-2017 tot 8-6-2017
  - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
  - aanpassing aanvraag: 8-6-2017
  - advies aan CCD: 26-6-2017
7. De aanvraag is afgestemd met de IvD en deze is hiermee akkoord.
8. Eventueel horen van aanvrager: n.v.t
- Datum:
  - Plaats:
  - Aantal aanwezige DEC-leden:
  - Aanwezige (namens) aanvrager:
  - Gestelde vragen en verstrekte antwoorden:
  - Het horen van de aanvrager heeft niet geleid tot aanpassing van de aanvraag. n.v.t
9. Correspondentie met de aanvrager
- Datum vragen: 15-5-2017
  - Datum antwoord: 8-6-2017
  - De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.
  - Gestelde vragen en antwoorden:



1. De DEC heeft een vraag bij 3.4, Onderzoeksstrategie. Onderaan de pagina vermeldt u: "Immune systems target the immune system, not the tumor itself." Wij verzoeken u dit nader toe te lichten, ook in het licht van wat verderop schrijft onder 2, The xenograft tumor models: "If the immunotherapeutic acts on the tumor cell itself, the appropriate tumor cell needs to be present in the model." Dit lijkt ons op het eerste gezicht tegenstrijdig. Onze vraag daarbij is: op welk mechanisme tracht u invloed uit te oefenen met immunotherapie en hoe? Beide zijn waar. De formulering bij 3.4 is niet helemaal correct en ik snap dat het verwarring geeft. Ik heb de zin aangepast naar "Most immunotherapeutics target the immune system, whereas other immunotherapeutics act on the tumor tissue itself, however thereby also indirectly acting on the immune system." De uitleg daarbij is dat een immunotherapie ervoor zorgt dat het immuun systeem in staat wordt gesteld om een tumor te kunnen opruimen. De mechanisme daarvan kan erg verschillen, bijv. door direct de immuun cellen te activeren, of door de specifieke remming van het immuun systeem door de tumor weg te halen, etc. Dit kan op verschillende manieren gebeuren. Een immuun therapie kan direct werken op de immuun cellen, maar als tweede kan het ook direct op de tumor cellen werken, waardoor indirect het immuun systeem ook wordt geactiveerd. Vaak is het zo dat de immuun therapieën die direct op het immuun systeem werken worden getest in syngene modellen en xenograft modellen. De immuun therapieën die direct op de tumor aangrijpen worden in de meeste gevallen getest in de xenograft modellen omdat dit beter te transleren is naar de mens dan in de syngene modellen.
2. Eveneens bij 3.4, Onderzoeksstrategie, vragen wij ons af in het kader van vermindering of het altijd nodig is om eerst een experiment met traag groeiende tumoren te doen en als volgende stap een experiment met snelgroeiende tumoren. Hoe rigide is deze strategie en wat zijn afhankelijk van de gekozen strategie de effecten op aantallen dieren en ongerief? Nee, het is zeker niet altijd nodig om eerst een experiment te doen met een traag groeiende tumor en vervolgens een snel groeiende tumor. De keus is afhankelijk van het te verwachten effect van de compound (gebaseerd op de historische data). Als te verwachten is dat een compound een sterk effect heeft, zal meteen een snel groeiende tumor gebruikt kunnen worden. Als van een compound een klein effect verwacht wordt dan zal in eerste instantie een langzaam groeiende tumor gebruikt worden. Daarnaast is het van belang wat de vraag/doel is van het onderzoek. Wil men een beter effect zien op een bestaande therapie die op zich al heel potent is, dan zal gekozen worden voor een snel groeiende tumor. Of als men een additief effect wil zien van een compound in een combinatie therapie dan zal ook voor een snel groeiende tumor gekozen worden. Wat betreft vermindering van het aantal dieren kan ik zeggen dat er altijd een goede overweging wordt gemaakt of het gekozen model een logische stap is. Als voorbeeld, indien een compound niet heel goed werkzaam is in een langzaam groeiende tumor, zal nooit daarna een studie gedaan worden met een snel groeiende tumor. Alles hangt dus samen met de voorkennis en verwachtingen van de compound en de overweging of het gekozen model een antwoord kan geven op de gestelde vraag. Qua ongerief zal er geen verschil zijn tussen de beide modellen (snel of langzaam groeiende tumoren). De HEP zijn voor beide modellen gelijk en dus kan ik zeggen dat een snel groeiende tumor niet meer ongerief zal geven dan een langzaam groeiende tumor.
3. Nogmaals bij 3.4, Onderzoeksstrategie, beschrijft u dat u de beschreven diermodellen hebt gekozen op basis van een uitgebreide rondvraag in het veld. Wat betekent dit als een opdrachtgever specifiek om een bepaald model vraagt dat u nu niet beschreven hebt? Indien een opdrachtgever specifiek om een ander model vraagt zullen we in discussie gaan met de opdrachtgever of onze modellen echt geen optie zijn. Als dit niet zo is dan zullen we een overweging maken (gebaseerd op literatuur, interne kennis en benodigde expertise van het model, mogelijkheid om het model op te zetten, etc) of wij dit model zouden willen opzetten. Als er te veel twijfel is zullen we dit niet doen. Indien we van mening zijn dat wij wel de kennis en expertise hebben om het model op te zetten dan zullen we eerst beginnen met een pilot experiment waarbij een klein aantal dieren gebruikt gaat worden om het model te testen (zie design beschreven bij set-up studies). Indien dit succesvol is dan pas zullen we een 'grote' studie gaan uitvoeren voor de specifieke opdrachtgever.
4. In de appendix onder 2.A beschrijft u het hoe u het onderzoek gaat uitvoeren. Op basis waarvan en met welke criteria bepaalt u het uiteindelijke protocol dat u gaat uitvoeren? Zo vragen wij ons af hoe de hoeveelheid te injecteren tumorcellen wordt bepaald, met name als het zou gaan om nieuwe cellijnen waar van de uitwerking in diermodellen nog niet bekend is. Zoals beschreven bij het opzetten van een model (set-up studie) zullen we altijd bij een nieuw model een test doen met meerdere cel concentraties. Hiermee kunnen we bepalen wat de groeisnelheid van de tumoren is bij de verschillende aantallen geïnjecteerde cellen. De gekozen hoeveelheden zijn altijd gebaseerd op wat eerder is uitgevoerd in de literatuur en/of wat de kennis is van de opdrachtgever over het te injecteren aantal cellen. Dus met literatuur onderzoek en historische kennis van de opdrachtgever zullen we het aantal cellen vaststellen.
5. Eveneens onder 2.A verwijst u voor de bepaling van humane eindpunten terecht naar de verplicht te gebruiken "Code of practice for cancer research" van 1996. Hoe houdt u zich op de hoogte van actuele wetenschappelijke inzichten op dit terrein en in hoeverre past u die aanvullend toe? We blijven op internet bijhouden of er nieuwe richtlijnen zijn. Indien die worden vastgesteld zullen we ons daar aan gaan houden. Daarbij komt dat we tijdens onze experimenten altijd de HEP blijven aanpassen indien er

gegronde redenen zijn (altijd in overleg met dierenarts en proefdierdeskundige) om ze aan te passen. De lijntjes met de dierenarts en proefdierdeskundige zijn erg kort en overleg vindt vaak plaats. Als voorbeeld kan ik zeggen dat we pas nog de HEP hebben aangepast ivm vaak voorkomen van verlammingen bij een bepaalde soort tumorcellen. Dit is nu standaard opgenomen in het HEP.

6. In de appendix onder 2.B, The animals, staat dat u het geslacht van het dier laat afhangen van het geslacht van de cellijn. Wij vragen ons af of er keuze is in de te gebruiken of te ontwikkelen cellijn en of deze al dan niet in verschillende geslachten beschikbaar zijn. Kunt u deze keuze ook onderbouwen in relatie tot de translatie naar de (mannelijke of vrouwelijke) mens?

Tot nu toe zijn de cellijnen vaak maar in 1 geslacht bruikbaar, namelijk het geslacht waar de cellijn is uit geïsoleerd. Indien een cellijn in de andere sexe wordt ingespoten bestaat de kans dat de tumor al wordt opgeruimd door het immuun systeem omdat het voor vreemd wordt aangezien. Tot nu toe is er geen negatieve relatie gevonden waaruit is gebleken dat de bevindingen die gedaan zijn in een groep muizen van gelijke sexe, niet transleerbaar waren naar de andere sexe in de mens.

7. In de appendix onder 2.D, onder Refinement, noemt u opnieuw deze Code of practice waar het gaat om het meten van de tumor voor het bepalen wanneer het humane eindpunt is bereikt. Er zijn inmiddels nieuwere meetmethoden, waarmee de tumorgroei preciezer kan worden vastgesteld. Gebruikt u deze en kunt u daarover aanvullend iets opnemen?

Op dit moment is de manier van meten dmv een Caliper nog steeds de beste manier van tumor volume meten. Er worden nieuwe methodes ontworpen en die testen we ook indien beschikbaar. In de afgelopen studie hebben we een nieuw apparaat getest waarin een soort scan werd gemaakt van de tumor om het volume te bepalen. Deze methode is niet optimaal en de fabrikant gaat hiermee aan de slag. Indien er dus nieuwe methode beschikbaar zijn dan zullen we die zeker uittesten en invoeren indien het beter is dan de Caliper. Beter betekent in dit geval minder ongerief voor de dieren, betere inschatting/meting van het daadwerkelijke volume en minder variatie tussen meetpersonen. Tumoren kunnen ook gemeten worden dmv bijv. bestaande beeldvormende methoden. Deze methode is alleen mogelijk indien de tumor cellen hierop zijn aangepast. Van niet alle tumoren is deze methode beschikbaar. Waar mogelijk zal deze methode gebruikt worden.

8. Eveneens onder 2D, bij Refinement: kunt u motiveren of u overweegt technieken te gebruiken die de tumor in het lichaam meten door middel van bijvoorbeeld beeldvormende technieken, in plaats van het indirect meten van de tumorgroei door middel van het meten van de gevolgen (bijv. benauwdheid)?

Zoals hierboven aangegeven zullen we dit zeker in overweging nemen indien de tumor cellijn hierop is aangepast en verkrijgbaar is voor profit organisaties. In veel gevallen is het niet mogelijk om als profit organisatie deze cellijnen te verkrijgen/kopen. Indien het mogelijk is zullen we daar zeker gebruik van maken.

Het is voor de afweging die wij als DEC maken van belang om naast het doorgronden van doel en strategie, ook het ongerief van de dieren goed te kunnen inschatten.

9. In de appendix onder 2.J beschrijft u de humane eindpunten en de incidentie daarbij. Onder b schrijft u: "it might happen that other unexpected humane endpoints will appear. During the study the humane endpoint will be altered in consultation with the AWB and the veterinarian." Dit maakt het onmogelijk de humane eindpunten mee te nemen in de afweging van de DEC. Wij verzoeken u te beschrijven hoe u voorafgaand aan elke dierproef de humane eindpunten zult bepalen op basis van bijvoorbeeld voorkomende fenotypen.

De HEP zoals beschreven in de appendix zullen altijd worden toegepast. Het aanpassen van de HEP zal alleen gebeuren wanneer een nieuw tumor model wordt opgezet. Voorafgaand aan een studie met een heel nieuw model zal in de literatuur gezocht worden of er extra/andere HEP toegevoegd moeten worden aan de al beschreven HEP. Dit zal dus voorafgaand aan de studie worden toegevoegd in samenspraak met de dierenarts en de proefdierdeskundige. Tijdens een set-up studie waarin de eerste keer een nieuwe cellijn wordt getest, zullen deze bedachte HEP geanalyseerd worden en na afloop besproken met de AWB.

De beschreven HEP in de appendix zullen dus in alle studies gehandhaafd worden. Alleen de nieuwe modellen die we gaan opzetten zullen de HEP uitgebreider worden.

10. Eveneens onder 2.J: Gelden verlamingsverschijnselen als criterium voor het vaststellen van het humane eindpunt?

Ja, recent is dit toegevoegd aan de criteria van de HEP. Is aangepast in de appendix (toegevoegd).

11. Wij verzoeken u de titels van de onderdelen van uw projectvoorstel beter op elkaar af te stemmen en gericht te formuleren (niet te breed, niet te smal).

De titel van de project proposal is aangepast met in de titel immunotherapies.

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 (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Er zijn geen DEC-leden betrokken bij het betreffende project.

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

1. De aanvraag is toetsbaar en heeft voldoende samenhang. De aanvrager heeft op een eerder moment een projectaanvraag met een vergelijkbaar onderwerp ingediend. Toen heeft de DEC TNO uitgebreid gediscussieerd over de toetsbaarheid van dat projectvoorstel. Dit bevond zich meer op programmaniveau dan op projectniveau. Zo was het voor de DEC bijvoorbeeld onmogelijk te bepalen of bij elk onderdeel voor het optimale diermodel gekozen zou worden. Hierover zijn toen vragen gesteld aan de aanvrager. Deze heeft daarop besloten een geheel nieuw projectvoorstel voor te leggen, waar dit advies over gaat. Naar de mening van de DEC heeft dit project voldoende samenhang en is het als een geheel te benaderen. Het gaat als geheel om de zoektocht naar betere immunotherapieën voor kanker, waarbij potentiële medicijnen in opdracht worden onderzocht. Dit kunnen verschillende medicijnen zijn, waarvoor verschillende cellijnen en muismodellen zijn geselecteerd, in overleg met opdrachtgevers. De te gebruiken technieken zijn beschreven in de aanvraag, maar op basis van de voorliggende vraag van een opdrachtgever zal per onderzoeksvraag een experiment worden ontworpen. Deze experimenten passen allemaal binnen de kaders zoals gesteld in het voorliggende projectvoorstel.
2. Voor zover de DEC bekend, is er geen mogelijk tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de dierexperimenten in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) sluit(en) aan bij de hoofddoelstelling(en). Het gaat om translationeel/toegepast onderzoek, namelijk het testen in muizen van medicijnen op het gebied van immunotherapie tegen kanker, met als doel een bijdrage te leveren aan de ontwikkeling van immunotherapieën voor kankerpatiënten.

#### *Belangen en waarden*

4. Het directe doel van het project is bijdragen aan de ontwikkeling en verbetering van nieuwe immunotherapieën tegen kanker. Het uiteindelijke doel is het afremmen of in de toekomst mogelijk genezen van kanker. De wijze waarop het project zal worden uitgevoerd maakt aannemelijk dat dit inderdaad kan bijdragen aan de ontwikkeling en verbetering van immunotherapieën. De DEC is daarom van mening dat er in voldoende mate een relatie is

tussen het directe doel en het uiteindelijke doel. Uiteindelijk is het behalen van het doel altijd afhankelijk van de potentie van een immunotherapie die ontwikkeld is door een opdrachtgever. DEC TNO ziet voldoende geborgd dat een deskundig projectteam van de vergunninghouder de historische data beoordeelt en in overleg met de opdrachtgever de geschikte in vivo-experimenten ontwerpt zodat het doel behaald kan worden.

5. De belangrijkste belanghebbenden in dit onderzoeksproject zijn: kankerpatiënten en de muizen die als proefdier gebruikt worden. Daarnaast hebben opdrachtgevers belang bij informatie over hun (potentiële) product. Ook de uitvoerende organisatie en de medewerkers die aan het onderzoek werken hebben een belang. Voor de patiënten zijn in het geding de waarden: leven, gezondheid, welzijn, activiteiten kunnen ontplooiën. Voor de proefdieren zijn in het geding de waarden: leven, gezondheid, welzijn en natuurlijk gedrag kunnen vertonen. Voor de opdrachtgevers en de uitvoerende organisatie gaat het voornamelijk om een economisch belang. Voor de betrokken medewerkers van TNO gaat het om hun professionele ontwikkeling.
6. De DEC ziet geen aanleiding om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken. De voorschriften voor werken met genetisch gemodificeerde organismen worden in acht genomen.

#### *Proefopzet en haalbaarheid*

7. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd en dragen eraan bij dat de doelstellingen behaald kunnen worden, dat aan de 3V-beginselen voldaan kan worden en dat voorkomen kan worden dat mens, dier en milieu negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven. De aanvrager werkt met verschillende specialistische onderzoeksgroepen met jaren ervaring, zowel in de oncologie als de immunologie. Ook is er grondige kennis aanwezig van de specifieke tumormodellen. De aanvrager houdt zich via literatuur en nauw contact met de IvD goed op de hoogte van 3V-opties, en geeft daar concreet blijk van in de antwoorden op de vragen 7 en 8 van de DEC (over verfijning). Daarnaast geven de antwoorden op de vragen 5 en 7 aan dat de aanvrager niet blind gebruik maakt van richtlijnen van een decennium geleden, maar zelf en in overleg met de IvD betere humane eindpunten includeert. Een voorbeeld hiervan zijn de verlamingsverschijnselen die bepaalde cellijnen kunnen genereren.
8. Het project is goed opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten logisch en helder aan bij de aangegeven doelstellingen, en de gekozen strategie met experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Muizen krijgen tumorcellen geïnjecteerd en krijgen vervolgens al dan niet medicijnen toegediend die direct of via het immuunsysteem de tumorgroei afremmen. De strategie is nauwkeurig omschreven en op details verduidelijkt in de antwoorden op de vragen 1 t/m 4 van de DEC. Met deze strategie kan volgens de DEC werkelijk een substantiële bijdrage worden geleverd aan de ontwikkeling en verbetering van immunotherapieën.

### *Welzijn dieren*

9. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
- Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
  - Niet-menselijke primaten (10e)
  - Dieren in/uit het wild (10f)
  - Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I EU richtlijn)
  - Zwerfdieren (10h)
  - Hergebruik (1e lid 2)
  - Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
  - Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
  - Dodingsmethode niet volgens bijlage IV EU richtlijn (13c lid 3)
10. De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de EU-richtlijn.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Gezien de nauwgezette monitoring van de dieren is het realistisch dat het merendeel van de dieren licht ongerief zal hebben van anesthesie en/of de tumor. Door de tumor zal naar schatting 9% matig ongerief hebben en 1% ernstig. Deze laatste groep wordt beperkt door het eventuele aanscherpen van de humane eindpunten, zoals betoogd in het antwoord op de vragen 9 en 10 van de DEC.
12. De integriteit van de dieren wordt in die zin aangetast dat gewerkt wordt met muizen die door genetische modificatie naakt zijn.
13. De humane eindpunten zijn in de bijlage dierproeven goed gedefinieerd, en het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt bereikt is goed ingeschat. De DEC heeft met vraag 9 doorgevraagd naar de onduidelijkheid over het eventuele gaandeweg het project aanpassen van de humane eindpunten. Uit het antwoord blijkt dat het gaat om het eventuele aanvullen van de criteria. Dit betekent dat de beschreven criteria in elk geval gehandhaafd zullen blijven, en daarmee kan de DEC een ethische afweging maken.

### *3V's*

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn voor het project, maar geeft aan per studie te zullen nagaan, op grond van historische data, of er voor specifiek die studie een alternatief is. Het ontwikkeltraject van de te testen immuuntherapie zal plaatsvinden bij de opdrachtgevers.

15. Het aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en er is een heldere strategie om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Die strategie bestaat eruit dat voorafgaand aan elke studie onder dit project een analyse wordt gedaan, met literatuuronderzoek, van de optimale cellijn en het optimale model, op grond waarvan het optimale aantal dieren kan worden vastgesteld. In het kader van het diergebruik en ongerief heeft de DEC ook gevraagd naar de strategie voor het testen van immunotherapie in snelle of langzaam groeiende modellen. De DEC onderschrijft de strategie die de aanvrager omschrijft om niet altijd een vaste opeenvolging van de kankermodellen te gebruiken, maar afhankelijk van de specifieke onderzoeksvraag een model te kiezen. Daarmee wordt dus altijd toegewerkt naar een strategie met zo min mogelijk dieren.
16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van verfijning van dierproeven, en het project is zodanig opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Omdat de klinische reacties op de cellijnen niet altijd voorspelbaar zijn, is extra alertheid geboden, waar de aanvrager blijk van geeft. Ook in de antwoorden op de vragen 7 en 8 van de DEC over verfijning (nieuwe technieken) laat de aanvrager zien waar mogelijk technieken te overwegen die bij kunnen dragen aan verfijning. Daarnaast blijken de snel of langzaam groeiende modellen op het gebied van ongerief niet te verschillen en kan dus puur vraag gestuurd het beste model gekozen worden.
17. Er is geen sprake van wettelijk vereist onderzoek.

*Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef*

18. Er zullen in de bijlage zowel mannelijke als vrouwelijke dieren worden gebruikt, maar de aanvrager geeft aan dat niet te voorspellen is of die twee in balans zullen zijn. Men is hierbij afhankelijk van het geslacht van de cellijnen. De DEC is ervan overtuigd dat de aanvrager in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd dat het, om de doelstellingen te bereiken en de kwaliteit van de studies te garanderen, noodzakelijk is om de proeven soms met mannelijke, soms met vrouwelijke dieren uit te voeren. Dit is nader toegelicht in het antwoord op vraag 6 van de DEC.
19. De dieren worden in het kader van het project gedood. Dit is noodzakelijk om lichaamsmaterialen nader te onderzoeken ten behoeve van analyse van de werking van het medicijn. De dieren worden op een volgens de bijlage IV van de EU-richtlijn passende methode gedood.
20. Omdat in het projectvoorstel muizen worden aangevraagd is de vraag over herplaatsing/hergebruik niet van toepassing.

NTS

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

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

1. De centrale morele vraag luidt: rechtvaardigt het ontwikkelen en verbeteren van immunotherapieën de dood van 6.000 muizen en het voor 90% van de dieren lichte, voor 9 % van de dieren matige en voor 1% van de dieren ernstige ongerief?
2. Het belang van de patiënten en de samenleving is groot. Kanker is een ernstige ziekte die op grote schaal voorkomt en veel leed met zich meebrengt voor patiënten en hun naasten. 6.000 muizen worden onderworpen aan voornamelijk licht, maar ook aan matig ongerief en soms ernstig ongerief en gaan ook dood, dit is bij elkaar een groot nadeel voor de muizen.
3. De DEC is overtuigd van het belang van de doelstellingen om immunotherapie verder te ontwikkelen en te verbeteren. De DEC weegt het voordeel voor de patiënten en de samenleving zwaarder dan het nadeel voor de 6.000 proefdieren. Immunotherapie is op dit moment een veelbelovende richting voor de behandeling en genezing van kanker. Dit onderzoeksproject kan concrete resultaten opleveren die immunotherapie verder kunnen brengen, en daarmee bijdragen aan de verbetering van de kwaliteit van leven en verhoging van de overlevingskans van patiënten. De afweging valt daarom uit in het voordeel van de patiënten. Het project is goed opgezet, en de aanvrager werkt goed aan het optimaliseren van het onderzoek en de 3 V's. Er is veel aandacht voor het per studie opnieuw bekijken van de mogelijkheden daartoe. Op grond van het bovenstaande is de DEC TNO van mening dat het gebruik van de dieren voor dit onderzoeksproject gerechtvaardigd is.

#### **E. Advies**

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden.

De aanvrager omschrijft in 3.4.1 een aantal tumorcellijnen waarmee men veel ervaring heeft. De aanvrager is ervan overtuigd dat men hiermee de vragen van opdrachtgevers kan beantwoorden op het gebied van immuuntherapie. De DEC ziet dat de aanvrager bij de keuze voor deze cellijnen een weloverwogen keuze heeft gemaakt. De aanvrager beschrijft een andere strategie voor het mogelijk toepassen van een andere cellijn. Deze strategie kan voorkomen als een opdrachtgever vraagt om het gebruik van een andere tumorcellijn. In dit geval zal er, na overleg met de Instantie voor Dierenwelzijn en raadpleging van literatuur en interne kennis, eerst een pilotstudie worden gedaan om de tumorcellijn te valideren. De IvD zal de CCD op de hoogte brengen van het gebruik van een nieuwe cellijn via een melding. De DEC adviseert om hierbij de voorwaarde te stellen dat wanneer uit een pilotstudie met een andere tumorcellijn



blijkt dat de uitkomst buiten de in de aanvraag genoemde kaders valt voor het ongerief, er een wijziging op dit project ingediend moet worden voordat er verdere effectiviteitsstudies uitgevoerd gaan worden.

Daarnaast adviseert de DEC dat er een wijziging op dit project ingediend moet worden wanneer een opdrachtgever een andere tumorcellijn wenst te gebruiken vanwege een andere wetenschappelijke reden, een die afwijkt van de in het project omschreven reden, die waarbij de te testen therapie aangrijpt op een eiwit op de tumor zelf.

Op deze manier beoogt de DEC te bereiken dat wanneer het gebruik van een nieuwe cellijn afwijkt van de in het project beschreven kaders voor ongerief of wetenschappelijk doel, er een onafhankelijke weging plaatsvindt om de noodzaak van het opzetten van een nieuw tumormodel en eventuele substantiële toename van het ongerief dat gepaard kan gaan met het gebruik van een nieuwe tumorcellijn, te kunnen signaleren en indien nodig te toetsen.

De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.
3. Er is een dilemma naar voren gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag. Er is in de DEC uitgebreid gediscussieerd over de transleerbaarheid van kankermodellen van de muis naar de mens. Daarbij is de DEC uiteindelijk tot de conclusie gekomen dat transleerbaarheid niet alleen in kankermodellen, maar ook in vele andere diermodellen een probleem is. De DEC heeft geconcludeerd dat we helaas nog niet op een punt zijn deze diermodellen te kunnen vervangen door beter voorspellende modellen. De DEC heeft ook expliciet uitgesproken dat zij deze discussie naar aanleiding van dit project voert, maar dat het in dit project niet meer of minder speelt dan in andere projecten. Daarmee is het genoemde dilemma geen direct onderdeel geweest van de afweging voor dit project, maar de DEC benoemt het hier, omdat het een dilemma is waar de DEC geregeld op uitkomt.





> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Triskelion BV

[Redacted]

Postbus 844

3704 HE ZEIST



**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  
AVD5040020172364

**Bijlagen**

2

Datum 28 juni 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [Redacted]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 26 juni 2017. Het gaat om uw project "In vivo research involving mouse tumor models for the development of and improvement of anti-cancer immunotherapies.". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD5040020172364. 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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

**Datum:**

28 juni 2017

**Aanvraagnummer:**

AVD5040020172364

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

**Datum:**  
28 juni 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD5040020172364


### **Gegevens aanvrager**

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 50400  
Naam instelling of organisatie: Triskelion BV  
Naam portefeuillehouder of  
diens gemachtigde:   
KvK-nummer: 51382997  
Postbus: 844  
Postcode en plaats: 3704 HE ZEIST  
IBAN: NL101NGB0654470189  
Tenaamstelling van het  
rekeningnummer: Triskelion B.V

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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



**Datum:**  
28 juni 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD5040020172364

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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



Gegevens gemachtigde

Postbus: 96800  
Postcode en plaats: 2509 JE ZEIST

Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Ja

Wat mag de gemachtigde doen?

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

**Over uw aanvraag**

Wat voor aanvraag doet u?

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

**Over uw project**

Geplande startdatum: 1 januari 2018  
Geplande einddatum: 1 januari 2023  
Titel project: In vivo research involving mouse tumor models for the development of and improvement of anti-cancer immunotherapies.  
Titel niet-technische samenvatting: Dierstudies in het kader van ontwikkeling van nieuwe en verbeterde anti-kanker immuno-therapieën  
Naam DEC: DEC-TNO  
Postadres DEC: 96800 2509 JE DEN HAAG  
E-mailadres DEC: [REDACTED]

**Datum:**

28 juni 2017

**Aanvraagnummer:**

AVD5040020172364

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 1035,-  
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

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

**Ondertekening**

Naam: [REDACTED]  
Functie: [REDACTED]  
Plaats: Den Haag  
Datum: 27 juni 2017



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Triskelion BV  
T.a.v. crediteurenadministratie  
Postbus 844  
3700 AV ZEIST



**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  
AVD5040020172364

**Bijlagen**

2

Datum 28 juni 2017  
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 28 juni 2017  
Vervaldatum: 28 juli 2017  
Factuurnummer: 172364  
Ordernummer: 56001165

| Omschrijving  | Bedrag   |
|---|----------|
| Betaling leges projectvergunning dierproeven<br>Betreft aanvraag AVD5040020172364 | € 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

Triskelion BV

[Redacted]

Postbus 844

3704 HE ZEIST



**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  
AVD5040020172364

Datum 7 juli 2017

Betreft Aanvulling aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [Redacted]

Op 26 juni 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "In vivo research involving mouse tumor models for the development of and improvement of anti-cancer immunotherapies." met aanvraagnummer AVD5040020172364. 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:

### **Ondertekening**

Voor deze aanvraag is het aanvraagformulier nog niet op papier ontvangen. Wij hebben echter ook de zogenaamde 'natte handtekening' nodig. Wij verzoeken u een ondertekend aanvraagformulier per post te sturen.

### **Onduidelijkheden**

In de NTS staat genoemd dat er 'ongeveer 6000 muizen' zullen worden gebruikt. In de Bijlage Dierproeven staat dat er 6000 muizen worden gebruikt voor de efficacy studies en 600 voor set-up. Kunt u een nieuwe NTS sturen waarin de aantallen dieren overeenkomen met de Bijlage Dierproeven?

### **Leges**

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

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

**Datum:**

7 juli 2017

**Aanvraagnummer:**

AVD5040020172364

**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](http://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





> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Triskelion BV



Postbus 844  
3704 HE ZEIST  
[Barcode]

**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  
AVD5040020172364  
**Bijlagen**  
1

18 JULI 2017

Datum 17 juli 2017  
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [Redacted]

Op 26 juni 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "In vivo research involving mouse tumor models for the development of and improvement of anti-cancer immunotherapies." met aanvraagnummer AVD5040020172364. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 13 juli 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Dit betrof een nieuwe NTS.

**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.

De DEC heeft geadviseerd voorwaarden te stellen om te bereiken dat wanneer het gebruik van een nieuwe cellijn afwijkt van de in het project beschreven kaders voor ongerief of wetenschappelijk doel, er een onafhankelijke weging plaatsvindt om de noodzaak van het opzetten van een nieuw tumormodel en eventuele substantiële toename van het ongerief dat gepaard kan gaan met het gebruik van een nieuwe tumorcellijn, te kunnen signaleren en indien nodig te toetsen. Deze voorwaarden zijn door de CCD overgenomen.

U kunt met uw project "In vivo research involving mouse tumor models for the development of and improvement of anti-cancer immunotherapies." 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 een looptijd van maximaal 5 jaar kan hebben.

**Datum:**  
17 juli 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD5040020172364

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

#### **Beoordeling achteraf**

Na afloop van het project zal er een beoordeling plaatsvinden, zoals bedoeld in artikel 10a1, lid 1d en lid 3, in de wet. Meer informatie over de eisen bij een beoordeling achteraf vindt u in de bijlage.

Er is sprake van ernstig ongerief.

#### **Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-TNO gevoegd. Dit advies is opgesteld op 26 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.

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

**Datum:**  
17 juli 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD5040020172364

Centrale Commissie Dierproeven

naam

ir. C

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: Triskelion BV  
Adres: Postbus 844  
Postcode en plaats: 3704 HE ZEIST  
Deelnemersnummer: 50400

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 januari 2018 tot en met 31 december 2022, voor het project "In vivo research involving mouse tumor models for the development of and improvement of anti-cancer immunotherapies." met aanvraagnummer AVD5040020172364, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-TNO. 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 26 juni 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 26 juni 2017;
  - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 13 juli 2017;
  - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 26 juni 2017, ontvangen op 26 juni 2017.
  - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 13 juli 2017

| Naam proef   | Diersoort/ Stam         | Aantal dieren | Ernst  | Opmerkingen |
|--|-------------------------|---------------|--|-------------|
| <b>3.4.4.1 Tumor models for immunotherapeutics</b> |                         |               |  |             |
|  | Muizen (Mus musculus) / | 6.600         | 1%<br>Ernstig<br>9%<br>Matig<br>90%<br>Licht |             |

### Voorwaarden

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

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet en wordt daarom voorzien van beoordeling achteraf. Deze beoordeling zal uiterlijk april 2023 plaatsvinden. Er zal dan beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt. Daarnaast wordt bekeken of de schade die de dieren hebben ondervonden, het aantal en soorten proefdieren en de ernst de dierproeven conform de vergunning waren.

**Aanvraagnummer:**  
AVD5040020172364

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.

Indien er een nieuwe cellijn wordt gebruikt die niet in de projectaanvraag is beschreven, wordt dit via een melding aan de CCD kenbaar gemaakt, zolang hiervoor niet meer dieren nodig zijn dan in deze vergunning staan. Als het aantal dieren hoger is, wordt dit via een wijziging kenbaar gemaakt aan de CCD. Indien uit een pilotstudie met een andere tumorcellijn blijkt dat de uitkomst buiten de in de aanvraag genoemde kaders valt voor het ongerief, moet er een wijziging op dit project ingediend worden voordat er verdere effectiviteitsstudies uitgevoerd gaan worden.

Daarnaast moet er een wijziging op dit project ingediend worden wanneer een opdrachtgever een andere tumorcellijn wenst te gebruiken vanwege een andere wetenschappelijke reden, een die afwijkt van de in het project omschreven reden, die waarbij de te testen therapie aangrijpt op een eiwit op de tumor zelf.



**Aanvraagnummer:**

AVD5040020172364

## 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:**  
AVD5040020172364

kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

#### **Einde van een dierproef**

Artikel 13a van de wet bepaalt dat een dierproef is afgelopen wanneer voor die dierproef geen verdere waarnemingen hoeven te worden verricht of, voor wat betreft nieuwe genetisch gemodificeerde dierenlijnen, wanneer bij de nakomelingen niet evenveel of meer, pijn, lijden, angst, of blijvende schade wordt waargenomen of verwacht dan bij het inbrengen van een naald. Er wordt dan door een dierenarts of een andere ter zake deskundige beslist of het dier in leven zal worden gehouden. Een dier wordt gedood als aannemelijk is dat het een matige of ernstige vorm van pijn, lijden, angst of blijvende schade zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.

Volgens artikel 13b moet de dood als eindpunt van een dierproef zoveel mogelijk worden vermeden en vervangen door in een vroege fase vaststelbare, humane eindpunten. Als de dood als eindpunt onvermijdelijk is, moeten er zo weinig mogelijk dieren sterven en het lijden zo veel mogelijk beperkt blijven.

Uit artikel 13d volgt dat het doden van dieren door een deskundig persoon moet worden gedaan, wat zo min mogelijk pijn, lijden en angst met zich meebrengt. De methode om te doden is vastgesteld in de Europese richtlijn artikel 6.

In artikel 13c is vastgesteld dat proefdieren geadopteerd kunnen worden, teruggeplaatst in hun habitat of in een geschikt dierhouderijsysteem, als de gezondheidstoestand van het dier het toelaat, er geen gevaar is voor volksgezondheid, diergezondheid of milieu en er passende maatregelen zijn genomen om het welzijn van het dier te waarborgen.

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

#### **Beoordeling achteraf**

Volgens artikel 10a1, lid 1d en lid 3 van de wet worden projecten waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt, projecten die als ernstig ingedeelde dierproeven omvatten of een dierproef die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, achteraf beoordeeld worden.

| Inventaris Wob-verzoek W17-12 |                                    |                 |      |        |       |                   |        |        |      |
|-------------------------------|------------------------------------|-----------------|------|--------|-------|-------------------|--------|--------|------|
| nr.                           | document NTS 20172465              | 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                             | Referentielijst                    |                 |      | x      |       |                   |        |        |      |
| 7                             | Ontvangstbevestiging               |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |      |
| 8                             | Dec-advies                         |                 |      |        | x     |                   |        | x      |      |
| 9                             | Adviesnota CCD                     |                 | x    |        |       |                   |        |        | x    |
| 10                            | 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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl) of in de toelichting op de website.
- Of bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

## 1 Gegevens aanvrager

- 1.1 Heeft u een deelnemernummer van de NVWA?  
*Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.*
- Ja > Vul uw deelnemernummer in 11500  
 Nee > U kunt geen aanvraag doen
- 1.2 Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.
- Naam instelling of organisatie UMC Utrecht  
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde [REDACTED]  
KvK-nummer 30244197
- 1.3 Vul de gegevens van het postadres in.  
*Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.*
- Straat en huisnummer Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht  
Postbus 12007  
Postcode en plaats 3501AA Utrecht  
IBAN NL27INGB0000425267  
Tenaamstelling van het rekeningnummer Universiteit Utrecht
- 1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.
- (Titel) Naam en voorletters [REDACTED]  Dhr.  Mw.  
Functie [REDACTED]  
Afdeling [REDACTED]  
Telefoonnummer [REDACTED]  
E-mailadres [REDACTED]
- 1.5 *(Optioneel)* Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.
- (Titel) Naam en voorletters [REDACTED]  Dhr.  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  Dhr.  Mw.
- Functie
- Afdeling
- Telefoonnummer
- E-mailadres
- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?
- Ja > *Stuur dan het ingevulde formulier Melding Machtiging mee met deze aanvraag*
- Nee

## 2 Over uw aanvraag

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

## 3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 1 - 9 - 2017
- Einddatum 1 - 9 - 2022
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Cartilage-based strategies for bone regeneration in maxillofacial surgical interventions
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Strategieën voor botregeneratie vanuit kraakbeen in mond- kaak en aangezichtschirurgische ingrepen
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC DEC Utrecht
- Postadres Postbus 85500, 3508 GA Utrecht
- E-mailadres dec-utrecht@umcutrecht.nl

## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?  Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1.287 Lege  
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.  
 Via een eenmalige incasso  
 Na ontvangst van de factuur
- Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*

## 5 Checklist bijlagen

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

## 6 Ondertekening

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

Centrale Commissie  
 Dierproeven  
 Postbus 20401  
 2500 EK Den Haag

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondergetekende verklaart:

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

Naam

Functie

Plaats

Datum

Handtekening

Utrecht



## 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](http://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.

##### 3.1.1 Motivation and background

Bone is the second most commonly transplanted tissue(1), as bone grafting is required in several orthopaedic, neurosurgical and dental procedures such as craniomaxillofacial reconstructions, spinal fusion techniques or

delayed fusion of bone defects (delayed unions and non-unions) (2, 3). Autografts, which represent the current golden standard, have an excellent success rate and a complete immunocompatibility. However, due to several drawbacks, including donor-site morbidity, limited tissue availability and surgical complications, this procedure is suboptimal or not always an option (4). Allografts are considered the surgeon's second best option. However, the percentage of successful graft incorporation is lower and the procedure is not completely free from the risk of immune rejection and pathogen transmission (4, 5). To overcome these limitations, a bone substitute is required, preferably as an off-the-shelf product. Currently, next to tissue transplantation, several non-regenerative treatment options are available such as polymer or titanium prostheses that do not adapt or grow. These prosthetic solutions have a limited lifespan in the patient, most commonly due to infections.

As mentioned, substitutes could be engineered via regenerative medicine strategies. These can be based on the use of (stem) cells and/or biomaterials. The latter is less complex and has found its way into the clinic. Various calcium phosphate-based materials (representing the inorganic component of bone tissue) are applied in the clinic when no tissue can be transplanted. However, the clinical outcomes with these materials are inferior to the gold standard transplantation treatment options. This warrants the exploration of creating bone substitutes based on both cells and materials. A relatively new and promising approach herein is to initiate and stimulate endochondral bone regeneration.

Endochondral bone is formed from a cartilaginous template that mineralizes and, following vascular invasion, is converted into bone tissue (6). This type of bone formation is typically seen in growth plates or in fracture healing. The endochondral process can be mimicked by stimulating chondrogenesis (cartilage formation) in bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) (7).

■■■■■ shown that following implantation of cartilaginous tissue from MSCs, conversion into bone tissue can take place. The present project will aim to take steps towards the clinical translation of this approach.

### **3.1.2 State of the art**

The successful concept of the endochondral approach to bone regeneration has been demonstrated at subcutaneous locations (8-12). Here, MSC cultures in aggregate form or within biomaterial carriers, pre-cultured in chondrogenic medium for 2-7 weeks, could repeatedly induce endochondral bone formation (10-14).

Although the feasibility and reproducibility of the approach itself has been established, crucial translational questions remain unaddressed. Therefore, these questions will form the focus of this project and are detailed under 3.2.

■■■■■ is at the forefront of the field in endochondral bone regeneration. This research line was initiated with the ■■■■■. In that project the feasibility of endochondral bone regeneration was demonstrated for human cells in an immuno-incompetent rat model (subcutaneous and femur defect) (13, 15). Last year, we received a grant from ■■■■■ to conduct studies focusing on the translational potential of endochondral bone regeneration.

### **3.1.3 Research lines**

■■■■■, bone regenerative research lines are inspired by the two natural processes of bone formation in humans: these are the (vascularized) intramembranous and the endochondral routes that contribute to developmental bone formation and to bone healing (16). The flowchart depicted below illustrates our research line organization. It further highlights the translational approach from the more fundamental *in vitro* evaluations to large animal models. The present project proposal will focus on the part shown in the flowchart within the endochondral research line (outlined by red box) with experiments that will be performed in small animal models following 'go/no go' evaluation (*i.e.* confirmation of chondrogenic potential) in ■■■■■ established *in vitro* models.

### Endochondral route in the flowchart

Our *in vitro* culture models encompass *e.g.* cell aggregation into spherical cartilage tissues (pellets) and encapsulation of single cells and/or pellets in biomaterials such as hydrogels. Once chondrogenic and hypertrophic potential of the cells is confirmed in pellets or in the materials, conversion of this tissue into bone can be assessed in small animal models. The subcutaneous model can demonstrate that the construct can indeed be converted into bone tissue and the model is suitable for screening purposes. The bone forming potential in an orthotopic location (femur) can also be established in the rat.

The next steps after this project would involve preclinical testing

Following this validation, an evaluation in the clinical practice (veterinary and/or human, not shown in flowchart) will ensue.

### 3.2 Purpose

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

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

**The main aim of this proposal is to translate endochondral bone regeneration (EBR) towards a clinically relevant application.**

The main aim will be addressed by studying all relevant translational aspects of the project in our sub-aims:

#### 1) studying the effects of using [redacted] cells for EBR.

- Will [redacted] chondrogenically differentiated cells be capable of initiating EBR?
- Does the level of [redacted] between [redacted] cells and the [redacted] influence EBR?
- Will [redacted] chondrogenically differentiated cells affect EBR [redacted]?
- Which [redacted] are recruited or activated upon implantation of (chondrogenically differentiated) [redacted] cells?

#### 2) exploring the potential of devitalized cell-based constructs to induce EBR.

- Do devitalized cartilage constructs or cartilage-derived matrices have sufficient bioactivity to induce EBR?
- Does timing of devitalization affect the construct's ability to induce endochondral bone regeneration?

- Do decellularized or devitalized constructs activate [REDACTED]

**3) establishing a relevant preclinical model for EBR.**

- Does the implant [REDACTED] influence the EBR process in immunocompetent animals?
- Can we create a model for EBR that allows an increase in the number of implants per animal?

**4) evaluating the feasibility of EBR when increasing construct size.**

- Which methods for increasing construct size result in most homogeneous tissue formation?
- Can we design an implant that induces EBR also [REDACTED]

**5) characterizing the EBR potential of various cell and/or material combinations.**

- Is there an optimal combination of cells and/or materials for EBR?
- Can we use other cells than MSCs for EBR? Or MSCs from different aspiration locations?
- Which materials can stimulate EBR progression?
- When using components approved for clinical use, will EBR still be effective?
- Does donor variation affect EBR? Can we [REDACTED] in EBR?

**The aims are achievable in 5 years:**

- The main aim is achievable by addressing our sub-aims that will provide more insight in the boundary conditions under which endochondral bone regeneration is feasible. Specifically, in five years from now we 1) will know if EBR is possible [REDACTED], 2) can indicate when to devitalize a construct for EBR and if current methods eliminate construct bioactivity, 3) will have established if an [REDACTED] implant [REDACTED] will affect EBR, 4) will have more insight in how to approach the scale-up of the size of engineered constructs for efficient conversion into bone tissue, and 5) have characterized the potential of various cell and/or material combinations for EBR. Together, these achievements will bring EBR to a level where preclinical testing of favorable constructs in large animal models is possible.

- In addition to the establishment of *in vitro* models and *in vivo* models as listed under 3.1.2, [REDACTED] animal models for bone regeneration (13, 15, 17). [REDACTED] cartilage and bone regenerative strategies, both *in vitro* and *in vivo*, [REDACTED] (13, 15, 17-21). Since [REDACTED] so far, [REDACTED] s and [REDACTED] current h-index is 20.

- The [REDACTED] longstanding expertise in bone regeneration research and all equipment and infrastructure required for this project are already available (the [REDACTED] in the [REDACTED], where regenerative facilities and expertise are clustered). Further, the [REDACTED] surgeons are dedicated to contribute to research where applicable and will be involved in the surgical aspects of studies.

- [REDACTED] with other regenerative groups are essential to this project, especially the dept [REDACTED]. Further, [REDACTED] foreign labs, includin [REDACTED]

[REDACTED] will work on the project, ensuring sufficient manpower to perform the required studies. Continuous application for research funding results in regular grants enabling sustenance of our research and manpower. In total, [REDACTED] has secured over [REDACTED] funding, of which [REDACTED] in 2016. Part of the proposed studies [REDACTED] and as such accepted by international reviewers as feasible and realistic studies that can be performed within the project's time frame within the next five years.

---

### 3.3 Relevance

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

Scientific relevance:

Our strategy is to combine basic and translational research to induce effective bone restoration. This approach allows us to face the challenges that have so far hampered the clinical translation of the engineered cell-based

---

constructs, while collecting precious information about the complex mechanisms involved in bone tissue regeneration.

sub-aim 1) implantation of [REDACTED] constructs will provide us with more knowledge on the interaction of the immune system and bone formation. After this project, we will have a better idea on acceptable [REDACTED] [REDACTED] that still allow for EBR. Clinical translation of the EBR approach will benefit from this project and will start to take shape.

sub-aim 2) exploring the possibility of using cell-free or devital scaffolds could help in the identification of the biological cues that are fundamental for the regenerative process. After this project, we will have more insight in the [REDACTED] of decellularization or devitalization of our samples.

sub-aim 3) comparison of the EBR process [REDACTED] will improve our understanding of the role of the [REDACTED]. If the process is reproducible [REDACTED], a validated higher throughput model will have been established, which may eliminate the need for a complex femur defect model. This could reduce the total number of animals required for future investigations [REDACTED]

sub-aim 4) novel approaches for increasing constructs size without compromising the regenerative potential of the construct will be developed. More insight will be obtained on what effect geometrical aspects can have on the remodeling process.

sub-aim 5) the effects of bioactive and degradative properties of (bio)materials on EBR remodeling process into bone tissue will be further elucidated. Also, more knowledge will be obtained on the effects of cells alone or combined with these materials on EBR.

Taken together, these results will generate knowledge that is essential to bring bone tissue regeneration closer to clinical translation. All studies will be compiled into conference abstracts and papers to be published in respected journals in the field.

#### Social relevance:

From the perspective of the patient, a lot can potentially be gained by the proposed studies. It has been estimated that every year 2.2 million bone grafts are implanted worldwide, with a related cost of \$2.5 billion (22). Currently available treatment strategies for non-healing bone defects include autograft and allograft transplantation. Autografts represent the best alternative because of their complete immunocompatibility and their osteoconductive and osteoinductive properties. However, this solution is far from optimal. Among its drawbacks are the limited bone availability, the need of an additional surgical procedure, which is closely related to donor site morbidity and the difficulties in modelling the graft into the desired shape (4). Likewise, allograft procedures are associated with limited bone supply. In addition, these grafts are not completely immunocompatible, pose possibility of disease transmission, and the grafting materials need to undergo chemical or physical treatment, which often undermine their osteoinductive properties (4, 5).

To overcome these limitations, a bone substitute is required. Biomaterials have been developed to successfully restore bone defects in patients. However, biomaterials cover only an estimated 20% of the market as they cannot be used to restore large, challenging bone defects. Therefore, we aim to develop bone regenerative strategies.

The proposed research can impact current patient care standards. Few cell-based regenerative constructs are nowadays translated to clinical application. Here, we can advance the field by designing the construct in such a way that it is more tailored towards clinical application. More specifically:

sub-aim 1) From a translational viewpoint, [REDACTED] offers many advantages. In fact, harvesting and culture of [REDACTED] cells will cost several weeks. This will [REDACTED] [REDACTED] for obtaining the stem cells. It will also [REDACTED] the [REDACTED] of the actual reconstructive surgery [REDACTED] with differentiating cells. Finally, the [REDACTED] patients. So, the use of [REDACTED] cells would provide the option to use cells that [REDACTED], and these could also be used to treat [REDACTED] patients, [REDACTED]. However, it is unknown if [REDACTED] the bone regenerative process.

sub-aim 2) Until recently, the endochondral dogma dictated that all implanted hypertrophic cartilage cells would die and disappear following the terminal hypertrophic differentiation route. This would be an interesting



feature, especially when considering the option of creating an off-the-shelf product for endochondral bone regeneration. However, at present it is not known which is the best method for devitalization without losing the construct's bioactivity (potential to induce EBR), or at which [REDACTED] should be carried out to still ensure optimal progression of the endochondral bone regenerative process. After this project, we will know if it is feasible to create an off-the-shelf product for the clinic, offering logistical benefits for the patient and surgeon.

sub-aim 3) Establishment of appropriate, yet predictive, pre-clinical models with reduced animal numbers [REDACTED] is desirable. Furthermore, these models could serve the [REDACTED] various translational options for EBR.

sub-aim 4) So far, the feasibility of EBR was established for constructs of up to 3 mm in at least one dimension. After this project, a better understanding of potential mechanisms for scale-up will be obtained. This is an important aspect of clinical translation because larger (cm-scale) constructs will be required for the human clinic.

sub-aim 5) Determination of the capacity of material and/or cell combination to induce EBR will result in optimized constructs for clinical use.

---

### 3.4 Research strategy

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

The overall design of the project and strategies are presented in the flowchart included in section 3.1.3. Following *in vitro* validation of cell/material combinations for their chondrogenic and hypertrophic capacity, they can be evaluated for endochondral bone regeneration in the subcutaneous and/or femur model in the rat. Both models can be applied as standalone models or combined into one animal. Outside of the present project, constructs resulting in bone regeneration in the rat models can proceed to large animal models, [REDACTED] to assess bone regeneration in large defects (these models are described in [REDACTED] project 'Strategies for vascularized bone regeneration in maxillofacial surgical interventions').

#### 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.

*Screening for optimal parameters at subcutaneous locations [REDACTED] in flowchart of 3.1.3)*  
Overall, subcutaneous rodent models are required to screen for optimal construct composition in terms of cells and/or materials. The subcutaneous models offer the opportunity to reduce the overall number of animals required, as multiple samples (up to 6) can be simultaneously implanted in one animal. Although EBR was shown to take place at subcutaneous locations in immunocompromised rat models, the recapitulation of the process in immunocompetent animals [REDACTED] is largely unknown and subject to evaluation in this proposal.  
Due to the relatively high number of samples that can be implanted at this location, the subcutaneous model is attractive for screening of the most promising construct compositions resulting from the *in vitro* experiments. For example, it can be used for comparing bone regeneration for different biomaterials and/or cells, after various predifferentiation [REDACTED] or following different devitalization strategies (13, 15).  
More specifically, under general anaesthesia, up to six subcutaneous dorsal pouches will be created via 7-10 mm incisions. By limiting the total number of pouches to 6, the risk of pouch-to-pouch connection is also limited. Cartilaginous samples will be inserted into the pouches that are then intracutaneously closed by sutures. For [REDACTED] research questions [REDACTED]. To monitor bone formation, the rats will be included in the experiment for up to 12 weeks.

*Bone regeneration at orthotopic sites (box femur rat in flowchart of 3.1.3)*

Orthotopic models in mammals present a receptor site that closely mimics the natural implantation bed in the

---

human patient. These can consist of bone defects such as segmental defects in long bones (*e.g.* femur defect model in rats (23)). Bone regeneration in terms of bone union of the defect edges can be studied in these models. Here, a segmental femur defect model in rats can be used following subcutaneous optimization of the construct properties. This model represents a critical size defect, meaning that the defect will not heal by itself over time. More specifically, under general anaesthesia the femur will be exposed and a fixator will be screwed onto the bone. A segment of 5-6 mm will be sawed and removed. Here an implant or control will be inserted before closure of the tissue layers. Also, here, depending on the research question, [REDACTED]

[REDACTED] To monitor bone formation, the rats will be included in the experiment for up to 12 weeks.

The bone defect models could be combined with subcutaneous implantations where applicable to reduce the total amount of animals required.

*Readouts*

The *in vivo* responses in terms of bone formation can be monitored by micro-CT imaging in the rat models. For rats, fluorochrome injections can be an additional means to assess bone formation at various intervals during the experimental period without euthanizing animal at every time point (24). Further, to investigate the presence of inflammation [REDACTED] in an experiment, blood will be sampled regularly (for analysis of inflammatory markers via ELISA and of the nucleated-cell component via FACS). All other readouts (including end point micro-CT, immunohistochemistry of tissue development and [REDACTED] and gene expression analysis) are obtained post-mortem.

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

The coherence has been detailed in section 3.1.3 beneath the flowchart. Briefly, all translational questions described in our sub-aims will be addressed in the subcutaneous and/or femur model in the rat. Once novel cell and/or material combinations have resulted in successful chondrogenesis in our established *in vitro* models, validation of endochondral potential can be performed in either rat model. For example, [REDACTED] [REDACTED] have been characterized for their chondrogenic potential in our *in vitro* assays, they can be included in the [REDACTED] experiments as under sub-aim 1.

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

| Serial number | Type of animal procedure                                 |
|---------------|--|
| 1             | Subcutaneous construct implantation in rats              |
| 2             | Subcutaneous + orthotopic construct implantation in rats |
| 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](http://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'. | 11500                    |   |
| 1.2 Provide the name of the licenced establishment.  | UMC Utrecht              |   |
| 1.3 List the serial number and type of animal procedure.   | Serial number<br>3.4.4.1 | Type of animal procedure<br>Subcutaneous construct implantation in rats |

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.

##### *Experimental approach:*

The aim of this project is to develop strategies to improve the characteristics of the currently available bone substitutes. Since different cell types, scaffold materials and growth factors will be optimized and combined in different ways, a screening of the most promising conditions needs to be performed. Subcutaneous pouches are the ideal model as they have been reported to be an adequate model to evaluate ectopic bone formation [13,15]. Besides, the model allows for the screening of several conditions at the same time, reducing the required amount of animals to a minimum. Further, the independence of the individual pouches will be maximized by limiting the total number of pouches to be created to six and by making one incision to form each pouch.

During the surgery, a maximum of six subcutaneous dorsal pouches will be created per rat. This model will be used for the subaims of the project (sub-aim 1 is not included as this is in the femur model, appendix 1.3-2):

- *Sub-aim 2:* exploring the potential of devitalized cell-based constructs to induce EBR
- *Sub-aim 3:* establishing a relevant preclinical model for EBR
- *Sub-aim 4:* evaluating the feasibility of EBR when increasing construct size
- *Sub-aim 5:* characterizing the EBR potential of various cell and/or material combinations

The criteria that need to be met *in vitro* before moving to this *in vivo* model are described in section 3.1.3 of the project description. The [redacted] will be chosen according to the specific research question, e.g. implantation of [redacted]

##### *Outcomes:*

Primary outcome measures

- For all the subaims the evaluation of ectopic bone formation *in vivo* will be the primary outcome. It will be assessed by microCT analysis, both at early and late timepoints.

#### Secondary outcome measures

- Bone formation: Fluorochrome labels might be administered at different timepoints after the implantation to establish the onset of bone formation. After the explantation, *ex vivo* analysis will be performed to complement the information obtained with the microCT. In particular, bone content and remodelling will be evaluated via histological and immunohistochemical analysis (e.g. H&E, safranin-O, TRAP staining, collagen type I).
- [REDACTED]: After explantation of the constructs, histological and immunohistochemical analysis will be performed to evaluate [REDACTED]. To prevent interference, the six pockets will be created performing six singular incisions, one for each implant. Further, previous studies already proved that the distance between pockets is sufficient to prevent interactions [13,15].

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

#### Animal procedures [13,15]

The animals are allowed at least one week of acclimatization before the start of the experiment. Open or filter top [REDACTED] cages will be selected according to the rat strain that is used and will be specified in the work protocol. The rats will always be housed in pairs, except for up to 3 days after the operation to allow for wound healing. The animals will be maintained on rodent chow and water *ad libitum*.

#### Anaesthesia protocol

All operations will be performed under adequate anaesthesia.

#### Pain management

Analgesia is provided by a subcutaneous injection of pain medication, before surgery and daily until 3 days after surgery.

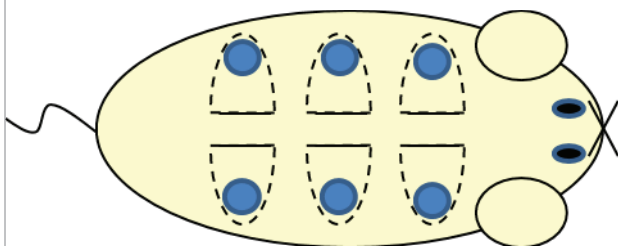
#### Antiseptic techniques

All operations will be performed under aseptic conditions. The surgeon will wear scrubs, gown, surgical mask, head cover and gloves. After shaving, the skin will be disinfected with ethanol and the surgical site will be draped. To reduce perioperative infection risk, all rats receive a dose of antibiotics before surgery. All the surgical equipment will be sterilize before the surgery.

#### Surgical technique

As shown in the figure below, a maximum of 6 dorsal pockets (dotted lines) are created, each by blunt dissection through one skin incision (from 7 to 10 mm, solid black lines at pocket) and filled with one implant (blue circles). The skin will be closed transcutaneously with resorbable sutures.

Total operation time per animal: 30 minutes



#### Postoperative care

The animals are postoperatively treated with the analgesic as previously described. In case of failing sutures in unclosed wet wounds, the wound will be cleaned, debrided and re-sutured under adequate anaesthesia. The wounds will be examined daily for three days following surgery, thereafter weekly.

#### Bone regeneration measurements

Where applicable, fluorochromes will be administered by subcutaneous injection. For the *in vivo* bone formation analysis by microCT, rats are sedated using proper anaesthesia.

Total handling time per animal: 15 minutes

#### Euthanasia protocols

The rats will be euthanized according one of the methods listed in the appendix IV of directive 2010/63/EU. Methods will be selected based on their influence on vascular interference and compatibility with MICROFIL injection. The implants will be retrieved afterwards.

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

The required amount of animals has been selected based on previously published studies [13,15].

– Sub-aims 2, 3, 4 and 5:

The criteria required to start an *in vivo* experiment using this model are described in section 3.1.3 of the project proposal. Here a schematic representation of the variables that are taken into account in this aim.

| <b>Variables</b>  |   |  |
|---|---|--|
| <b>1) Biomaterials</b> (e.g. hydrogels, decellularized tissues) | <b>2) Progenitor cells</b> (e.g. chondroprogenitors, <span style="background-color: black; color: black;">XXXXXXXXXX</span> mesenchymal stem cells) | <b>3) Growth factors</b> (e.g. chemoattractants, TGF $\beta$ , BMPs) |

In a typical experiment, these three variables are combined. For example, in an experiment based on the 3 listed variables a maximum of four different groups, including the controls conditions can be made (biomaterial only, biomaterial + progenitor cells, biomaterial + growth factor, biomaterial + progenitor cells+ growth factor). Two additional groups can be added in case sub-variables are included (e.g. two different progenitor cells type or two different growth factor concentration). Therefore, in each experiment, 4 to 6 different experimental conditions and controls can be included.

Based on previously published studies [13,15] the power analysis has been performed using an online tool (<http://homepage.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/>). For the statistical analysis a one-way anova with Tukey/HSD post hoc correction has been performed. A sample size of maximum 6 implants per condition was defined to be able to detect a contrast of 30% with a power of 82%, a standard deviation of 0.13 and  $\alpha=0.05$ .

Based on this sample size, a maximum amount of constructs per experiment can be determined: 4 to 6 conditions \* 6 (n)= 24 to 36 implants in total per experiment.

Number of animals required: 24 to 36 implants/ 6 implants per rat= 4-6 rats per experiment, considering a drop out of 5% of the implants (based on previous experience), 2 to 3 extra pockets might be required. For this reason a maximum of 5 to 7 animals are required per experiment.

The basic format of one experiment as outlined above will be repeated for different biomaterials (e.g. different decellularization protocols), cell types or stimuli. Further, the construct sized can be tuned in order to evaluate the feasibility of scaling up the constructs for EBR. As part of our ongoing research we expect to discover 1-2 promising new variables each year that will have completed the *in vitro* evaluations and have passed the go/no go criteria. So in total, for a five year period we would need to perform a maximum of 10 experiments, involving 5-7 rats each. This would amount to a total number of 70 rats. Furthermore, the exact amount of animals per experiment will be defined consulting a statistician and the animal welfare body and it will be specified in the work protocol.

Total number of animals required for this project (including the drop out rate): 70

## B. The animals

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

A total of 70 animals is required. The appropriate [REDACTED] will be chosen according to the [REDACTED] graft that is implanted during the experiment (e.g. biomaterial only [REDACTED] constructs) and they will be purchased from a registered breeder (e.g. Charles River). To have sufficient space between the pouches and avoid potential interference, skeletally mature rats are required. For this reason, only rats older than 12 weeks at the time of implantation will be used. Further, male and female rats show differences in bone metabolism [26,27], the use of a mixed population will cause a stronger increase in the observed variance. Since estrogen levels in female rats depend on stress and age [28] and can affect bone regeneration [29,30], male rats have been identified as the most suitable model.

*Sub-aims 2,3,4 and 5:*

- Male rats older than 12 weeks selected from an [REDACTED] colony (e.g. Wistar) will be used when a broad screening is required. These rats are a suitable screening model for the analysis [REDACTED] and to test tissue regeneration in a cell-free approach.
- Male rats older than 12 weeks selected from an [REDACTED] strain (e.g Fischer 344, Brown Norway or Lewis) will be used when [REDACTED] bone marrow derived stem cells needs to be performed. Further, less variation can be expected when this animal model is used, compared to [REDACTED]. For this reason, valuable information can be collected using [REDACTED] during the screening phase.
- Male rats older than 12 weeks selected from an [REDACTED] nude strain (RH-Foxn1<sup>rnu</sup> rats) will be used when [REDACTED] animals are required, as [REDACTED] will be implanted (e.g. [REDACTED]).

## C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

## D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement

No *in vitro* options are currently available to fully recapitulate the complexity of new bone formation or the combination of all the players involved in new tissue vascularization. Further [REDACTED] [REDACTED] engineered bone substitutes are implanted is of pivotal interest for clinical translation. For this reason, the use of an animal model is a necessity in order to test the regenerative potential of the developed constructs.

Reduction

The available *in vitro* methods to pre-screen cell behavior and cytocompatibility of the constructs will be part of the evaluations before progressing to animal studies, as shown in the flow chart in the appendix. This will ensure that only a promising selection of constructs will progress to the stage of implantation, thus reducing the number of animals used. By performing the first screening in a subcutaneous model, fewer animals are required

during the optimization process. Furthermore, 6 different conditions can be tested in one animal. In this way, only the promising substitutes will be tested in an orthotopic defect model (one per animal).

#### Refinement

- Subcutaneous model has been selected as an ideal model for this first screening phase because it allows to evaluate the regenerative potential of the implants (evaluating the ectopic bone formation). At the same time, it allows to compare multiple conditions within an animal, reducing the total amount of rats required.
- *In vivo* bone formation analysis will be performed using a microCT under adequate anaesthesia.
- Follow-up will be daily for one week after surgery, after that a minimum of one time weekly.
- The researches will be trained in order to perform the implantation as atraumatic as possible.

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

To reduce animal fear, the researcher will get the animals used to their presence, practicing the handling procedures before the surgery. During surgery, respiration will be observed continuously and both before and after surgery the animals will be placed on a heating mat. The rats will be returned to routine housing after they have recovered from anaesthesia and paired once the wounds are closed. Standard housing conditions will be allowed post-op.

## Repetition and duplication

### E. Repetition

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

N.A.

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

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

No

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

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

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

## Classification of discomfort/humane endpoints

### H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.



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

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

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

Analgesia is provided by a subcutaneous injection of pain medication, before surgery and twice per day until 3 days after surgery. Where applicable, additional local analgesics might be used. Adequate anaesthesia will be provided during the surgery and whenever required (*e.g.* during microCT scan)

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

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

Adverse events:

1) Skin irritation due to subcutaneous injections: mild (expected occurrence based on previous experiences: 5-10%)

2) Rats might bite and remove the stitches before the wounds are completely closed: mild, might cause irritation and a delay in wound closure (expected occurrence based on previous experiences: 5%)

3) Infection might occur at the surgical site: mild to moderate according to the infection (expected occurrence based on previous experiences: 1%)

Explain why these effects may emerge.

It has been observed that the animals might show some irritation due to the subcutaneous injections, especially when fluorochromes are used to assess bone formation. If this is the case, a different location will be used for the following injections. Rats might also bite and remove the sutures before the wounds are completely closed. This might cause a delay in wound closure and/or infection. In case of failing sutures in unclosed wet wounds, the wound will be cleaned, debrided and re-sutured under adequate anaesthesia. Only in case of fall of the implant outside the pocket, the sample will be excluded. The other pockets from the same animals will still be included, unless the human end-point has been reached.

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

Animal's breathing will be regularly checked during and after surgery and every time anaesthesia is induced. The adequate depth of narcosis will be monitored by observing the animal's respiration and testing whether the animal is still awake before starting any procedure. Animals will be housed singularly for up to 3 days after the surgery to allow full wound closure. Tools used during the surgery are sterile, to prevent an infection to occur.

### **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.

Rats will be closely monitored on general well being. If abnormalities are observed, the veterinarian will be consulted, and based on the severity of discomfort the animal will be euthanized.

Complications that have been observed with this model in the past:

- Rarely, after implantation, a local infection occurs.
- Also, irritation after injections may occur.
- Rats might chew on sutures and/or implanted samples

The animal will be euthanized if scoring  $\geq 2$  in the following list: infection of surgical sites (2), visible spine or ribcage (2), panting (1), salivation (1), immobility (2), persistent tremors (2), persistent convulsions (2), self-



mutilation (2), pilo erection (2), abnormal posture (1).

Furthermore, the weight of the animals will be closely monitored and will be used as an additional indicator of animal (dis)comfort. A relevant unacceptable weight loss within a few days in comparison to its peers will be considered a humane endpoint.

Indicate the likely incidence.

5%

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

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

Expected discomfort:

- 1) Animal discomfort due to the eventual presence of filter top cages: mild
- 2) Animal discomfort due to the handling: mild
- 3) Animal discomfort due to the subcutaneous injections: mild
- 4) Animal discomfort due to the surgery: moderate
- 5) Animal discomfort due to the anaesthetic induction: mild
- 6) Animal discomfort and pain postoperatively due to the bone substitute implantation with adequate pain medication: mild
- 7) Animal discomfort due to the euthanasia under anaesthesia: mild

Cumulative discomfort:

moderate

### **End of experiment**

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

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

The implanted constructs need to be explanted for further analysis.

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

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

Yes



## Appendix

### Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website ([www.centralecommissiedierproeven.nl](http://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'.  | 11500                    |  |
| 1.2 Provide the name of the licenced establishment.   | UMC Utrecht              |  |
| 1.3 List the serial number and type of animal procedure.<br><br><i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i> | Serial number<br>3.4.4.2 | Type of animal procedure<br>Subcutaneous + orthotopic construct implantation in rats |

#### 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.

###### *Experimental approach:*

The surgical procedure can include maximal two different types of defect per animal:

- 1) a six millimetre unilateral femoral defect (orthotopic defect)
- 2) a maximum of six subcutaneous dorsal pouches (ectopic defect)

The analysis of tissue engineered construct performance in an orthotopic defect is of pivotal interest as it allows evaluation of bone regeneration in a surgical site that closely mimics the clinical situation. To screen for optimal construct composition and bone tissue formation at ectopic locations, implantation of samples in subcutaneous pouches can be added to the model. The relevance of the subcutaneous model has been discussed previously in appendix 3.4.4.1.

The two defect types will be introduced during the same surgical session, without requiring an additional anaesthetic procedure. This will reduce the discomfort of the animal.

This model will be used for all the 5 sub-aims of the project " Cartilage-based strategies for bone regeneration in maxillofacial surgical interventions".

The criteria that need to be met before moving to this *in vivo* model are described in the flow chart in the section 3.1.3. The required [REDACTED] will be chosen according to the need to implant [REDACTED] and to the specific research question.

###### *Outcomes:*

Primary outcome measures:

- The evaluation of bone regeneration will be the primary outcome. *In vivo* bone formation will be

assessed by microCT analysis.

Secondary outcome measures:

- Bone formation: Fluorochrome labels might be administered on different timepoints after the implantation to establish the onset of bone formation. After the explantation, *ex vivo* analysis will be performed to complement the information obtained with the microCT. In particular, bone content and remodelling will be evaluated via histological and immunohistochemical analysis (e.g. H&E, safranin-O, TRAP staining, collagen type I).
- [REDACTED] will be monitored by regular sampling of blood from the tail vein (max 1 ml per week). The serum and plasma will be used to evaluate the cellular component of the [REDACTED] (e.g. specific markers for [REDACTED] or evaluation the total [REDACTED] and [REDACTED] (e.g. [REDACTED]). This parameter will be considered only when no subcutaneous pockets will be added to the unilateral femoral defect. Further, after explantation of the constructs, histological and immunohistochemical analysis will be performed [REDACTED]

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

Animal procedures [13,15,23]

The animals are allowed at least one week of acclimatization before the start of the experiment. Open of filter top cages will be selected according to the rat strain that it is used and will be specified in the work protocol (e.g. [REDACTED] will be used in case of [REDACTED]). The rats will be always housed in pairs, beside up to 3 days after the operation to allow the wounds healing. The animals will be maintained on rodent chow and water ad libitum.

Anesthesia protocol

All operations will be performed under adequate anaesthesia.

Pain management

Analgesia is provided by a subcutaneous injection of pain medication, before surgery and daily until 3 days after the surgery.

Antiseptic techniques

All operations will be performed aseptically. The surgeon will wear gown, surgical mask, head cover and gloves. After shaving, the skin will be disinfected with ethanol and surgical site will be draped. To reduce perioperative infection risk, all rats receive a single dose of antibiotics before surgery. All the surgical equipment will be sterilize before the surgery.

Surgical technique

Unilateral orthotopic defect: The surgical procedure has already been successfully performed and was described in detail previously [23]. Briefly, the femur is exposed through a lateral incision of the skin and division of the underlying fascia. A plate is fixed to the anterolateral plane of the femur using three proximal and three distal screws. Periosteum is removed over approximately 8 mm of the mid-diaphyseal region before removal of 6 mm cortical bone. Bone will be removed with a tailor-made saw guide and a wire and the bone substitute is placed press-fit into the defect site. After insertion of the implant into the defect, the fascia and skin are sutured in layers using resorbable sutures.

Total operation time per animal: 45 minutes-1 hour

Subcutaneous defect: A maximum of 6 dorsal pouches are each created by blunt dissection (from 7 to 10 mm) through one skin incision and filled with one implant. The skin will be closed transcutaneously with resorbable sutures. See appendix 3.4.4.1 for more details.

Total operation time per animal: additional 15-30 minutes

Postoperative care

The rats are postoperatively treated with the analgesic as previously described. They will be housed separately until wounds are closed (typically 1-3 days). After, they will be housed in pairs, keeping the same pairs before

and after surgery. In case of failing sutures, the wound will be cleaned, trimmed and re-sutured under adequate anaesthesia. They will be examined and weighed daily for three days following surgery, thereafter weekly.

#### Bone regeneration measurements

Where applicable, fluorochromes will be administered by subcutaneous injection. For the *in vivo* bone formation analysis by microCT, rats are sedated using proper anaesthesia. When required, blood samples will be collected from the tail vein (max 1ml per week) before scanning, while the rats are already under anaesthesia. This will reduce the animal discomfort.

Total handling time per animal: 15 minutes for the microCT + 15 additional minutes in case of blood sampling

#### Euthanasia protocols

The rats will be euthanized according one of the methods listed in the appendix IV of directive 2010/63/EU. The implants will be retrieved afterwards.

In case the [REDACTED] required [REDACTED] when [REDACTED] are performed can not be purchased, the isolation will be performed by the researcher using an already established protocol [25]. The animals will be euthanized according one of the methods listed in the appendix IV of directive 2010/63/EU (usually CO<sub>2</sub> asphyxiation) prior to femur and tibia harvest for mesenchymal stem cells isolation.

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

The required amount of animals has been selected based on a previously published study [23].

- *Subaim 1: studying the effects of [REDACTED] for EBR*

The go/no go criteria that need to be met to use this model are described in the section 3.1.3 of the project proposal. Here a schematic representation of the variables is presented that are taken into account in this aim:

| Variables  | Control Conditions |
|------------|--------------------|
| [REDACTED] | Carrier            |

In a typical experiment, the three variables displayed above can be combined with a maximum of two control conditions. Therefore, in each experiment, a maximum of 5 different conditions will be included. Further, a total of two different time points, one early and one late, can be selected.

The primary output parameter is bone regeneration. Based on previously published studies [23] and [REDACTED], a power analysis has been performed using an online tool (<http://homepage.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/>). For the statistical analysis a one-way anova with Tukey/HSD post hoc correction has been performed. A sample size of 9 implants per condition was defined to be required to detect a contrast of 30% with a power of 80%, a standard deviation of 0.17 (based on [20]) and  $\alpha=0.05$ .

Based on this sample size, a maximum amount of constructs per experiment can be determined: 5 conditions \* 9 (n)= 45 implants in total per experiment.

Number of animals required: 45 implants/ 1 implant per rat= 45 rat per experiment, considering a drop out of 10% of the implants (based on previous experience), 5 extra animals are required per experiment.

To understand whether the bone formation at 12 weeks is correlated to [REDACTED] an early timepoint at week 1 is included. This

is a different, secondary outcome measure and as such has a different power calculation. A power analysis based on the values [REDACTED] obtained during a pilot study (unpublished data) has been carried out. In particular, performing a one-way anova with a Tukey/HSD post hoc correction, a contrast of 31.5% can be detected with a power of 79%, a standard deviation of 0.13 and  $\alpha=0.05$  when the sample size is 5 rats.

Based on this sample size, a maximum amount of constructs per experiment can be determined: 5 conditions \* 5 (n)= 25 implants in total per experiment.

Number of animals required: 25 implants/ 1 implant per rat= 25 rat per experiment, considering a drop out of 10% of the implants (based on previous experience), 3 extra animals are required per experiment.

Further, the difference in [REDACTED] to the implant will be evaluated qualitatively through histology [REDACTED]

We expect to perform the basic format of one experiment as outlined above twice in the five year period. Therefore, in total, for a five year period we would need a maximum total number of 156 rats. The exact amount of animals per experiment will be defined consulting a statistician and the animal welfare body and it will be specified in the work protocol.

- *Sub-aims 2 and 3: exploring the potential of devitalized cell-based constructs to induce EBR and establishing a relevant preclinical model for EBR*

The go/no go criteria that need to be met to use this model are described in the section 3.1.3 of the project proposal. Here a schematic representation of the possible variables is presented that are taken into account in this aim:

| <b>Variables</b>           |                             | <b>Control Conditions</b> |                            |
|----------------------------|-----------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Devitalization timepoint I | Devitalization timepoint II | Vital implant timepoint I | Vital implant timepoint II |

For *sub-aim 3* the results obtained in [REDACTED] will be compared with [REDACTED]. The sample size has been calculated considering the orthotopic defects as the limiting element, since it is possible to create a single femoral defect per animal but up to 6 subcutaneous pockets.

Comparably to *sub-aim 1*, the primary outcome is bone formation. In each experiment, 4 different experimental conditions and controls can be included. Based on a previously published study [23] and [REDACTED], a power analysis has been performed using an online tool (<http://homepage.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/>). For the statistical analysis, a one-way anova with Tukey/HSD post hoc correction was assumed for the power calculations. A sample size of 9 implants per condition is required for our desired detection of a contrast of 30%, with a power of 84%, a standard deviation of 0.17 (for microCT outcome in study [3]) and  $\alpha=0.05$ . Based on this sample size, a maximum amount of constructs per experiment can be determined: 4 conditions \* 9 (n)= 36 implants in total per experiment.

Number of animals required: 36 implants/ 1 implant per rat= 36 rat per experiment, considering a drop out of 10% of the implants (based on previous experience), 4 extra animals are required per experiment.

We expect to perform the basic format of one experiment as outlined above maximum twice in the five year period. Therefore, in total, for a five year period we would need a maximum total number of 80 rats. Since *sub-aims 2 and 3* can be tested within the same experimental setting (*e.g.* implanting in subcutaneous pockets the same construct tested in the femur defect), no additional animals are required. The exact amount of animals per experiment will be defined consulting a statistician and the animal welfare body and it will be specified in the work protocol.

- *Sub-aims 4 and 5: evaluating the feasibility of EBR when increasing construct size and characterizing the EBR potential of various cell and/or material combinations*

The go/no go criteria that need to be met to use this model are described in the section 3.1.3 of the project proposal. Here a schematic representation of the variables is presented that are taken into account in this aim:

| <b>Variables</b>  |   |  |
|---|---|--|
| <b>1) Biomaterials</b> (e.g. hydrogels, decellularized tissues) | <b>2) Progenitor cells</b> (e.g. chondroprogenitors, <span style="background-color: black; color: black;">[REDACTED]</span> mesenchymal stem cells) | <b>3) Growth factors</b> (e.g. chemoattractants, TGF $\beta$ , BMPs) |

The sample size has been calculated considering the orthotopic defects as the limiting element, since it is possible to create a single femoral defect per animal but up to 6 subcutaneous pockets. In a typical experiment, the three variables in the table are combined. For example, in an experiment based on the 3 listed variables, a maximum of four different groups, including the control condition can be made (biomaterial only, biomaterial + progenitor cells, biomaterial + growth factor, biomaterial + progenitor cells+ growth factor). Therefore, in each experiment, 4 different experimental conditions and controls can be included.

Based on a previously published study [23] and on a pilot previously performed [REDACTED], a power analysis has been performed using an online tool (<http://homepage.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/>). For the statistical analysis, a one-way anova with Tukey/HSD post hoc correction was assumed for the power calculations. A sample size of 9 implants per condition is required for our desired detection of a contrast of 30%, with a power of 84%, a standard deviation of 0.17 (for microCT outcome in study [3]) and  $\alpha=0.05$ .

Based on this sample size, a maximum amount of constructs per experiment can be determined: 4 conditions \* 9 (n)= 36 implants in total per experiment.

Number of animals required: 36 implants/ 1 implant per rat= 36 rats per experiment, considering a drop out of 10% of the implants (based on previous experience), 4 extra animals are required per experiment.

The basic format of one experiment as outlined above will be repeated for different biomaterials (e.g. different decellularization protocols), cell types or stimuli. We expect to develop a variable every year that could be considered for *in vivo* testing. So in total, for a five year period we would need to perform a maximum of 5 experiments, involving 40 rats each (for calculation, please see the one under *subaim 4 and 5*). This would amount to a total number of 200 rats. Furthermore, the exact amount of animals per experiment will be defined consulting a statistician and the animal welfare body and it will be specified in the work protocol.

In case the [REDACTED] can not be purchased, an isolation procedure is required. Based on previous experience [25], 10 femurs are required to isolate enough cells to perform the experiments listed in *subaim 1*. This calculation has been based on the average number of cells that can be isolated from a single femur and the total cell yield that can be achieved after the *in vitro* expansion of the primary isolated cells. In case [REDACTED], 20 femurs will be required. As both femurs from one animal can be used for this procedure, 10 extra rats could be required for stem cell isolation.

Total number of animals required for this project (including the estimated drop-out rates): 446 (156+80+200+10)

## B. The animals

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

A total of 446 animals is required. The appropriate animal strain will be chosen according [redacted] during the experiment (e.g. biomaterial only [redacted] constructs) and they will be purchased from a registered breeder (e.g. Charles River). To avoid loosening of the fixation femur plate due to the growing of the rats, skeletally mature animals are required. For this reason, only rats older than 12 weeks at the time of implantation will be used. In addition, male rats are preferred, as the smaller size of female rats increases the difficulties of the surgical procedure. Further, male and female rats show differences in bone metabolism [26,27], the use of a mixed population will cause an increase in the observed variance. Since estrogen levels in female rats depend on stress and age [28] and can affect bone regeneration [29,30], male rats have been identified as the most suitable model.

*Sub-aim 1:*

- Male rats older than 12 weeks selected from an [redacted] rat strain (e.g. Fischer 344, Brown Norway or Lewis) will be used. [redacted] animals are known to be suitable for the [redacted] transplantation, as there will be [redacted] [31]. To study the [redacted] rats will be used [redacted]
- Male rats older than 12 to 16 weeks selected from an [redacted] nude strain (RH-Foxn1rnu rats) will be used when [redacted] animals are required. They will be eventually used as positive control, as it has already been proved that bone tissue regeneration or ectopic bone formation occurs in this model [redacted] [15,23]

*Sub-aims 2,3,4 and 5:*

- Male rats older than 12 weeks selected from an [redacted] rat strain (e.g. Fischer 344, Brown Norway or Lewis) will be used. These rats have been identified as a suitable, reliable and reproducible model when [redacted] are needed.
- Male rats older than 12 weeks selected from an [redacted] nude strain (RH-Foxn1rnu rats) will be used when [redacted] animals are required. This model is the best option if the influence of the [redacted] is not the main research question when [redacted] are implanted.

**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

No *in vitro* options are currently available to fully recapitulate the complexity of new bone formation or the combination of all the players involved in the immune reaction. For this reason, the use of an animal model is fundamental in order to test the regenerative potential of the developed constructs.

Reduction

The available *in vitro* methods to confirm chondrogenesis and hypertrophy of the constructs and the results obtained in the rat models will be part of the evaluations before progressing to large animal studies, as shown in the flow chart in 3.1.3. This will ensure that only a promising selection of constructs will progress to the stage of implantation, thus reducing the number of animals used. Further, by combining the femoral defect study with



additional subcutaneous implants, fewer animals are used to make a more efficient comparison of various parameters.

#### Refinement

- The unilateral critical size defect model has been selected as an ideal model for evaluation of bone tissue regeneration, as it will allow implantation at the orthotopic location, which is relevant due to its resemblance to the clinical setting. In fact, also in the intended future human surgical procedure, the implanted construct will be in direct contact with the patient's bone edges.
- *In vivo* bone formation analysis will be performed using a microCT under adequate anaesthesia.
- Follow-up will be daily for one week after surgery, after that a minimum of one time weekly.
- The researches will be trained in order to perform the implantation as atraumatic as possible.

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

To reduce animal fear, the animals will get used to the researcher and to the handling procedure before the surgery. During surgery, respiration will be observed continuously and both before and after surgery the animals will be placed on a heating mat. The rats will be returned to routine housing after they have recovered from anaesthesia and paired once the wounds are closed. Standard housing conditions will be allowed post-op.

## Repetition and duplication

### E. Repetition

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

N.A.

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

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

No

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

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

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

## Classification of discomfort/humane endpoints

### H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.



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

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

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

Analgesia is provided by a subcutaneous injection of pain medication, before surgery and twice per day until 3 days after surgery. Where applicable, additional local analgesics might be used. Adequate anaesthesia will be provided during the surgery and every time needed (*e.g* during microCT scan).

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

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

Adverse events:

- 1) Skin irritation due to subcutaneous injections: mild (expected occurrence based on previous experiences: 5-10%)
- 2) Removal of the stitches before the wounds are completely closed: mild, might cause irritation and a delay in wounds closure (expected occurrence based on previous experiences: 5%)
- 3) Infection might occur at the surgical site: mild to moderate according to the infection (expected occurrence based on previous experiences: 5%)
- 4) PEEK plate failure: moderate pain, reducing the mobility of the animal (expected occurrence based on previous experiences: 10%)
- 5) Damage of the tail in case of repeated attempt to obtain blood samples from the tail vein (expected occurrence based on previous experiences: 5%)

Explain why these effects may emerge.

It has been reported before that several subcutaneous injection might cause skin irritation, especially when fluorochromes are used to assess bone formation. If this will be the case, a different location will be used for the following injections. Rats might also bite and remove the sutures before the wounds are completely closed. This might cause a delay in wound closure and/or infection. In case of failing sutures in unclosed wet wounds, the wound will be cleaned, debrided and re-sutured under adequate anaesthesia. Further, as the rat's movement is not restricted after the surgery to prevent unnecessary discomfort, a failure of the PEEK plate might occur (<10%). To reduce to the minimum the possibility this adverse event might occur, 3 proximal and 3 distal screws will be used to stabilize the defect site.

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

Animals will be regularly checked both during and after the surgery and every time anaesthesia is induced. The adequate depth of narcosis will be guaranteed observing the animal respiration and testing whether the animal is still awake before starting any procedure. Animals will be housed singularly for up to 3 days after the surgery to allow the wounds closure. If an unexpected adverse event will occur, the adequate actions will be taken (see the section below). To avoid infections, all the surgical tools will be sterilized and the surgery will take place in aseptic conditions (see above). Finally, to avoid damage of the tail, a maximum of 3 attempts per timepoint can be performed in order to obtain the blood samples.

### **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.

Rats will be closely monitored on general well being. If abnormalities are observed, the veterinarian will be consulted, and based on the severity of discomfort the animal will be euthanized.

Complications that have been observed with this model in the past:

- Rarely, after implantation, a local infection occurs.
- Also, irritation after injections may occur.
- Rats might chew on sutures and/or implanted samples

- PEEK plate failure

Seldom, after implantation, the femoral fixation plate might loosen or a local infection might occur. The animal will be euthanized if scoring  $\geq 2$  in the following list: infection of surgical sites (2), visible spine or ribcage (2), panting (1), salivation (1), immobility (2), persistent tremors (2), persistent convulsions (2), self-mutilation (2), pilo erection (2), abnormal posture (1).

Furthermore, the weight of the animals will be closely monitored and will be used as an additional indicator of animal (dis)comfort. A relevant unacceptable weight loss within a few days in comparison to its peers will be considered a humane endpoint.

Indicate the likely incidence.

Very unlikely (<10%)

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

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

Expected discomfort:

- 1) Animal discomfort due to the eventual presence of filter top cages: mild
- 3) Animal discomfort due to the handling: mild
- 4) Animal discomfort due to the subcutaneous injections: mild
- 5) Animal discomfort due to the surgery: moderate
- 6) Animal discomfort due to the anaesthetic induction with isoflurane: mild
- 7) Animal discomfort and pain postoperatively due to the bone substitute implantation with adequate pain medication: mild to moderate
- 8) Animal discomfort after blood sampling: mild
- 9) Animal discomfort due to microCT scan under anaesthesia: mild
- 10) Animal discomfort due to the euthanasia under anaesthesia: mild

Cumulative discomfort:

Moderate

### **End of experiment**

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

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

The implanted constructs need to be explanted for further analysis.

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

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

Yes

**Reference list:**

1. Van Heest A, Swiontkowski M. Bone-graft substitutes. *The Lancet*. 1999;353:S28-S9.
2. Ludwig SC, Boden SD. Osteoinductive bone graft substitutes for spinal fusion: a basic science summary. *Orthop Clin North Am*. 1999;30(4):635-45.
3. Liu Y, Lim J, Teoh S-H. Review: Development of clinically relevant scaffolds for vascularised bone tissue engineering. *Biotechnology Advances*. 2013;31(5):688-705.
4. Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: An update. *Injury*. 2005;36(3, Supplement):S20-S7.
5. Conrad EU, Gretch DR, Obermeyer KR, Moogk MS, Sayers M, Wilson JJ, et al. Transmission of the hepatitis-C virus by tissue transplantation. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 1995;77(2):214-24.
6. Mackie EJ, Ahmed YA, Tatarczuch L, Chen KS, Mirams M. Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008;40(1):46-62.
7. Gawlitta D, Farrell E, Malda J, Creemers LB, Alblas J, Dhert WJ. Modulating endochondral ossification of multipotent stromal cells for bone regeneration. *Tissue engineering Part B, Reviews*. 2010;16(4):385-95.
8. Farrell E, van der Jagt OP, Koevoet W, Kops N, van Manen CJ, Hellingman CA, et al. Chondrogenic priming of human bone marrow stromal cells: a better route to bone repair? *Tissue Eng Part C Methods*. 2009;15(2):285-95.
9. Janicki P, Kasten P, Kleinschmidt K, Luginbuehl R, Richter W. Chondrogenic pre-induction of human mesenchymal stem cells on beta-TCP: enhanced bone quality by endochondral heterotopic bone formation. *Acta Biomater*. 2010;6(8):3292-301.
10. Jukes JM, Both SK, Leusink A, Sterk LM, van Blitterswijk CA, de Boer J. Endochondral bone tissue engineering using embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(19):6840-5.
11. Pelttari K, Winter A, Steck E, Goetzke K, Hennig T, Ochs BG, et al. Premature induction of hypertrophy during in vitro chondrogenesis of human mesenchymal stem cells correlates with calcification and vascular invasion after ectopic transplantation in SCID mice. *Arthritis and rheumatism*. 2006;54(10):3254-66.
12. Scotti C, Tonnarelli B, Papadimitropoulos A, Scherberich A, Schaeren S, Schauerte A, et al. Recapitulation of endochondral bone formation using human adult mesenchymal stem cells as a paradigm for developmental engineering. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(16):7251-6.
13. Gawlitta D, Benders KE, Visser J, van der Sar AS, Kempen DH, Theyse LF, et al. Decellularized cartilage-derived matrix as substrate for endochondral bone regeneration. *Tissue engineering Part A*. 2015;21(3-4):694-703.
14. Farrell E, Both SK, Odorfer KI, Koevoet W, Kops N, O'Brien FJ, et al. In-vivo generation of bone via endochondral ossification by in-vitro chondrogenic priming of adult human and rat mesenchymal stem cells. *BMC Musculoskelet Disord*. 2011;12:31.
15. Visser J, Gawlitta D, Benders KE, Toma SM, Pouran B, van Weeren PR, et al. Endochondral bone formation in gelatin methacrylamide hydrogel with embedded cartilage-derived matrix particles. *Biomaterials*. 2015;37:174-82.
16. Gawlitta D, Farrell E, Malda J, Creemers LB, Alblas J, Dhert WJA. Modulating Endochondral Ossification of Multipotent Stromal Cells for Bone Regeneration. *Tissue Engineering Part B: Reviews*. 2010;16(4):385-95.
17. Seyednejad H, Gawlitta D, Kuiper RV, de Bruin A, van Nostrum CF, Vermonden T, et al. In vivo biocompatibility and biodegradation of 3D-printed porous scaffolds based on a hydroxyl-functionalized poly(epsilon-caprolactone). *Biomaterials*. 2012;33(17):4309-18.
18. Boot W, Moojen DJ, Visser E, Lehr AM, De Windt TS, Van Hellemond G, et al. Missed low-grade infection in suspected aseptic loosening has no consequences for the survival of total hip arthroplasty. *Acta orthopaedica*. 2015;86(6):678-83.
19. Boere KW, Visser J, Seyednejad H, Rahimian S, Gawlitta D, van Steenberg M, et al. Covalent attachment of a three-dimensionally printed thermoplast to a gelatin hydrogel for mechanically enhanced cartilage constructs. *Acta Biomater*. 2014;10(6):2602-11.
20. Prins HJ, Braat AK, Gawlitta D, Dhert WJ, Egan DA, Tijssen-Slump E, et al. In vitro induction of alkaline phosphatase levels predicts in vivo bone forming capacity of human bone marrow stromal cells. *Stem cell research*. 2014;12(2):428-40.

21. Fedorovich NE, Kuipers E, Gawlitta D, Dhert WJ, Alblas J. Scaffold porosity and oxygenation of printed hydrogel constructs affect functionality of embedded osteogenic progenitors. *Tissue engineering Part A*. 2011;17(19-20):2473-86.
22. Kolk A, Handschel J, Drescher W, Rothamel D, Kloss F, Blessmann M, et al. Current trends and future perspectives of bone substitute materials - from space holders to innovative biomaterials. *Journal of cranio-maxillo-facial surgery : official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery*. 2012;40(8):706-18.
23. van der Stok J, Koolen MK, Jahr H, Kops N, Waarsing JH, Weinans H, et al. Chondrogenically differentiated mesenchymal stromal cell pellets stimulate endochondral bone regeneration in critical-sized bone defects. *European cells & materials*. 2014;27:137-48; discussion 48.
24. van Gaalen SM, Kruyt MC, Geuze RE, de Bruijn JD, Alblas J, Dhert WJ. Use of fluorochrome labels in in vivo bone tissue engineering research. *Tissue engineering Part B, Reviews*. 2010;16(2):209-17.
25. Gonzalez-Vazquez, A., et al., Extracellular calcium and CaSR drive osteoinduction in mesenchymal stromal cells. *Acta Biomater*, 2014. 10(6): p. 2824-33.
26. Sample, SJ., et al., Functional adaptation in female rats: the role of estrogen signaling. *PloS one*. 2012;7(9):e43215.
27. Strube, P., et al., Sex-specific compromised bone healing in female rats might be associated with a decrease in mesenchymal stem cell quantity. *Bone*. 2009 Dec;45(6):1065-72.
28. Arakawa, K., et al., Effects of the estrous cycle and ovarian hormones on central expression of interleukin-1 evoked by stress in female rats. *Neuroendocrinology*. 2014;100(2-3):162-77. PubMed PMID: 25300872.
29. Hong, L., et al., Steroid regulation of proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells: a gender difference. *J steroid Biochem Mol Biol*. 2009 Apr;114(3-5):180-5.
30. Calis, M., et al., Estrogen as a novel agent for induction of adipose-derived mesenchymal stem cells for osteogenic differentiation: in vivo bone tissue-engineering study. *Plastic and reconstructive surgery*. 2014 Apr;133(4):499e-510e.
31. Chatterjea, A., et al., Suppression of the immune system as a critical step for bone formation from allogeneic osteoprogenitors implanted in rats. *J Cell Mol Med*, 2014. 18(1): p. 134-42.
32. Peche, H., et al., Induction of tolerance by exosomes and short-term immunosuppression in a fully MHC-mismatched rat cardiac allograft model. *Am J Transplant*, 2006. 6(7): p. 1541-50.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht  
Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht  
Postbus 12007  
3501 AA UTRECHT



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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD1150020172465  
**Bijlagen**  
2

Datum 4 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 "Cartilage-based strategies for bone regeneration in maxillofacial surgical interventions". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1150020172465. 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](http://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:**

4 juli 2017

**Aanvraagnummer:**

AVD1150020172465

**Datum:**  
4 juli 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD1150020172465

### **Gegevens aanvrager**

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 11500  
Naam instelling of organisatie: UMC Utrecht  
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: Dhr. Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht  
KvK-nummer: 30244197  
Postbus: 12007  
Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT  
IBAN: NL27INGB0000425267  
Tenaamstelling van het rekeningnummer: Universiteit Utrecht

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:**

4 juli 2017

**Aanvraagnummer:**

DEC150020172465

**Over uw project**

Geplande startdatum:

1 september 2017

Geplande einddatum:

1 september 2022

Titel project:

Cartilage-based strategies for bone regeneration in maxillofacial surgical interventions

Titel niet-technische samenvatting:

Strategieën voor botregeneratie vanuit kraakbeen in mond-kaak en aangezichtschirurgische ingrepen

Naam DEC:

DEC Utrecht

Postadres DEC:

Postbus 85500 3508 GA Utrecht

E-mailadres DEC:

dec-utrecht@umcutrecht.nl

**Betaalgegevens**

De leges bedragen:

€ 1.541,-

De leges voldoet u:

na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

Verplichte bijlagen:

- Projectvoorstel  
 Beschrijving Dierproeven  
 Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen:

 DEC-advies**Ondertekening**

Naam:



Functie:



Plaats:

Utrecht

Datum:

3 juli 2017





> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UU-ASC  
Postbus 80.011  
3508 TA UTRECHT  


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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD1150020172465  
**Bijlagen**  
2

Datum 4 juli 2017  
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**  
Factuurdatum: 4 juli 2017  
Vervaldatum: 3 augustus 2017  
Factuurnummer: 172465  
Ordernummer: CB. 841910.3.01.011

| Omschrijving  | Bedrag     |
|---|------------|
| Betaling leges projectvergunning dierproeven<br>Betreft aanvraag AVD1150020172465 | € 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.

### **A. Algemene gegevens over de procedure**

1. Aanvraagnummer : 2017.I.543.012
2. Titel van het project : Cartilage-based strategies for bone regeneration in maxillofacial surgical interventions
3. Titel van de NTS : Strategieën voor botregeneratie vanuit kraakbeen in mond- kaak en aangezichtschirurgische ingrepen

#### 4. Type aanvraag:

- nieuwe aanvraag projectvergunning  
 wijziging van vergunning met nummer :

#### 5. Contactgegevens DEC

- Naam DEC : DEC Utrecht  
Telefoonnummer contactpersoon : 088 – 75 59 247  
Emailadres contactpersoon : dec-utrecht@umcutrecht.nl

#### 6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):

- ontvangen door DEC: 22-05-2017  
 aanvraag compleet:  
 in vergadering besproken: 31-05-2017  
 anderszins behandeld:  
 termijnonderbreking(en) van / tot : 06-06-2017/07-06-2017  
 besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:  
 aanpassing aanvraag:  
 advies aan CCD: 03-07-2017

7. De aanvraag is afgestemd met de IvD en deze is hiermee akkoord.

#### 8. Eventueel horen van aanvrager

- Datum:
- Plaats:
- Aantal aanwezige DEC-leden:
- Aanwezige (namens) aanvrager:
- Gestelde vragen en verstrekte antwoorden:
- Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag.

## 9. Correspondentie met de aanvrager

- Datum vragen: 06-06-2017
- Datum antwoord: 07-06-2017
- Gestelde vragen en antwoorden:  
Bijlage 2
  - K. Classificatie van ongerief: De immunodeficiënte dieren (1) kunnen hier verwijderd worden omdat ze geen ongerief ervaren.  
*Dit is aangepast.*
  - Tevens verwijst de DEC naar de discussie/vragen vermeld bij projectvoorstel 2017.I.543.008, *Strategies for vascularized bone regeneration in maxillofacial surgical interventions.*
- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

## 10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC)

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

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

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

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

1. Door trauma, aangeboren afwijkingen of het verwijderen van tumoren, kunnen patiënten botweefsel missen. Momenteel wordt dit botweefsel vervangen door bot elders uit het lichaam, maar hierdoor ontstaat er een extra defect en bovendien vergt het een langdurige operatie. Een mogelijke oplossing hiervoor is het maken van botweefsel in het laboratorium. Tot nu toe zijn er verschillende strategieën voor botregeneratie onderzocht, waarbij geprobeerd is om de meest effectieve celpopulatie te combineren met het ideale dragermateriaal en de optimale stimulatiefactoren. De belangrijkste uitdaging daarbij is het opschalen van weefselgrootte naar een klinisch relevante dimensie. Onderzoekers proberen dit nu op te lossen door: 1) vasculaire structuren in de constructies te introduceren, of door 2) botvorming vanuit kraakbeen te stimuleren, de endochondrale route naar botvorming. Het onderhavige projectvoorstel richt zich op de tweede aanpak. Endochondraal bot wordt gevormd uit een kraakbeenachtige mal dat mineraliseert en, na het optreden van vascularisatie, wordt omgezet in botweefsel. Dit type botvorming vindt ook plaats

in groeischijven en bij genezing van een fractuur. Het endochondrale proces kan worden nagebootst door chondrogenese (kraakbeenvorming) te stimuleren in, uit beenmerg afkomstige, multipotente mesenchymale stromale cellen (MSC's). Er is reeds aangetoond dat implantatie van kraakbeenweefsel uit MSC's omgezet kan worden in botweefsel. In dit project zullen stappen worden genomen om deze aanpak te vertalen naar de klinische praktijk: kunnen [REDACTED] gebruikt worden, welke cellen en materialen kunnen het beste gebruikt worden en hoe kan hiervan een groot implantaat gemaakt worden.

Er zal worden gestart met een *in vitro* studie (geen onderdeel van het projectvoorstel), waarbij gekeken wordt of de cellen opeenhopen in bolvormig kraakbeenweefsel (pellets) en of single cellen [REDACTED] gekweekt kunnen worden in biomaterialen, zoals hydrogelen. Wanneer chondrogenese en hypertrofie van de cellen in pellets of in biomaterialen is bevestigd, wordt overgegaan naar het subcutane en het femur rattenmodel. In het subcutane rattenmodel kan de omzetting van kraakbeenweefsel in botweefsel worden gevalideerd. Het is ook geschikt als screeningsmodel om de optimale constructsamenstelling te bepalen aangezien meerdere samples van verschillende samenstelling geïmplantéerd kunnen worden in één dier. In het femur rattenmodel kan botvorming op een orthotopische locatie (femur) worden bepaald, wat het best overeenkomt met het implantaatbed bij een patiënt. Botregeneratie in termen van het hechten van het implantaat aan het omliggende botweefsel kunnen worden bestudeerd in dit model. De beide modellen kunnen simultaan worden uitgevoerd en kunnen zelfs in één dier worden gecombineerd.

De aanvraag komt qua structuur overeen met voorbeeld 1 uit de "Handreiking Invulling Definitie Project". De DEC is derhalve van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

2. Voor zover de DEC bekend, is er geen mogelijk tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de dierexperimenten in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën sluiten aan bij de hoofddoelstelling.

#### *Belangen en waarden*

4. Het directe doel van het project is om endochondrale botregeneratie (EBR) te vertalen naar een (maxillofaciale) klinisch relevante toepassing. Hiertoe: 1) worden de effecten van het gebruik van [REDACTED] voor EBR bestudeerd, 2) wordt de potentie van gedevitaliseerde, op cellen gebaseerde constructen om EBR te induceren onderzocht, 3) wordt een relevant preklinisch model voor EBR opgezet, 4) wordt de haalbaarheid van EBR bij het vergroten van de constructiegrootte onderzocht en 5) worden verschillende potentiële cel- en/of materiaalcombinaties voor EBR gekarakteriseerd. Het uiteindelijke doel van het project is het vervangen van botweefsel in de kaak en het aangezicht door middel van botweefsel uit het laboratorium. De DEC is van mening dat er in voldoende mate een relatie is tussen het directe doel en het uiteindelijke doel.

5. De belangrijkste belanghebbenden in dit onderzoeksproject zijn: de proefdieren, de doelgroep/patiënten en de onderzoekers. Voor de proefdieren geldt dat hun welzijn en integriteit worden aangetast. De dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en pijn ervaren. De dieren zullen in het kader van het onderzoek gedood worden.
- Zoals bij C1 vermeld, is het vervangen van botweefsel door bot elders uit het lichaam een ingreep die vaak gepaard gaat met letsel op de plek waar het bot vandaan wordt gehaald. Indien er een goed werkende combinatie van cellen, biomaterialen en/of groeifactoren wordt gevonden, kan dit gebruikt worden voor het creëren van kraakbeen en daarmee ook botweefsel. Patiënten zouden dan in de toekomst eenvoudiger, zonder extra chirurgische ingreep en zonder bijkomende defecten als gevolg van het verwijderen van botweefsel, behandeld kunnen worden. Voor de onderzoekers geldt dat dit project kan bijdragen aan een goede wetenschappelijke reputatie en kan leiden tot nieuwe wetenschappelijke inzichten. Wetenschappelijke reputatie kan door de onderzoeker van belang geacht worden, maar dient naar de mening van de DEC geen rol te spelen in de ethische afweging over de toelaatbaarheid van het gebruik van proefdieren.
6. De aanvrager geeft niet aan nadelige effecten op het milieu te verwachten. De DEC ziet geen aanleiding om aan te nemen dat zich toch nadelige effecten zullen voordoen.

#### *Proefopzet en haalbaarheid*

7. De onderzoeksgroep heeft veel ervaring met het doen van onderzoek naar botregeneratie en de PI specifiek met diermodellen voor onderzoek naar botregeneratie. Daarnaast is er, zowel binnen als buiten de instelling, samenwerking met groepen die zich eveneens bezighouden met botregeneratie. De DEC is er daarom van overtuigd dat de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen beschikt om de projectdoelstelling met de gekozen strategie/aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren. De DEC is er bovendien van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project zal kunnen voldoen aan de 3V-beginselen om te voorkomen dat teveel proefdieren zullen worden ingezet en dat ze onnodig nadeel zullen ondervinden van de experimenten.
8. Het project is goed opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten logisch en helder aan bij de aangegeven doelstellingen en de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project (zie hiervoor ook de tekst bij C1).

#### *Welzijn dieren*

9. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
- Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
  - Niet-menselijke primaten (10e)

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

10. De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de EU richtlijn. Alleen na de operatie worden de dieren enkele dagen solitair gehuisvest totdat de wond geheeld is.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. De experimentele handelingen aan de dieren zullen (gezien hun aard) licht tot matig ongerief veroorzaken. Cumulatief is voor beide bijlagen het ongerief ingeschat als matig.
12. De integriteit van de dieren wordt fysiek aangetast door het subcutaan implanteren van de scaffolds en het aanbrengen van een defect in de femur.
13. De humane eindpunten zijn in de bijlage dierproeven goed gedefinieerd en het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt bereikt is goed ingeschat. In bijlage 1 wordt verwacht dat maximaal 5% van de dieren het humane eindpunt bereikt. Voor bijlage 2 is dat minder dan 10%. De dieren in beide bijlagen zullen nauwlettend gemonitord worden op algeheel welzijn, waarbij met name wordt gelet op een infectie van de chirurgische wond(en), hijgen, speekselvloed, immobiliteit, aanhoudend beven, aanhoudende krampen, zelfmutilatie, pilo erectie en abnormale houding en onacceptabel/langdurig gewichtsverlies (zichtbare wervelkolom of rib) ten opzichte van soortgenoten.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Voor aanvang van de *in vivo* studies wordt *in vitro* onderzoek verricht, waarbij de biomaterialen, cellen en groeifactoren getest worden op de meest optimale combinaties. Omdat de systemische effecten van de implantaten, zoals de invloed op de aantrekking van stamcellen uit de bloedstroom en het beenmerg, en de ingroei en binding van het implantaat met het omliggende botweefsel, alsook de snelheid van omvorming naar nieuw bot, waarbij cellen nodig zijn vanuit het lichaam, niet *in vitro* na te bootsen zijn is het gebruik van diermodellen noodzakelijk. Daarnaast zijn diermodellen nodig om te zien of de ontwikkelde botweefsels de krachten, die in een bewegend dier/mens aanwezig zijn, kunnen weerstaan. De *in vitro* studies kunnen derhalve de kwaliteit van het implantaat in de patiënt onvoldoende voorspellen.

15. Het aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en er is een heldere strategie om ervoor te zorgen dat tijdens het project met het kleinst mogelijke aantal dieren wordt gewerkt waarmee nog een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Voor het berekenen van het aantal benodigde dieren worden statistische methoden toegepast. Daarnaast wordt onnodig proefdiergebruik voorkomen met behulp van go/no-go momenten waarbij alleen de best werkende *in vitro* combinatie *in vivo* wordt getest. Door de eerste screening in het subcutane model te verrichten, zijn er minder dieren nodig tijdens het optimalisatieproces en kunnen in dit model zes verschillende condities in één dier worden getest. Op deze manier worden alleen de meestbelovende substituten getest in het orthotopische model. Verder zijn door het orthotopische model te combineren met additionele subcutane implantaten, minder dieren nodig om een efficiënte vergelijking te maken tussen de verschillende parameters.
16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project is zodanig opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. De dieren worden goed gemonitord om ongerief tijdig te kunnen vaststellen en onnodig lijden te voorkomen en zullen ze worden geëuthanaseerd zodra ze één van de vooraf nauwkeurig gedefinieerde humane eindpunten bereiken. De onderzoekers hebben ofwel ervaring met het uitvoeren van de chirurgische handelingen of worden hier vooraf in getraind o.a. met behulp van kadavermateriaal. In bijlage 1 wordt het s.c. rattenmodel gebruikt omdat het een goede screening van de implantaten toestaat en er verschillende combinaties van implantaten in één dier geplaatst kunnen worden. In bijlage 2 is voor het femur rattenmodel gekozen omdat het een ideaal model is om botweefselregeneratie in te bestuderen, vanwege het aanbrengen van de implantaten op de orthotopische locatie, waarmee het de klinische situatie het beste benadert.
17. Er is geen sprake van wettelijk vereist onderzoek.

*Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef*

18. Omdat mannelijke en vrouwelijke ratten een ander botmetabolisme hebben, wordt de voorkeur gegeven aan het gebruik van één sekse. Het gebruik van beide seksen zal leiden tot een grotere variatie en het gebruik van meer dieren. Aangezien stress en leeftijd invloed hebben op het oestrogeen niveau en oestrogenen van invloed zijn op botregeneratie, gaat in bijlage 1 de voorkeur uit naar het gebruik van mannelijke muizen. In bijlage 2 gaat eveneens de voorkeur naar het gebruik van mannelijke ratten omdat de femur van vrouwtjes ratten kleiner is en dat de chirurgische procedure bemoeilijkt. De DEC is er van overtuigd dat de aanvrager in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd dat het, om de doelstellingen te bereiken, noodzakelijk is om de proeven met alleen mannelijke dieren uit te voeren.
19. De dieren worden in het kader van het project gedood voor histologisch onderzoek van de constructen. De dieren worden volgens een, bijlage IV van de EU richtlijn, passende methode gedood.

20. De vraag over hergebruik is niet van toepassing omdat de dieren gedood worden in het kader van het experiment.

NTS

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

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

1. De morele vraag die de DEC dient te beantwoorden is of het belang van dit onderzoek, namelijk het vertalen van endochondrale botregeneratie (EBR) naar een (maxillofaciale) klinisch relevante toepassing, de onvermijdelijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de gebruikte proefdieren kan rechtvaardigen.
2. Er vindt een aanzienlijke aantasting van welzijn en integriteit van de proefdieren plaats, met matig ongerief.  
Echter, indien de hierboven genoemde doelstellingen behaald worden zal dit project er toe bijdragen dat patiënten die botweefsel missen in de kaak of het aangezicht, een transplantatie kunnen ondergaan van, in het laboratorium, endochondraal gegroeid botweefsel, zonder de nadelen die een bottransplantatie uit een ander deel van het lichaam van de patiënt met zich meebrengt. De DEC kent daar veel gewicht aan toe. Wanneer het de onderzoekers bovendien lukt om botvorming vanuit kraakbeen te stimuleren, kan in de toekomst wellicht ook de vertaalslag worden gemaakt naar andere weefsels en organen.  
Het is aannemelijk dat de fundamentele en translationele doelstellingen behaald zullen worden. Daarvoor is de inzet van proefdieren noodzakelijk, maar de onderzoekers doen al het mogelijke om het ongerief voor de dieren en het aantal dieren tot een minimum te beperken.
3. Op grond van het bovenstaande is de DEC van oordeel dat, hoewel de experimenten leiden tot een aanzienlijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de proefdieren, het in het laboratorium ontwikkelen van endochondraal gegroeid botweefsel, ter vervanging van een bottransplantatie elders uit het lichaam, een substantieel belang vertegenwoordigt dat opweegt tegen de aantasting van het welzijn en de integriteit van de proefdieren. Het gebruik van de proefdieren zoals beschreven in de aanvraag is daarmee gerechtvaardigd.

#### **E. Advies**

1. Advies aan de CCD
  - De DEC adviseert de vergunning te verlenen.
  - De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden.
  - De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:



2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.
3. Er zijn geen knelpunten/dilemma's naar voren gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD1150020172465  
**Bijlagen**  
1

Datum 20 juli 2017  
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 4 juli 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Cartilage-based strategies for bone regeneration in maxillofacial surgical interventions" met aanvraagnummer AVD1150020172465. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

#### **Beslissing**

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

De algemene voorwaarde(n) zijn opgenomen op grond van artikel 1d lid 4, artikel 10a1 lid 2, artikel 10 lid 2 en/of artikel 10a3 van de wet.

U kunt met uw project "Cartilage-based strategies for bone regeneration in maxillofacial surgical interventions" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 september 2017 tot en met 31 augustus 2022. Deze termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat een vergunning een looptijd van maximaal 5 jaar kan hebben.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

#### **Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Utrecht gevoegd. Dit advies is opgesteld op 3 juli 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:**  
AVD1150020172465

### **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.

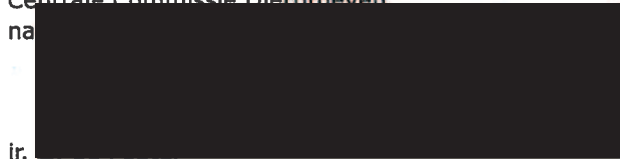
Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige voorziening vragen bij de Voorzieningenrechter van de rechtbank in de woonplaats van de aanvrager. U moet dan wel 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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Centrale Commissie Dierproeven  
na



ir.   
Algemeen Secretaris

### **Bijlagen:**

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



# Projectvergunning

## gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: UMC Utrecht  
Adres: Postbus 12007  
Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT  
Deelnemersnummer: 11500

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 september 2017 tot en met 31 augustus 2022, voor het project "Cartilage-based strategies for bone regeneration in maxillofacial surgical interventions" met aanvraagnummer AVD1150020172465, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Utrecht. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 4 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 4 juli 2017;
  - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 3 juli 2017, ontvangen op 4 juli 2017.

| Naam proef  | Diersoort/ Stam                       | Aantal dieren | Ernst | Opmerkingen |
|---|---------------------------------------|---------------|-------|-------------|
| <b>3.4.4.1 Subcutaneous construct implantation in rats</b>              |                                       |               |       |             |
|   | Ratten ( <i>Rattus norvegicus</i> ) / | 70            | Matig |             |
| <b>3.4.4.2 Subcutaneous + orthotopic construct implantation in rats</b> |                                       |               |       |             |
|   | Ratten ( <i>Rattus norvegicus</i> ) / | 446           | Matig |             |

### Voorwaarden

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

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

In artikel 10, lid 1 sub a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen

**Aanvraagnummer:**  
AVD1150020172465

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:**

AVD1150020172465

## 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:**

AVD1150020172465

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.                           | document NTS 20172485              | wordt verstrekt |      |        |       | weigeringsgronden |        |        |  | 11.1 |
|                               |                                    | reeds openbaar  | niet | geheel | deels | 10.1.c            | 10.2.e | 10.2.g |  |      |
| 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      |       |                   |        |        |  |      |
| 7                             | Referentielijst                    |                 |      | x      |       |                   |        |        |  |      |
| 8                             | Factuur                            |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |  |      |
| 9                             | DEC-advies                         |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |  |      |
| 10                            | Adviesnota CCD                     |                 | x    |        |       |                   |        |        |  | x    |
| 11                            | 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](http://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?<br><i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>                          | <input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in   11500   |                                |             |   |            |            |          |                      |                                      |         |                |                    |                  |             |                    |                                       |                      |
|   |   | <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen   |                                |             |   |            |            |          |                      |                                      |         |                |                    |                  |             |                    |                                       |                      |
| 1.2   | Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.   | <table><tr><td>Naam instelling of organisatie</td><td>UMC Utrecht</td></tr><tr><td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td><td>[REDACTED]</td></tr><tr><td>KvK-nummer</td><td>30244197</td></tr><tr><td>Straat en huisnummer</td><td>Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht</td></tr><tr><td>Postbus</td><td>12007</td></tr><tr><td>Postcode en plaats</td><td>3501AA   Utrecht</td></tr><tr><td>IBAN</td><td>NL27INGB0000425267</td></tr><tr><td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td><td>Universiteit Utrecht</td></tr></table> | Naam instelling of organisatie | UMC Utrecht | Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde                   | [REDACTED] | KvK-nummer | 30244197 | Straat en huisnummer | Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht | Postbus | 12007          | Postcode en plaats | 3501AA   Utrecht | IBAN        | NL27INGB0000425267 | Tenaamstelling van het rekeningnummer | Universiteit Utrecht |
| Naam instelling of organisatie                      | UMC Utrecht   |  |                                |             |   |            |            |          |                      |                                      |         |                |                    |                  |             |                    |                                       |                      |
| Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde | [REDACTED]  |  |                                |             |   |            |            |          |                      |                                      |         |                |                    |                  |             |                    |                                       |                      |
| KvK-nummer  | 30244197  |  |                                |             |   |            |            |          |                      |                                      |         |                |                    |                  |             |                    |                                       |                      |
| Straat en huisnummer                                | Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht  |  |                                |             |   |            |            |          |                      |                                      |         |                |                    |                  |             |                    |                                       |                      |
| Postbus   | 12007   |  |                                |             |   |            |            |          |                      |                                      |         |                |                    |                  |             |                    |                                       |                      |
| Postcode en plaats                                  | 3501AA   Utrecht  |  |                                |             |   |            |            |          |                      |                                      |         |                |                    |                  |             |                    |                                       |                      |
| IBAN  | NL27INGB0000425267  |  |                                |             |   |            |            |          |                      |                                      |         |                |                    |                  |             |                    |                                       |                      |
| Tenaamstelling van het rekeningnummer               | Universiteit Utrecht  |  |                                |             |   |            |            |          |                      |                                      |         |                |                    |                  |             |                    |                                       |                      |
| 1.3   | Vul de gegevens van het postadres in.<br><i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i> | <table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[REDACTED]</td><td><input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr></table>  | (Titel) Naam en voorletters    | [REDACTED]  | <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw. | Functie    | [REDACTED] |          | Afdeling             | [REDACTED]                           |         | Telefoonnummer | [REDACTED]         |                  | E-mailadres | [REDACTED]         |                                       |                      |
| (Titel) Naam en voorletters                         | [REDACTED]  | <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.  |                                |             |   |            |            |          |                      |                                      |         |                |                    |                  |             |                    |                                       |                      |
| Functie   | [REDACTED]  |  |                                |             |   |            |            |          |                      |                                      |         |                |                    |                  |             |                    |                                       |                      |
| Afdeling  | [REDACTED]  |  |                                |             |   |            |            |          |                      |                                      |         |                |                    |                  |             |                    |                                       |                      |
| Telefoonnummer                                      | [REDACTED]  |  |                                |             |   |            |            |          |                      |                                      |         |                |                    |                  |             |                    |                                       |                      |
| E-mailadres   | [REDACTED]  |  |                                |             |   |            |            |          |                      |                                      |         |                |                    |                  |             |                    |                                       |                      |
| 1.4   | Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.  |  |                                |             |   |            |            |          |                      |                                      |         |                |                    |                  |             |                    |                                       |                      |
| 1.5   | <i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.  | <table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td></td><td><input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td></td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td></td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td></td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td></td><td></td></tr></table>   | (Titel) Naam en voorletters    |             | <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.            | Functie    |            |          | Afdeling             |                                      |         | Telefoonnummer |                    |                  | E-mailadres |                    |                                       |                      |
| (Titel) Naam en voorletters                         |   | <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.   |                                |             |   |            |            |          |                      |                                      |         |                |                    |                  |             |                    |                                       |                      |
| Functie   |   |  |                                |             |   |            |            |          |                      |                                      |         |                |                    |                  |             |                    |                                       |                      |
| Afdeling  |   |  |                                |             |   |            |            |          |                      |                                      |         |                |                    |                  |             |                    |                                       |                      |
| Telefoonnummer                                      |   |  |                                |             |   |            |            |          |                      |                                      |         |                |                    |                  |             |                    |                                       |                      |
| E-mailadres   |   |  |                                |             |   |            |            |          |                      |                                      |         |                |                    |                  |             |                    |                                       |                      |

- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.
- |                             |  |
|-----------------------------|--|
| (Titel) Naam en voorletters | <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  | 1 - 9 - 2022 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Strategies for vascularized bone regeneration in maxillofacial surgical interventions
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Strategieën voor gevasculariseerde botregeneratie in kaak- en aangezichtschirurgische ingrepen
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- |             |                                |
|-------------|--------------------------------|
| Naam DEC    | DEC Utrecht                    |
| Postadres   | Postbus 85500, 3508 GA Utrecht |
| E-mailadres | dec-utrecht@umcutrecht.nl      |

## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?  Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1.541 Lege  
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.  Via een eenmalige incasso  
 Na ontvangst van de factuur
- Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*

## 5 Checklist bijlagen

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

## 6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:
- Centrale Commissie  
 Dierproeven  
 Postbus 20401  
 2500 EK Den Haag
- Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondergetekende verklaart:
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
  - dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
  - dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
  - dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
  - dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam

Functie

Plaats

Datum

Handtekening

29

utrecht



## 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](http://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.

##### 3.1.1 Motivation and background

Bone is the second most commonly transplanted tissue (1), as bone grafting is required in several orthopaedic, neurosurgical and dental procedures such as craniomaxillofacial reconstructions, spinal fusion techniques or

delayed fusion of bone defects (delayed unions and non-unions) (2, 3). Autografts, which represent the current golden standard, have an excellent success rate and a complete immunocompatibility. However, due to several drawbacks, including donor-site morbidity, limited tissue availability and surgical complications, this procedure is suboptimal or not always an option (4). Allografts are considered the surgeon's second best option. However, the percentage of successful graft incorporation is lower and the procedure is not completely free from the risk of immune rejection and pathogen transmission (4, 5). To overcome these limitations, a bone substitute is required, preferably as an off-the-shelf product. Currently, next to tissue transplantation, several non-regenerative treatment options are available such as polymer or titanium prostheses that do not adapt or grow. These prosthetic solutions have a limited lifespan in the patient, most commonly due to infections. As mentioned, substitutes could be engineered via regenerative medicine strategies. These can be based on the use of (stem) cells and/or biomaterials. The latter is less complex and has found its way into the clinic. Various calcium phosphate-based materials (representing the inorganic component of bone tissue) are applied in the clinic when no tissue can be transplanted. However, the clinical outcomes with these materials are inferior to the gold standard transplantation treatment options. This warrants the exploration of creating bone substitutes based on both cells and materials.

### **3.1.2 State of the art**

So far, several strategies for bone regeneration have been explored in order to combine the most effective cell population with the ideal carrier material and the optimal stimulation factors, but no fully satisfactory and clinically relevant results have been obtained yet (6). The main challenges are related to the scale-up of tissue size to a clinically relevant dimension. Initial studies showed that large engineered living tissue constructs cannot survive the implantation when exceeding a size of 400µm. Therefore, the current focus in the field is to work around this limitation by 1) introducing vascular structures in the constructs, or by 2) investigating the alternative route to bone formation via a cartilage intermediate, the endochondral route to bone formation. The present proposal will focus on the first approach.

Introduction of vascular structures in engineered tissues has focused on the establishment of capillary networks and the development of engineered blood vessels or endothelial-lined channels. [REDACTED] started working on generating capillary networks in engineered bone tissue in [REDACTED]. Typically, [REDACTED] a co-culture in hydrogels of bone progenitor cells (MSCs) and endothelial progenitor cells (ECFCs) to promote the formation of prevascular structures in bone-like tissue [7]. [REDACTED] the functionality of these structures as they were capable to connect to a host's vasculature upon subcutaneous implantation [REDACTED]. Also, osteogenic differentiation was observed in these constructs *in vitro*. More recently, [REDACTED] the development of engineered blood vessels and endothelial-lined channels. The combination of both is the next step in this field. The interaction of vessels and capillaries and their effects on the surrounding osteogenic tissue can be studied in AV loop models.

### **3.1.3 Research lines**

[REDACTED], bone regenerative research lines are inspired by the two natural processes of bone formation in humans: these are the (vascularized) intramembranous and the endochondral routes that contribute to developmental bone formation and to bone healing (7). By mimicking these mechanisms - using various combinations of cells, signals and materials - [REDACTED] to develop bone regenerative strategies for maxillofacial applications.

The flowchart below illustrates the interaction between the intramembranous and the endochondral research lines. It further highlights the translational approach from the more fundamental *in vitro* evaluations to large animal models. The present project proposal will focus on the part shown in the flowchart within the intramembranous research line (outlined by red box) with experiments that will be performed in small and large animal models following 'go/no go' evaluation (*e.g.* confirmation of osteogenic and vasculogenic potential) in [REDACTED] established *in vitro* models.



*Comprehensive flow chart showing interconnection of aims/strategies for bone regeneration at various experimental levels, ranging from a more fundamental 'in vitro' level up to a 'large animal model'. Also, the go/no go indicators are included at the arrows.*

**Intramembranous route in the flowchart** For engineering of (pre)vascularized tissues, we can for example culture (stem) cells in hydrogels. Once non-toxicity, osteogenesis and vasculogenesis are confirmed *in vitro*, constructs can be evaluated in small animal models (rat). The sc rat model can give a first impression of potential for osteogenesis, anastomosis and functional perfusion of the prevascular network. It is also suitable as a screening model to establish optimal construct composition as multiple samples of different groups can be implanted in one animal. The AV loop model in the rat can provide insight in bone forming potential and anastomosis to a larger vessel with functional perfusion of a larger construct. Once optimal construct composition is established and bone formation and vascular perfusion are confirmed in the rat AV loop model, construct performance can be evaluated in the goat AV loop model. This model can provide insight in construct performance for tissue formation of clinically relevant size.

#### **An example illustrating the different research levels**

An example of one of the strategies for vascularized bone regeneration, [REDACTED], is shown below. On the far left of the figure, the classical cell culture on a flat surface can be seen. Our [REDACTED] work focuses on the other four steps to clinical implementation:

1. Culture of cells in a threedimensional (3D) matrix made from a natural material (e.g. decellularized matrix) or from a (semi)synthetic biomaterial (e.g. functionalized hydrogel).
2. [REDACTED] of complex geometries with embedded cells.
3. Maturation of a construct *in vitro*, e.g. by growth factor stimulation or [REDACTED]
4. *In vivo* testing and translation of tissue engineering protocols to clinically applicable versions.



Figure from [REDACTED] showing the evolutionary stages from 2D cell culture to the development of 3D tissue analogs.

### 3.2 Purpose

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

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

The aim of this proposal is to create vascularized constructs for bone regeneration, with a strong translational focus on [REDACTED] clinical applications:

1. we aim to fabricate an extensive perfusable microvascular network, which can connect to the host vasculature *in vivo* to supply the engineered bone tissue with blood and which also supports bone formation,
2. we aim to create vessels (mm-scale diameter) that can sprout to form and/or connect to a microvascular network to support and perfuse an engineered bone constructs.

#### **Aim 1: To fabricate an extensive microvascular perfusable network in an osteogenic construct**

- Select the most suitable material and fabrication technique to obtain high biocompatibility and osteoinductivity and an extensive perfusable microvascular network
- Evaluate early and late *in vivo* vascular and bone tissue formation following implantation of prevascularized constructs
- To obtain functional anastomosis of the construct's prevascular network and the host's circulation

#### **Aim 2: To create a mm-scale vessel to sprout and support engineered bone**

- Determine effective construct vascularization in a construct with an inserted small diameter blood vessel (*i.e.* sprouting and connection of the vessel into the surrounding construct; AV loop model)
- To obtain functional anastomosis of the construct's prevascular network and the host's circulation
- Upscale the dimension of living constructs to a clinically relevant size (*i.e.* cm scale)
- Increase our understanding of the interplay of vascularization and intramembranous bone tissue regeneration

#### **The aims are achievable in 5 years:**

- At present, connection of microvascular structures to a host vasculature upon subcutaneous implantation is achievable. [REDACTED] also demonstrated this before [REDACTED]. However, simultaneous bone formation is challenging. To solve this, we will adapt [REDACTED] approach by [REDACTED]. This can be done by including [REDACTED] biomaterials or growth factors, such as [REDACTED]. Also, [REDACTED] developed new biomaterials that better mimic the natural environment of [REDACTED] to stimulate the [REDACTED] process.

- The AV loop models have been developed and used by others (8-11).
- In addition to the establishment of *in vitro* models and *in vivo* models, the [redacted] animal models for bone regeneration (12-14). [redacted] on cartilage and bone regenerative strategies, both *in vitro* and *in vivo*, resulting in [redacted] (12-18). Since [redacted]. So far, [redacted] published [redacted] articles and her current h-index [redacted].
- The [redacted] longstanding expertise in bone regeneration research and all equipment and infrastructure required for this project are already available (the [redacted] in the new [redacted], where regenerative facilities and expertise are clustered). Further, the [redacted] surgeons are dedicated to contribute to research where applicable and will be involved in the surgical aspects of studies.
- [redacted] with other [redacted] groups are essential to this project, including the [redacted]. Further, the group also collaborates with [redacted] labs, including [redacted]. [redacted] will work on the project, ensuring sufficient manpower to perform the required studies. Continuous application for research funding results in regular grants enabling sustenance of our research and manpower. In total, [redacted] has secured over [redacted] of funding, of which [redacted]. Part of the proposed studies [redacted] and as such accepted by international reviewers as feasible and realistic studies that can be performed within the project's time frame within the next five years.
- We have published a paper describing [redacted].

### 3.3 Relevance

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

Scientific relevance:

[redacted] basic and translational research to induce effective vascularized bone restoration. This approach allows [redacted] face the challenges that have so far hampered the clinical translation of the engineered cell-constructs, while collecting precious information about the complex mechanisms involved in bone tissue regeneration. (aim 1&2) Developing for example, an *in vitro* vascularized tissue construct, not only provides information about the interplay between the angiogenic (vessels) and osteogenic (bone) systems, but can also play a role in improving construct survival. The fabrication of such a prevascularized construct could also impact the upscaling of any other type of engineered tissue (e.g. heart, kidney, liver) to a clinically relevant size. Further, improved understanding of sprouting behavior and vascular anastomoses can be obtained based on the proposed studies. Taken together, these results will generate knowledge that is essential to bring vascularized bone tissue regeneration closer to clinical translation. All studies will be compiled into conference abstracts and papers to be published in respected journals in the field.

Social relevance:

From the perspective of the patient, a lot can potentially be gained by the proposed studies. It has been estimated that every year 2.2 million bone grafts are implanted worldwide, with a related cost of \$2.5 billion (20). Currently available treatment strategies for non-healing bone defects include autograft and allograft transplantation. Autografts represent the best alternative because of their complete immunocompatibility and their osteoconductive and osteoinductive properties. However, this solution is far from optimal. Among its drawbacks are the limited bone availability, the need of an additional surgical procedure, which is closely related to donor site morbidity and the difficulties in modelling the graft into the desired shape (4). Likewise, allograft procedures are associated with limited bone supply. In addition, these grafts are not completely immunocompatible, pose possibility of disease transmission, and the grafting materials need to undergo chemical or physical treatment, which often undermine their osteoinductive properties (4, 5). To overcome these limitations, a bone substitute is required. Biomaterials have been developed to successfully



restore bone defects in patients. However, biomaterials cover only an estimated 20% of the market as they cannot be used to restore large, challenging bone defects. Therefore, we aim to develop bone regenerative strategies.

The proposed research can impact current patient care standards. Few cell-based regenerative constructs are nowadays translated to clinical application. Here, we can advance the field by designing the construct in such a way that it is more tailored towards clinical application. For example, if it would be possible to engineer vascularized large tissue constructs for implantation in humans, that could impact tissue and organ transplantations in the long term. With the well-known shortage of donor organs, regenerative medicine based solutions offering completely vascularized tissues that could be implanted in a patient would open up novel treatment avenues.

---

### 3.4 Research strategy

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

The overall design of the project and strategies are presented in the flowchart included in section 3.1.3. In vitro evaluated constructs that show confirmed osteogenesis, vasculogenesis and are non-toxic can progress into the subcutaneous or AV loop model in the rats. Depending on previous experience with the materials/cells either the subcutaneous model (e.g. to screen new materials or cell types for their in vivo performance for osteogenesis and vasculogenesis) or to the AV loop model for the rat (e.g. to answer specific questions regarding sprouting from an existing vessel). Constructs that have been evaluated in the subcutaneous rat model and perform well for osteogenesis and vascularization can also be included in the AV loop model for the rat. Only constructs that have been evaluated in the rat AV loop model and have shown osteogenesis and formation of vasculature can proceed to the goat AV loop model. Finally, constructs that show confirmed osteogenesis and/or vasculogenesis can proceed from the subcutaneous rat model to the intramuscular goat or os ilium model, where the aspect of scale-up of construct size can be assessed.

Outside of the present project, cartilage-based constructs (from ██████████ project 'Cartilage-based strategies for bone regeneration in maxillofacial surgical interventions') resulting in bone regeneration in the endochondral rat models (subcutaneous and femur) can proceed to large animal models, such as the goat where an ectopic intramuscular implantation or an orthotopic os ilium implantation can be used to assess bone regeneration in large defects.

#### 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.

##### *General outline*

To investigate the aims, different types of animal models are required. Overall, subcutaneous rodent models are required to screen for optimal construct composition for tissue regeneration. The subcutaneous models offer the opportunity to reduce the overall number of animals required, as multiple samples (up to 6) can be simultaneously implanted in one animal. Next, the optimized constructs can be evaluated in an AV loop model (typically only 1 defect per animal possible). In this AV loop model, the construct should still be effective in anastomosis/induction of the vascular network, while supporting bone formation. However, scale-up of construct size must be assessed in even larger animals, such as goat that can accommodate large, cm-scale constructs.

##### *Screening for optimal parameters at subcutaneous locations ██████████ in flowchart of 3.1.3)*

Subcutaneous implantation in rodents is a suitable model to study anastomosis and intramembranous bone regeneration. Due to the relatively high number of samples that can be implanted at this location, the subcutaneous model is attractive for screening of the most promising construct compositions resulting from the *in vitro* experiments. For example, it can be used for comparing anastomosis, vasculogenesis and bone regeneration for different biomaterials, after various predifferentiation periods, early and late time points, or with different cell types (12, 13).

More specifically, under general anaesthesia, up to six subcutaneous dorsal pouches will be created via 7-10 mm incisions. By limiting the total number of pouches to 6, the risk of pouch-to-pouch connection is also limited. Prevascularized samples will be inserted into the pouches that are then intracutaneously closed by sutures. For studies involving implantation of human cells, the rat species can be changed to immunodeficient animals. To monitor bone formation, the rats will be included in the experiment for up to 12 weeks. Similarly, in the large animal models, subcutaneous and intramuscular pouches could be used to optimize various construct parameters specifically for larger samples for up to 24 weeks.

---

AV loop models [redacted] in flowchart of 3.1.3)

Vascular invasion models (to study an *in vivo* vascularization strategy) in mammals can entail relaying or transplanting an existing millimeter scale vessel of the host through an (osteogenic) construct. Sprouting and vascular migration of the vessel into the construct and subsequent bone regeneration can be studied in this model. An example is the arteriovenous loop (AV loop) model that can be inserted in a large animal model (8). Recently, this model was also extended to reconstruct goat mandibles (9). Additionally, anastomosis of capillary-like vasculature can be studied following subcutaneous implantation, as already mentioned under the subcutaneous models.

The AV-loop model is an intrinsic prevascularization method, in which an arteriovenous loop is used to improve initial vascularization of a (bone) construct. In more detail, an artery and vein are anastomosed in a loop to increase blood perfusion in the vicinity of the loop. The loop can be constructed by re-routing a vessel from the animal through the construct or by harvesting a vessel from another location and transplanting to the site where the construct is implanted. For example, in rats the AV-loop can be constructed from the femoral artery and vein with an interposed femoral vein graft, harvested from the contralateral side. A first screening of various construct compositions could be performed in this small animal model for up to 12 weeks. Once the most promising conditions are defined (*i.e.* combination of cells, materials, and/or growth factors), a goat model will be used to study feasibility of regeneration by larger constructs for up to 24 weeks.

This model could be combined with the intramuscular and the iliac crest model [redacted] in flowchart in 3.1.3) where required.

#### Readouts

The *in vivo* responses in terms of bone formation can be monitored by micro-CT imaging in the rat models. For rats and larger animals, fluorochrome injections can be an additional means to assess bone formation at various intervals during the experimental period without euthanizing animal at every time point (21). All other readouts (including end point micro-CT, visualization of vascularization by MICROFIL®, immunohistochemistry of tissue development and gene expression analysis) are obtained post-mortem.

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

The coherence has been detailed in section 3.1.3 beneath the flowchart. Briefly, all questions related to vascularization of engineered bone constructs and anastomosis will be addressed in the subcutaneous, intramuscular, orthotopic or AV loop model in the rat. Once novel cell and/or material combinations have resulted in successful creation of prevascular microstructures and osteogenic differentiation in our established *in vitro* models, validation of the potential of a microvascular network to connect to the host's vasculature and to be perfused functionally upon implantation can be performed in the subcutaneous rat model. These microvascular samples could be introduced in the AV loop model where connection to a larger vessel can be established. Yet, even larger samples could be generated and evaluated in the large animal models in an orthotopic location (iliac crest), intramuscular (ectopic) or in combination with an AV loop.

The overall project includes a first screening step in the rat models. This screening step will ensure that only the most promising approaches will be further developed and optimized for studies in larger animal models.

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

| Serial number | Type of animal procedure                         |
|---------------|--|
| 1             | Subcutaneous construct implantation in rats      |
| 2             | AV loop model in rats                            |
| 3             | Intramuscular+ orthotopic+ AV loop model in goat |
| 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](http://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'. | 11500         |   |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment.  | UMC Utrecht   |   |
| 1.3 | List the serial number and type of animal procedure.   | Serial number | Type of animal procedure                    |
|     |  | 3.4.4.1       | Subcutaneous construct implantation in rats |

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.

##### *Experimental approach:*

The aim of this project is to develop strategies to improve the characteristics of the currently available bone substitutes. Since different cell types, scaffold materials and growth factors will be optimized and combined in different ways, a screening of the most promising conditions needs to be performed. Subcutaneous pouches are the ideal model as they have been reported to be an adequate model to evaluate ectopic bone formation [1,2]. Besides, the model allows for the screening of several conditions at the same time, reducing the required amount of animals to a minimum. Further, the independence of the individual pouches will be maximized by limiting the total number of pouches to be created to six and by making one incision to form each pouch.

During the surgery, a maximum of six subcutaneous dorsal pouches will be created per rat. This model will be used for the first aim of the project:

- To fabricate an extensive microvascular perfusable network in an osteogenic construct

The criteria that need to be met *in vitro* before moving to this *in vivo* model are described in section 3.1.3 of the project proposal. The animal type (immunocompetent or immunocompromised) will be chosen according to the specific research question, *e.g.* implantation of [REDACTED] in immunocompromised animals.

##### *Outcomes:*

Primary outcome measures

- The evaluation of ectopic bone formation *in vivo* will be the primary outcome. It will be assessed by microCT analysis, both at early and late timepoints.
- A second primary outcome measure could be included; the assessment of vascularization by

MICROFIL®.

#### Secondary outcome measures

- Bone formation: Fluorochrome labels might be administered at different timepoints after the implantation to establish the onset of bone formation. After the explantation, *ex vivo* analysis will be performed to complement the information obtained with the microCT. In particular, bone content and remodelling will be evaluated via histological and immunohistochemical analysis (*e.g.* H&E, safranin-O, TRAP staining, collagen type I).
- Vascularization: After explantation of the constructs, histological and immunohistochemical analysis will be performed to evaluate blood vessels network growth and sprouting (*e.g.* H&E, CD34).

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

#### Animal procedures (12,13)

The animals are allowed at least one week of acclimatization before the start of the experiment. Open or filter top (in case of immunocompromised rat strain) cages will be selected according to the rat strain that is used and will be specified in the work protocol. The rats will always be housed in pairs, except for up to 3 days after the operation to allow for wound healing. The animals will be maintained on rodent chow and water *ad libitum*.

#### Anaesthesia protocol

All operations will be performed under adequate anaesthesia.

#### Pain management

Analgesia is provided by a subcutaneous injection of pain medication, before surgery and daily until 3 days after surgery.

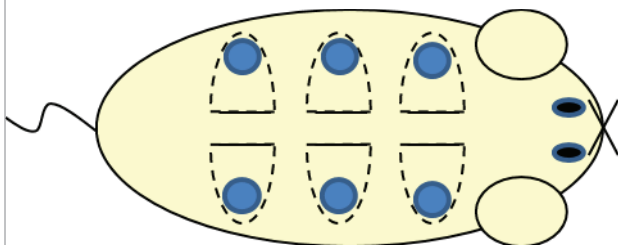
#### Antiseptic techniques

All operations will be performed under aseptic conditions. The surgeon will wear scrubs, gown, surgical mask, head cover and gloves. After shaving, the skin will be disinfected with ethanol and the surgical site will be draped. To reduce perioperative infection risk, all rats receive a dose of antibiotics before surgery. All the surgical equipment will be sterilize before the surgery.

#### Surgical technique

As shown in the figure below, a maximum of 6 dorsal pockets (dotted lines) are created, each by blunt dissection through one skin incision (from 7 to 10 mm, solid black lines at pocket) and filled with one implant (blue circles). The skin will be closed transcutaneously with resorbable sutures.

Total operation time per animal: 30 minutes



#### Postoperative care

The animals are postoperatively treated with the analgesic as previously described. In case of failing sutures in unclosed wet wounds, the wound will be cleaned, debrided and re-sutured under adequate anaesthesia. The wounds will be examined daily for three days following surgery, thereafter weekly.

#### Bone regeneration measurements

Where applicable, fluorochromes will be administered by subcutaneous injection. For the *in vivo* bone formation analysis by microCT, rats are sedated using proper anaesthesia.

Total handling time per animal: 15 minutes

#### Euthanasia protocols

The rats will be euthanized according one of the methods listed in the appendix IV of directive 2010/63/EU. Methods will be selected based on their influence on vascular interference and compatibility with MICROFIL injection. The implants will be retrieved afterwards.

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

The required amount of animals has been selected based on previously published studies (12,13).

- To fabricate an extensive microvascular perfusable network in an osteogenic construct

The criteria required to start an *in vivo* experiment using this model are described in section 3.1.3 of the project proposal. Here a schematic representation of the variables that are taken into account in this aim.

| <b>Variables</b>  |   |  |
|---|---|--|
| <b>1) Biomaterials</b> (e.g. hydrogels, synthetic polymers, osteoinductive materials) | <b>2) Progenitor cells</b> (e.g. osteoprogenitor, endothelial progenitor cells) | <b>3) Growth factors</b> (e.g. chemoattractants, VEGF, BMPs) |

In a typical experiment, these three variables are combined. For example, in an experiment based on the 3 listed variables a maximum of four different groups, including the controls conditions can be made (biomaterial only, biomaterial + progenitor cells, biomaterial + growth factor, biomaterial + progenitor cells+ growth factor). Two additional groups can be added in case sub-variables are included (e.g. two different progenitor cells type or two different growth factor concentration). Therefore, in each experiment, 4 to 6 different experimental conditions and controls can be included.

Based on previously published studies (12,13) the power analysis has been performed using an online tool (<http://homepage.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/>). For the statistical analysis a one-way anova with Tukey/HSD post hoc correction has been performed. A sample size of maximum 6 implants per condition was defined to be able to detect a contrast of 30% with a power of 82%, a standard deviation of 0.13 and  $\alpha=0.05$ .

Based on this sample size, a maximum amount of constructs per experiment can be determined: 4 to 6 conditions \* 6 (n)= 24 to 36 implants in total per experiment.

Number of animals required: 24 to 36 implants/ 6 implants per rat= 4-6 rats per experiment, considering a drop out of 5% of the implants (based on previous experience), 2 to 3 extra pockets might be required. For this reason a maximum of 5 to 7 animals are required per experiment.

For a complete screening it is expected that several combinations of the three variables have to be compared as new biomaterials, growth factors and cell types are continuously developed and detected. The basic format of one experiment as outlined above will be repeated for different biomaterials, cell types or stimuli. As part of our ongoing research we expect to discover 1-2 promising new variables each year that will have completed the *in vitro* evaluations and have passed the go/no go criteria. So in total, for a five year period we would need to perform a maximum of 10 experiments, involving 5-7 rats each. This would amount to a total number of 70 rats. Furthermore, the exact amount of animals per experiment will be defined consulting a statistician and the animal welfare body and it will be specified in the work protocol.

Total number of animals required for this appendix (including the drop out rate): 70

#### **B. The animals**

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

A total of 70 animals is required. The appropriate animal strain will be chosen according to the specific type of graft that is implanted during the experiment (e.g. biomaterial only or non-autologous cell seeded constructs) and they will be purchased from a registered breeder (e.g. Charles River). To have sufficient space between the

pouches and avoid potential interference, skeletally mature rats are required. For this reason, only rats older than 12 weeks at the time of implantation will be used. Further, male and female rats show differences in bone metabolism (22,23,27,28), the use of a mixed population will cause a stronger increase in the observed variance. Since estrogen levels in female rats depend on stress and age (24) and can affect bone regeneration (25,26), male rats have been identified as the most suitable model.

- Male rats older than 12 weeks selected from an outbred colony (e.g. Wistar) will be used when a broad screening is required. These rats are a suitable screening model to test tissue regeneration in a cell-free approach.
- Male rats older than 12 weeks selected from an inbred strain (e.g Fischer 344, Brown Norway or Lewis) will be used when syngeneic transplantation of bone marrow derived stem cells needs to be performed. Further, less variation can be expected when this animal model is used, compared to the outbred colony rats. For this reason, valuable information can be collected using an inbred animal model during the screening phase.
- Male rats older than 12 weeks selected from an inbred nude strain (RH-Foxn1<sup>nu</sup> rats) will be used when immunodeficient animals are required, [REDACTED] will be implanted (e.g. human cells)

### 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

No *in vitro* options are currently available to fully recapitulate the complexity of new bone formation or the combination of all the players involved in new tissue vascularization. Further, connection to the blood supply and invasion of (stem) cells from the host can only be mimicked in an animal model. For these reasons, the use of an animal model is a necessity in order to test the regenerative potential of the developed constructs.

#### Reduction

The available *in vitro* methods to pre-screen cell behavior and cytocompatibility of the constructs will be part of the evaluations before progressing to animal studies, as shown in the flow chart in the appendix. This will ensure that only a promising selection of constructs will progress to the stage of implantation, thus reducing the number of animals used. By performing the first screening in a subcutaneous model, fewer animals are required during the optimization process. Furthermore, 6 different conditions can be tested in one animal. In this way, only the promising substitutes will be tested in an orthotopic defect model (one per animal).

#### Refinement

- Subcutaneous model has been selected as an ideal model for this first screening phase because it allows to evaluate the regenerative potential of the implants (evaluating the ectopic bone formation). At the same time, it allows to compare multiple conditions within an animal, reducing the total amount of rats required.
- *In vivo* bone formation analysis will be performed using a microCT under adequate anaesthesia.
- Follow-up will be daily for one week after surgery, after that a minimum of one time weekly.
- The researches will be trained in order to perform the implantation as atraumatic as possible.

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



on the environment.

To reduce animal fear, the researcher will get the animals used to their presence, practicing the handling procedures before the surgery. During surgery, respiration will be observed continuously and both before and after surgery the animals will be placed on a heating mat. The rats will be returned to routine housing after they have recovered from anaesthesia and paired once the wounds are closed. Standard housing conditions will be allowed post-op.

## Repetition and duplication

### E. Repetition

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

N.A.

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

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

No

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

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

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

## Classification of discomfort/humane endpoints

### H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Analgesia is provided by a subcutaneous injection of pain medication, before surgery and twice per day until 3 days after surgery. Where applicable, additional local analgesics might be used. Adequate anaesthesia will be provided during the surgery and every time it will be needed (*e.g.* during microCT scan).

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

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



Adverse events:

- 1) Skin irritation due to subcutaneous injections: mild (expected occurrence based on previous experients: 5-10%)
- 2) Rats might bite and remove the stitches before the wounds are completely closed: mild, might cause irritation and a delay in wound closure (expected occurrence based on previous experiences: 5%)
- 3) Infection might occur at the surgical site: mild to moderate according to the infection (expected occurrence based on previous experiences: 1%)

Explain why these effects may emerge.

It has been observed that the animals might show some irritation due to the subcutaneous injections, especially when fluorochromes are used to assess bone formation. If this is the case, a different location will be used for the following injections. Rats might also bite and remove the sutures before the wounds are completely closed. This might cause a delay in wound closure and/or infection. In case of failing sutures in unclosed wet wounds, the wound will be cleaned, debrided and re-sutured under adequate anaesthesia. Only in case of falling out of the implant outside the pocket, the sample will be excluded. The other pockets from the same animals will still be included, unless the human end-point has been reached.

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

Animal's breathing will be regularly checked during and after surgery and every time anaesthesia is induced. The adequate depth of narcosis will be monitored by observing the animal's respiration and testing whether the animal is still awake before starting any procedure. Animals will be housed singularly for up to 3 days after the surgery to allow full wound closure. Tools used during the surgery are sterile, to prevent an infection to occur.

#### **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.

Rats will be closely monitored on general well being. If abnormalities are observed, the veterinarian will be consulted, and based on the severity of discomfort the animal will be euthanized.

Complications that have been observed with this model in the past:

- Rarely, after implantation, a local infection occurs.
- Also, irritation after injections may occur.
- Rats might chew on sutures and/or implanted samples

The animal will be euthanized if scoring  $\geq 2$  in the following list: infection of surgical sites (2), visible spine or ribcage (2), panting (1), salivation (1), immobility (2), persistent tremors (2), persistent convulsions (2), self-mutilation (2), pilo erection (2), abnormal posture (1).

Furthermore, the weight of the animals will be closely monitored and will be used as an additional indicator of animal (dis)comfort. A relevant unacceptable weight loss within a few days in comparison to its peers will be considered a humane endpoint.

Indicate the likely incidence.

5%

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

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

Expected discomfort:

- 1) Animal discomfort due to the eventual presence of filter top cages: mild
- 2) Animal discomfort due to the handling: mild
- 3) Animal discomfort due to the subcutaneous injections: mild
- 4) Animal discomfort due to the surgery: moderate
- 5) Animal discomfort due to the anaesthetic induction: mild
- 6) Animal discomfort and pain postoperatively due to the bone substitute implantation with adequate pain

medication: mild

7) Animal discomfort due to the euthanasia under anaesthesia: mild

Cumulative discomfort:

Moderate

---

## End of experiment

### L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

The implanted constructs need to be explanted for further analysis.

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

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

Yes



## Appendix

### Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website ([www.centralecommissiedierproeven.nl](http://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'. | 11500                    |   |
| 1.2 Provide the name of the licenced establishment.  | UMC Utrecht              |   |
| 1.3 List the serial number and type of animal procedure.   | Serial number<br>3.4.4.2 | Type of animal procedure<br>AV loop model in rats |

*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.

###### *Experimental approach:*

The creation of an arteriovenous (AV) loop model for bone engineering is thought to be suitable for direct anastomosis and improvement of blood circulation in the implanted osteogenic construct, immediately after implantation. In this way, sprouting and blood vessel invasion is known to be faster, reducing the formation of a necrotic core in the implant. This model will be used as a screening step to identify which combination of scaffold, cell types and growth factors will most benefit vasculogenesis/angiogenesis and bone formation inside implanted constructs. The criteria that need to be met *in vitro* before moving to this *in vivo* model are described in section 3.1.3 of the project proposal.

The AV-loop model will be used for the second aim of the project: to create a mm-scale vessel to sprout and support engineered bone. The rat type [REDACTED] will be chosen depending on the required implantation [REDACTED] on the specific research question.

###### *Outcomes:*

Two main outcome parameters will be evaluated in this model: blood vessel sprouting and new bone formation. Both parameters will be evaluated at early and late time points.

###### *Vessel outcomes:*

- Primary outcome: The vascular structures will be evaluated with microCT using MICROFIL® after the end of the experiment.
- Secondary outcome: The organization and quality of the vascular network will be investigated by (immuno)histochemical staining techniques for several markers involved in vascularization.

#### Bone outcomes:

- Primary outcome: *In vivo* bone formation will be assessed by microCT analysis.
- Secondary outcome: Fluorochrome labelling will be administered at various time points after the implantation to monitor the progression of bone formation.
- Secondary outcome: Histology of the explants will confirm the nature of mineralized tissue as detected by micro-CT. Paraffin and/or MMA-embedded tissue sections will be stained with (immuno)histological stainings to identify the bone tissue and associated cells. After the explantation, *ex vivo* analysis will be performed to complement the information obtained with the microCT. In particular, bone content and remodelling will be evaluated via histological and immunohistochemical analysis.

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

#### Animal procedures (29)

The rats are allowed at least one week of acclimatization before the start of the experiment. Open or filter top cages will be selected according to the rat strain that it is used and will be specified in the work protocol (e.g. filter top cages will be used in case of immunocompromised animals). They will be housed in pairs, except for 2-3 days following surgery. Rats will be maintained on rodent chow and water ad libitum.

#### Anesthesia protocol

All operations will be performed under adequate anaesthesia specific for the animal species and the procedure.

#### Pain management

Adequate analgesia is provided to the animals before induction of the surgery and afterwards to minimize the discomfort of the animals.

#### Antiseptic techniques

All operations will be performed under aseptic conditions. The surgeon will wear scrubs, gown, mask and gloves. After shaving of the animal, the skin will be disinfected with ethanol and the surgical site will be draped. To reduce perioperative infection risk, all rats receive a single dose of antibiotics before surgery. All surgical equipment will be sterilized before the surgery.

#### Surgical techniques

AV loop model: This procedure has already been performed and described by [REDACTED] groups (29,30). Researchers carrying out the procedure in our group will be trained in microsurgery.

A femoral vein graft (approximately 10 mm) will be harvested from the groin and flushed with heparinized saline solution. This graft can be used to create an AV-loop; an analogous procedure is performed to expose the inguinal ligament and the femoral vessel on the contralateral limb. Using microsurgery tools, the femoral artery and vein are cut transversely and the blood is flushed out. The previously prepared vein graft is anastomosed to the recipient femoral vein and artery. A synthetic chamber *can* be introduced to keep the AV-loop in place and to create a niche in which hydrogels, cells and/or growth factors can be loaded. The AV-loop will then be positioned in the tissue chamber. The chamber will be secured on the underlying muscular fascia with sutures. After insertion of the implant into the defect, the fascia and skin are sutured on both sides in layers (30). Future tissue engineering perspectives are on the generation of vascularized bone tissue by incorporation of a synthetic vascular graft. As such, no autologous vessels from the other limb are necessary anymore for the creation of an AV-loop in an osteogenic construct. Therefore, also synthetic vascular grafts will be used for the creation of an AV-loop in a defined chamber or used as a graft for end-end artery-artery or vein-vein anastomosis, *eg.* in the groin or abdominal aorta. The dissection method will be the same as the one stated above; only, the use of the femoral vein from the donor leg will not be necessary anymore as it will be replaced by the synthetic vascular graft. Alternatively, this model with a straight vascular supply might be used instead of the AV-loop model for investigating optimal construct compositions.

Estimated time of surgery per animal: 1.5 hours.

#### Postoperative care

The rats are postoperatively treated with the analgesic as previously described. They will be housed separately

until wounds are closed (typically 1-3 days). After, they will be housed in pairs, keeping the same pairs before and after surgery. In case of failing sutures, the wound will be cleaned, trimmed and re-sutured under anesthesia. The weight of the rats will be examined closely after surgery.

#### Bone regeneration measurements

For the *in vivo* bone formation analysis by microCT, the rats are sedated (approximate handling time: 15 minutes). Furthermore, depending on the specific research question, they might receive fluorochrome marker injection at varying time points, postoperatively.

#### Euthanasia protocols

The rats will be euthanized according to one of the methods listed in the appendix IV of directive 2010/63/EU. Methods will be selected based on their influence on vascular interference and compatibility with Microfill injection. The implants will be retrieved afterwards.

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

A description of the different phases in this project is described below. Groups will be formed with variations in hydrogel, progenitor cells and/or growth factors and synthetic grafts, and inserted in the chambers. In the table, a schematic representation of a possible combination of the variables is displayed:

| <b>Variables</b>   |  |                                     |
|--|--|-------------------------------------|
| 1) Biomaterials (e.g. hydrogels, synthetic polymers, osteoinductive materials, synthetic vascular graft) | 2) Progenitor cells (e.g. osteoprogenitor, endothelial progenitor cells) | 3) Growth factors (e.g. VEGF, BMPs) |

An example of a power analysis on a possible experiment is made for phase 2, based on vascular outcomes [34]. For example, 4 groups can be made, based on the 3 variables that can be combined (hydrogel (control); hydrogel + cells; hydrogel + growth factor; hydrogel + growth factor + cells) with an additional 2 groups if we have additional sub-variables (eg. extra cell types or synthetic vessel graft); this thus ends up to a maximal of 6 groups. A power analysis (one way anova; Tukey) was performed based on the vasculature outcome parameter at the end of the follow up period. The power analysis was performed according to the Lenth, R. V. (2006-9. Java Applets for Power and Sample Size [Computer software]; Retrieved March 22nd, 2017 from <http://www.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power>). A detectable contrast of 30% is set, with a standard deviation of 0.17. The number of comparisons is thus set at 6. A total amount of 12 rats per experiment is calculated, with an additional drop-out rate of 2 animal already included (based on both bone and vascular outcome parameters (31). Calculations and drop-out rates were made, based on publications of the group of Andreas Arkudas, M.D., and Ulrich Kneser M.D (for example: (31)).

All calculations above were based on this paper and made for both the osteogenic and vasculogenic primary outcome parameters: they did display the same n of animals. The amount of animals per comparison typically used in the described experiments of Arkudas *et al* range from 6 to 19.

The highest number of animals for this experiment then includes  $12 * 6 = 72$  rats. Both phase 2 and phase 3 are expected to comprise 2 (independent) experiments. The estimated maximum amount of animals for all phases (n=12) is expected to be 4 experiments \* (12 (n) \* 6) = 288 rats. Additionally, to perfect surgical skills the pilot phase (phase 1), 2 (researchers with microsurgical course) \* 4 (animals to practice) = 8 practice rats will add this amount up to 296 rats. The exact amount of animals and groups of each experiment will be defined consulting a statistician and the animal welfare body and it will be specified in the work protocol.

#### - **Pre-experimental phase**

The researchers carrying out this procedure will be trained in microsurgery for a week. Moreover, pre-experimental practicing will be carried out on cadavers (4 animals; surplus rats from other groups). Only cadavers with hind legs and blood vessels that are not affected in the previous handlings will be included. Handlings that will be practiced here involve isolation of the femoral vein, connection to femoral artery and suturing techniques or anastomosis with a synthetic graft. Also, the placement and attachment of the chamber will be optimized in this step. This extra step will contribute to

refinement of the procedures and of the experiments.

- **First phase – Pilot**

The pilot phase is divided in 2 parts with both its own group of rats (4 rats per group).

First, the procedure of anastomosis (autologous or synthetic graft) will be optimized in living animals. Possible problems with blood flow and vessel leaking, such as thrombosis, will be identified in this phase. No chamber (previously described) will be used in this group. Animals will be observed over a short time period.

After success in the first group, a second group will be operated in which the procedure will be elaborated by means of addition of a sample chamber (as described in 'surgical techniques'), with or without hydrogel addition. Possible problems with irritation of the chamber on the hind leg will be observed in this phase. Animals will be observed over a short time period.

- **Second phase**

The different experiments will not be carried out at the same time in the animals, but instead, independent experiments will be performed over time. The different experiments will contain different variables and sub-variables (eg. other progenitor cells and/or growth factors). In this long-term phase of the study, the experiments will be used to examine the influence of growth factor (involved in vasculogenesis/angiogenesis) and/or cells in the chamber on vascular sprouting. Therefore, in this phase groups can be formed based on defined combinations of biomaterials, endothelial progenitor cells, growth factors and/or synthetic vascular grafts.

- **Third phase**

Also here, the different conditions will not be carried out at the same time in the animals, but instead, several independent experiments will be performed over time with different variables. In the long-term third phase of the experimental set up, the influence of growth factor (involved in osteogenesis) and/or cells in the chamber on vascular sprouting and osteogenic differentiation will be evaluated. We will continue with the optimal condition for vascular sprouting found in phase 2. Therefore, the final combinations of the groups to be assessed, should be determined after the results of phase 2. Groups can for example be formed based on combinations of hydrogels, (osteogenic) progenitor cells, growth factors, synthetic vascular grafts and/or calciumphosphates.

---

## **B. The animals**

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

A maximum of 296 rats will be included in this appendix.

- Skeletally mature rats are needed for this model, therefore 12 week old male rats will be selected from an inbred rat strain (e.g. Fischer 344, Brown Norway or Lewis) and will be purchased from a registered breeder (eg. Charles river). The male rats have been identified as a suitable, reliable and reproducible model when immunocompetent animals are needed, as stated in references (29, 30,32). Only male rats will be selected as there needs to be sufficient room for the placing of the chamber in the groin; the smaller skeletal size of female rats will not provide this needed space. Furthermore, male and female rats show a different bone metabolism (22,23, 27,28). When using a mixed sex population, this will be likely to cause a strong increase in the observed variance. We therefore aim to use male rats only.
- 12 week old male rats from an inbred nude strain (RH-Foxn1<sup>rnu</sup> rats) will be used when immunodeficient animals are required. This model is the best option if the influence of the immune response on bone tissue regeneration is not the main research question and when xenogeneic or allogeneic cells or tissues are implanted.

---

## **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

Extensive *in vitro* research has been carried out on the subject of osteogenic differentiation in combination with vasculogenesis/angiogenesis (3D hydrogel co-cultures) and bloodvessel engineering in our lab. No *in vitro* options are currently available to fully recapitulate the complexity of new bone formation and remodelling, to model the complex interactions of the regenerative process with the immune system, or to evaluate the integration of the capillaries to the host circulation. Therefore, the use of an animal model is fundamental.

##### Reduction

The number of rats cannot be reduced more than has been done already, as only 1 construct per rat is feasible. Inclusion of more chambers per rat will lead to elevated discomfort for the animal. Moreover, only 1 donor vessel can be harvested per animal in the groups without the synthetic graft. Reduction of the amount of animals is achieved by having the *in vitro* 3D hydrogel model in our lab, for testing of progenitor cell combinations in combination with growth factors. With this pre-selection method, only promising combinations will be used in the transition from *in vitro* to *in vivo*.

##### Refinement

This model has already been described in papers of other groups; their experience will help us with refining the operation and we can build on their experience to determine the most innovative groups, type of implants and defining the outcome parameters. Also, the project has been built up in different phases. Only the best results from phase 2 will be used in phase 3, leading to refinement of the project and reduction of the number of animals. Moreover, considering the complexity of the surgery, the researchers will be extensively trained in order to reduce the implant failure to the minimum. During the follow up time, the animals will undergo microCT (under adequate anaesthesia), therefore data will be collected on bone formation at various time points without the need for additional animals.

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

The rats will have at least 1 week to acclimatize to the new environment before surgery. To reduce animal fear, the researcher will get the animals used to their presence, practicing the handling procedures before the surgery. During surgery, respiration will be observed continuously and both during and after surgery the animals will be placed on a heating mat. The rats will be returned to routine housing after they have recovered from anaesthesia and will be paired once the wounds are closed. They will be maintained on rodent chow and water ad libitum. Cage enrichments and bedding materials will be provided. For specific information see refinement.

### **Repetition and duplication**

#### **E. Repetition**

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

N.A.

### **Accommodation and care**

#### **F. Accommodation and care**

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



No

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

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

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

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

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

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Adequate analgesia is provided before and after the surgery. Further, adequate anaesthesia is provided during surgery and when required (*e.g.* during microCT)

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

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

Adverse events that might occur:

- 1) Skin irritation due to subcutaneous injections: mild
- 2) Rats might bite and remove the stitches before the wounds are completely closed: mild, might cause irritation and a delay in wounds closure
- 3) AV loop occlusion or failure (20% rates have been reported previously): moderate pain, might reduce the mobility of the animal (29,32)
- 4) discomfort when walking: mild
- 5) Infection might occur at the surgical site: mild to moderate according to the infection

Explain why these effects may emerge.

- 1) It has been reported before that subcutaneous injections might cause skin irritation, specifically for fluorochromes. If this is the case, a different location will be used for the following injections.
- 2) Rats might also bite and remove the sutures before the wounds are completely closed. This might cause a delay in wound closure.
- 3) It has been reported before that the creation of an AV loop can lead to thrombosis and occlusion of the vessels due to the handling of the blood vessels and the disturbance of the blood flow (29,32).
- 4) discomfort with walking can be caused by the placement of the chamber in the groin
- 5) Infection at the surgical site can occur due to unsterile handling of due to biting on the wound.

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

Animal's breathing will be regularly checked both during and after the surgery and every time anaesthesia is induced. The adequate depth of narcosis will be monitored by observing the animal respiration and testing



whether the animal is still awake before starting any procedure.

2) Animals will be housed singularly to prevent biting on each other wounds, and will be housed together as soon as the wounds are healed.

3) To prevent vessel occlusion or the formation of thrombi, microsurgery tools will be used. Further, researchers will follow an adequate microsurgery training, to handle the vessels in the least traumatic way possible.

4) The circulation of the lower limb will be closely monitored by gross inspection, in particular signs of swelling or oedema will be examined. If an unexpected adverse event will occur, the adequate actions will be taken, in consultation with the veterinary where required (see the section below).

5) Tools used during the surgery are sterile, to prevent infections.

#### **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.

Rats will be closely monitored on general wellbeing. Also, weight loss will be monitored as an indication when assessing the humane endpoint. If abnormalities are observed, the veterinarian will be consulted, and based on the severity of discomfort the animal will be euthanized.

Local infection or failure of the vessel anastomosis might occur. The animal will be euthanized if scoring  $\geq 2$  in the following list: infection of surgical sites that can not be treated with antibiotics (2), weight loss during the entire length of the experiment (visible spine or ribcage (2)), panting (1), salivation (1), immobility (2), persistent tremors (2), persistent convulsions (2), self-mutilation (2), pilo erection (2), abnormal posture (1), oedema and swelling (1-2 according to the severity).

Indicate the likely incidence.

<20% (32,34,35)

#### **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').

Expected discomfort:

- 1) Animal discomfort due to the eventual presence of filter top cages: mild
- 2) Animal discomfort due to the handling: mild
- 3) Animal discomfort due to the subcutaneous injections: mild
- 4) Animal discomfort due to the surgery: moderate
- 5) Animal discomfort due to the anaesthetic induction with isoflurane: mild
- 6) Animal discomfort and pain postoperatively due to the AV loop formation and vein graft harvest with adequate pain medication: moderate
- 7) Animal discomfort due to microCT analysis: mild
- 8) Animal discomfort due to the euthanasia under anaesthesia: mild

Cumulative discomfort:

Moderate

### **End of experiment**

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

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

The animals will be euthanised at the endpoint as it is necessary to explant the construct to perform histological analysis

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

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

choice.

Yes

## Appendix

### Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website ([www.centralecommissiedierproeven.nl](http://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'. | 11500         |  |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment.  | UMC Utrecht   |  |
| 1.3 | List the serial number and type of animal procedure.   | Serial number | Type of animal procedure                       |
|     |  | 3.4.4.3       | Intramuscular+orthotopic+AV loop model in goat |

*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.

One goat can accommodate three different types of defect and/or surgical procedures:

- 1) arteriovenous (AV) loop in a bone defect (orthotopic)
- 2) bilateral 17 millimetre diameter critical size os ilium defect (orthotopic)
- 3) a maximum of four implants positioned in the paraspinal muscles (ectopic)

*The three defect types will be seen as independent experiments*

The use of a large animal model is required in order to assess the feasibility of scaling up the size of a bone regenerative construct to clinically relevant dimensions (e.g. at least 1cm<sup>3</sup>). Studies involving a rat AV loop model (described in 3.4.4.2) will precede the goat studies described here. Overall, the size of the defects in the goat model and their rate of bone formation comparable to humans, make this an attractive bone regenerative model. Large samples can be implanted to investigate if inclusion of an AV loop or other construct properties can enhance bone regeneration in large samples. Typically, implantation of small samples in small animal models cannot answer these dimensional questions.

The combination of implantation at orthotopic and ectopic locations allows the comparison of implant performance in an osteoconductive and a non-osteoconductive environment.

The three surgical procedures will be performed during the same surgical session, obviating an additional anaesthetic procedure. This will reduce the discomfort of the involved animals.

The above porcedures will be used for the second aim of the project, to create a mm-scale vessel to sprout and support engineered bone

*Outcomes:*

The main goal of this step is to evaluate the regenerative potential of the developed constructs when focusing on upscaling of implantation size. The primary outcome that will be evaluated is new bone formation. To establish the onset of bone formation, fluorochrome labels (secondary) might be administered at different time points after implantation. Additionally, when an AV loop is included in the study, sprouting and new vessels formation can be evaluated using MICROFIL®. After the explantation, *ex vivo* analysis will be performed to complement the information obtained via X-ray. In particular, bone content and remodelling will be evaluated via histological and immunohistochemical analysis.

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

Animal procedures (33,34)

The animals will be housed together at the Central Laboratory Animal Institute (Utrecht University) for the entire duration of the study, in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU, in an establishment that is licenced by the Dutch authorities (NVWA). One week is given as acclimatization period before the start of the experiment. The goat will be kept in social housing with enrichment (e.g. toys and bedding material) and sufficient freedom of movement will be guaranteed. Each animal will be identified with an ear tag and unique code. Food and water are provided ad libitum besides up to 24h prior to operation, to limit regurgitation (10).

Anesthesia protocol

All operations will be performed under adequate anaesthesia specified for the animal and the procedure. Their vital parameters will be monitored constantly.

Pain management

Adequate analgesia is provided to the animals before induction of the surgery and afterwards to minimize the discomfort of the animals.

Antiseptic techniques

The surgery procedure will be performed under aseptic conditions. The surgeon will wear sterile scrubs, gloves, mask and gown. After shaving, the skin will be disinfected with iodine and the surgical site will be draped. To reduce perioperative infection risk, animals will be treated with prophylactic antibiotics once before surgery. In addition, antibiotics will be administered.

AV loop surgical technique, Os ilium defect and intramuscular implantation.

AV loop model: This model has been adapted from previously described procedures (8,9). A long skin incision is made in the left submandibular region. After identification of the facial vessels, a critical size defect is created using a custom-made drill. The implant (content is based on findings described in the procedures for the rat AV-loop model and previous described findings (8,9)) will be fixed to the mandible with screws and, using a surgical microscope, the facial vessels will be anastomosed in order to create an AV fistula around the implant or within a special groove. The wound will be closed in layers. The same procedure can also be performed in the contralateral hemimandible (10).

Os ilium defect: The surgical procedure has been already performed successfully and described in detail previously (34). Two central skin incisions of the dorsal lumbar area are made to expose the iliac crest, it is cleared of muscle tissue and the os ilium is exposed by elevation of the periosteum. The intended defect location is on the dorsal and lateral side. A critical size defect is performed using a custom-made drill. During the drilling, a constant cooling with sterile saline will be performed. The explanted bone might be used as autograft control, whereas the implant is press fit into the defect. The periosteum will be sutured back to its original position to keep the samples in place. The muscles, the fat tissue and the skin over the defect are going to be sutured using resorbable sutures.

Intramuscular defect: In the shaved lumbar area, skin incisions are performed to create pockets. The muscle fascia is exposed and cut. Using blunt dissection, an intramuscular pocket is created. After filling the pockets, the fascia and the skin will be closed with resorbable suture(33).

Estimated operation time: 4 hours (if receiving all three defect types)

### Postoperative care

The goats are postoperatively treated with analgesics and antibiotics. The animals will be housed separately postoperatively for approximately 1 day, after which they will be housed together. In collaboration with the Central Laboratory Animal Institute staff members, animals will be closely monitored on general wellbeing after surgery. Additionally, their weight will be monitored weekly throughout the study. When surgical complications are encountered in one or more animals, risk of severe discomfort will be discussed with the veterinarian. In case of AV loop implantation in the mandible, only oral fluids will be allowed during the first postoperative day, with gradual return to normal diet. Unrestricted weight bearing and activity will be allowed post-op.

### Bone regeneration measurements

According to the specific research question, goat might receive fluorochrome markers at different time points.

### Euthanasia protocols

After sedation, animals will be euthanized according one of the methods listed in the appendix IV of directive 2010/63/EU. Methods will be selected based on their influence on vascular interference and compatibility with Microfill injection. Subsequently, the tissues of interest will be retrieved and their analyses will be performed post-mortem.

---

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

An example of a power analysis on a possible experiment is made, the total amount of animals is based on this estimation. Where possible, the three different models (i.e. AV loop, iliac crest, intramuscular) will be combined in the same animals to reduce the total number of animals involved in the study. The three different models will be seen as independent experiments, and thus not compared to each other; comparisons will be made within one model/experiment-type. Variables which can be included in the constructs are displayed in the table below. Since several screening and optimization steps will be performed in rodents (appendix 3.4.4.1&2), only the most promising conditions will be tested in this large animal setting.

| <b>Variables</b>   |  |                                     |
|--|--|-------------------------------------|
| 1) Biomaterials (e.g. hydrogels, synthetic polymers, osteoinductive materials, synthetic vascular graft) | 2) Progenitor cells (e.g. osteoprogenitor, endothelial progenitor cells) | 3) Growth factors (e.g. VEGF, BMPs) |

To determine the required amount of animals, a power analysis based on a previously published study (bone outcome parameters) was performed (34) (with online tool at <http://homepage.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/>). The sample size has been calculated considering the AV loop model as the limiting element, since it is possible to implant 1 AV loop per animal but up to 2 os ilium defects and 4 intramuscular pockets. Here we assume to find 3 optimal combinations of variables after the first screening step (AV-loop rat model 3.4.4.2) to be evaluated in the mandibular AV loop model. For example, material X with cells, material X with growth factor A, and materials X with cells and growth factor A. with Further, a suitable control condition is included in the experimental set up (e.g. the material only). A contrast of 30.5% can be detected with a power of 80%, a standard deviation of 0.17 and  $\alpha=0.05$ , based on previous findings from Eweida *et al.*, 2014 (9,11). This gives an n=8 animals per comparison. The AV loop model is considered the most critical part of the surgery and previous research has shown a 15% drop out due to occlusion of the loop using a similar method (10). Therefore a total number of 2 animals per comparison is required when this drop-out rate is taken into account: n=10. This means that a total amount of goats is estimated at  $4 \times 10$  (3 experimental conditions+ an adequate control condition) = 40 animals in total.

The exact amount of animals and groups for each experiment will be defined consulting a statistician and the animal welfare body and it will be specified in the work protocol.

---

## **B. The animals**

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

A maximum of 40 animals will be used. Adult male goats will be used in this study, as it allows the implantation of bone substitutes of clinically relevant size and has been described to be a sufficient animal model for the experimental outcomes we are interested in (9,11,34). The goats need to be approximately 3 years old as after

only 32 months all permanent molars and incisors are erupted and all bones are fused, and not interfering with the placing of the AV loop in the mandible and/or growth (35). As it has been reported that female hormones can have a negative influence on bone formation, the use of female goat has been precluded for this bone study (22,23,27,28). Animals will be purchased from a Dutch farmer via GDL contact.

### 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

Extensive *in vitro* research has been carried out on the subject of osteogenic differentiation in combination with vasculogenesis/angiogenesis (3D hydrogel co-cultures) and bloodvessel engineering. Unfortunately, no *in vitro* options are currently available to fully recapitulate the complexity of new bone formation and remodelling, to model the complex interactions of the regenerative process with the immune system, or to evaluate the integration of the capillaries to the host circulation. Therefore, the use of an animal model is fundamental. The decision for a large animal made, is based on answering the research aim to mimic a clinically relevant size and situation, and is needed in order to assess the feasibility of scaling up the size of a bone regenerative construct to clinically relevant dimensions (e.g. at least 1cm<sup>3</sup>). For these reasons, the use of a large animal model is required in order to truly determine the clinical potential of the developed constructs (project proposal 3.4).

#### Reduction

By combining the three different types of defect (optimized in a rat model), a relatively small group of animals will be required, as several research questions can be tested at the same time.

#### Refinement

- The goat will receive adequate anaesthetics to prevent harm during surgery.
- Adequate analgesia medication will be administered after surgery to prevent harm post-operatively.
- Only oral fluids were allowed during the first postoperative day, with gradual return to normal diet within 3 days.
- In case of abnormalities, adverse events or unnecessary discomfort, a veterinarian will be consulted.
- To prevent the formation of thrombi, before opening of the anastomosis and post-operatively, anticoagulant drugs will be administered (e.g. heparin).

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

The goat will have at least 1 week to acclimatize to the new environment before surgery. Cage enrichments and bedding materials will be provided. During and right after surgery, respiration will be monitored continuously. Afterwards, animals will be returned to routine housing. To assess their well being, animals will be weighed weekly throughout the study. Cage-side observations will include, but not be limited to, changes in skin, eyes and mucous membranes and behaviour pattern. For specific information see refinement.

## Repetition and duplication

### E. Repetition

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

N.A.

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

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

No

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

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

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

## Classification of discomfort/humane endpoints

### H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

To reduce to the minimum the pain, goat will receive before the surgery adequate analgesic. Post operatively, animals will be treated with adequate analgesics daily for 5 days post-surgery. Adequate anaesthesia will be provided.

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

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

Adverse events:

- 1) Infections due to the surgical procedure (<5%): mild
- 2) Removal of the stiches before the wounds are completely closed: mild, might cause irritation and a delay in wounds closure
- 3) Thrombi in case AV loop model is included: moderate, imbalance in the blood circulation will be closely evaluated.
- 4) Occlusions in case AV loop model is included (15%): moderate, imbalance in the blood circulation will be closely evaluated

Explain why these effects may emerge.

The surgery can take up to 4 hours. This might increase the chances of infections. To prevent it, surgeons will

wear sterile scrubs, gloves and gown. Further, after shaving, the skin will be disinfected, the surgical site will be draped and the animals will be treated before and after the surgery with prophylactic antibiotics. To prevent the formation of thrombi or occlusions, anticoagulant will be administered before and after the surgery. Animal circulation will be closely monitored after the surgery. For specific information see the surgery section

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

Animals will be taken care of by trained personnel and their wellbeing will be monitored daily during the entire study. If it is noticed that one or more of the animals is in severe distress, we will consult the veterinarian.

#### **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.

Goat will be closely monitored on general well being. If abnormalities are observed, the veterinarian will be consulted, and based on the severity of discomfort the animal will be euthanized.

Severe wound/implant infections, poor mobility, severe weight loss based on start weight, and impaired wound healing will be considered severe discomfort, in consultation with the responsible staff.

Indicate the likely incidence.

Very unlikely (<10%) to unlikely (15%) if the AV loop model is included

#### **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').

Expected discomfort:

- 1) Animal discomfort due to the analgesia and antibiotics administration: mild
- 3) Animal discomfort due to the surgery: moderate
- 4) Animal discomfort and pain postoperatively due to the bone substitute implantation with adequate pain medication: moderate
- 5) Animal discomfort and pain postoperatively due to the intramuscular implantation with adequate pain medication: mild
- 6) Animal discomfort and pain postoperatively due to the AV loop model with adequate pain medication: moderate
- 7) Animal discomfort due to the euthanasia under anaesthesia: non recovery

Cumulative discomfort: Moderate

### **End of experiment**

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

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

The animals will be euthanised after the long-term follow-up experiment, as it is necessary to explant the construct to perform histological analysis

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

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

Yes



## **Reference List:**

1. Van Heest A, Swiontkowski M. Bone-graft substitutes. *The Lancet*. 1999;353:S28-S9.
2. Ludwig SC, Boden SD. Osteoinductive bone graft substitutes for spinal fusion: a basic science summary. *Orthop Clin North Am*. 1999;30(4):635-45.
3. Liu Y, Lim J, Teoh S-H. Review: Development of clinically relevant scaffolds for vascularised bone tissue engineering. *Biotechnology Advances*. 2013;31(5):688-705.
4. Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: An update. *Injury*. 2005;36(3, Supplement):S20-S7.
5. Conrad EU, Gretch DR, Obermeyer KR, Moogk MS, Sayers M, Wilson JJ, et al. Transmission of the hepatitis-C virus by tissue transplantation. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 1995;77(2):214-24.
6. Evans CH. Barriers to the clinical translation of orthopedic tissue engineering. *Tissue engineering Part B, Reviews*. 2011;17(6):437-41.
7. Gawlitta D, Farrell E, Malda J, Creemers LB, Alblas J, Dhert WJA. Modulating Endochondral Ossification of Multipotent Stromal Cells for Bone Regeneration. *Tissue Engineering Part B: Reviews*. 2010;16(4):385-95.
8. Weigand A, Beier JP, Hess A, Gerber T, Arkudas A, Horch RE, et al. Acceleration of vascularized bone tissue-engineered constructs in a large animal model combining intrinsic and extrinsic vascularization. *Tissue engineering Part A*. 2015;21(9-10):1680-94.
9. Eweida AM, Nabawi AS, Abouarab M, Kayed M, Elhammady H, Etaby A, et al. Enhancing mandibular bone regeneration and perfusion via axial vascularization of scaffolds. *Clinical oral investigations*. 2014;18(6):1671-8.
10. Beier JP, Horch RE, Hess A, Arkudas A, Heinrich J, Loew J, et al. Axial vascularization of a large volume calcium phosphate ceramic bone substitute in the sheep AV loop model. *J Tissue Eng Regen Med*. 2010;4(3):216-23.
11. Eweida AM, Nabawi AS, Elhammady HA, Marei MK, Khalil MR, Shawky MS, et al. Axially vascularized bone substitutes: a systematic review of literature and presentation of a novel model. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2012;132(9):1353-62.
12. Visser J, Gawlitta D, Benders KE, Toma SM, Pouran B, van Weeren PR, et al. Endochondral bone formation in gelatin methacrylamide hydrogel with embedded cartilage-derived matrix particles. *Biomaterials*. 2015;37:174-82.
13. Gawlitta D, Benders KE, Visser J, van der Sar AS, Kempen DH, Theyse LF, et al. Decellularized cartilage-derived matrix as substrate for endochondral bone regeneration. *Tissue engineering Part A*. 2015;21(3-4):694-703.
14. Seyednejad H, Gawlitta D, Kuiper RV, de Bruin A, van Nostrum CF, Vermonden T, et al. In vivo biocompatibility and biodegradation of 3D-printed porous scaffolds based on a hydroxyl-functionalized poly(epsilon-caprolactone). *Biomaterials*. 2012;33(17):4309-18.
15. Boot W, Moojen DJ, Visser E, Lehr AM, De Windt TS, Van Hellemond G, et al. Missed low-grade infection in suspected aseptic loosening has no consequences for the survival of total hip arthroplasty. *Acta orthopaedica*. 2015;86(6):678-83.
16. Boere KW, Visser J, Seyednejad H, Rahimian S, Gawlitta D, van Steenberg M, et al. Covalent attachment of a three-dimensionally printed thermoplast to a gelatin hydrogel for mechanically enhanced cartilage constructs. *Acta Biomater*. 2014;10(6):2602-11.
17. Prins HJ, Braat AK, Gawlitta D, Dhert WJ, Egan DA, Tijssen-Slump E, et al. In vitro induction of alkaline phosphatase levels predicts in vivo bone forming capacity of human bone marrow stromal cells. *Stem cell research*. 2014;12(2):428-40.
18. Fedorovich NE, Kuipers E, Gawlitta D, Dhert WJ, Alblas J. Scaffold porosity and oxygenation of printed hydrogel constructs affect functionality of embedded osteogenic progenitors. *Tissue engineering Part A*. 2011;17(19-20):2473-86.
19. Gawlitta D, Fledderus JO, van Rijen MH, Dokter I, Alblas J, Verhaar MC, et al. Hypoxia impedes vasculogenesis of in vitro engineered bone. *Tissue engineering Part A*. 2012;18(1-2):208-18.
20. Kolk A, Handschel J, Drescher W, Rothamel D, Kloss F, Blessmann M, et al. Current trends and future perspectives of bone substitute materials - from space holders to innovative biomaterials. *Journal of cranio-maxillo-facial surgery : official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery*. 2012;40(8):706-18.
21. van Gaalen SM, Kruyt MC, Geuze RE, de Bruijn JD, Alblas J, Dhert WJ. Use of fluorochrome labels in in vivo bone tissue engineering research. *Tissue engineering Part B, Reviews*. 2010;16(2):209-17.

22. Sample, S.J., et al., *Functional adaptation in female rats: the role of estrogen signaling*. PloS one. 2012;7(9):e43215.
23. Strube, P., et al., *Sex-specific compromised bone healing in female rats might be associated with a decrease in mesenchymal stem cell quantity*. Bone. 2009 Dec;45(6):1065-72.
24. Arakawa, K., et al., *Effects of the estrous cycle and ovarian hormones on central expression of interleukin-1 evoked by stress in female rats*. Neuroendocrinology. 2014;100(2-3):162-77. PubMed PMID: 25300872.
25. Hong, L., et al., *Steroid regulation of proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells: a gender difference*. J steroid Biochem Mol Biol. 2009 Apr;114(3-5):180-5.
26. Calis, M., et al., *Estrogen as a novel agent for induction of adipose-derived mesenchymal stem cells for osteogenic differentiation: in vivo bone tissue-engineering study*. Plastic and reconstructive surgery. 2014 Apr;133(4):499e-510e.
27. Tissue Engineering for the Hand: Research Advances and Clinical Applications 2010 by James Chang and Gaurav Gupta. Chapter 6, Animals models for engineering tissue in the upper extremities.
28. Engin, A.E., L.R. Toney, and J.A. Negulesco, *Effects of oestrogen upon tensile properties of healing fractured avian bone*. Journal of Biomedical Engineering, 1983. **5**(1): p. 49-54.
29. Kneser, U., et al., *Engineering of vascularized transplantable bone tissues: induction of axial vascularization in an osteoconductive matrix using an arteriovenous loop*. Tissue Eng, 2006. **12**(7): p. 1721-31.
30. Weigand, A., et al. The Arteriovenous (AV) Loop in a Small Animal Model to Study Angiogenesis and Vascularized Tissue Engineering. *J. Vis. Exp.*(117), e54676, doi:10.3791/54676 (2016).
31. Gregor Buehrer et al., *Combination of BMP2 and MSCs Significantly Increases Bone Formation in the Rat Arterio-Venous Loop Model*. Tis. Eng. A. Vol 21, 2015
32. Polykandrotis, E. et al., *The venous graft as an effector of early angiogenesis in a fibrin matrix*. Microvascular Research 75 (2008) 25–33.
33. Kruyt, M.C., et al., *Viable osteogenic cells are obligatory for tissue-engineered ectopic bone formation in goats*. Tissue Eng, 2003. **9**(2): p. 327-36.
34. Kruyt, M.C., et al., *Bone tissue engineering in a critical size defect compared to ectopic implantations in the goat*. J Orthop Res, 2004. **22**(3): p. 544-51.
35. Agfact A7.0.3, second edition 2004 Robert North; Recent Advances in Ageing and Sexing Animal Bones (www. Agric.nsw.gov.au).



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht / Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD1150020172485

**Bijlagen**

2

Datum 4 juli 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 30 juni 2017. Het gaat om uw project "Strategies for vascularized bone regeneration in maxillofacial surgical interventions". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1150020172485. 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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

**Datum:**

4 juli 2017

**Aanvraagnummer:**

AVD1150020172485

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

**Datum:**  
4 juli 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD1150020172485

### **Gegevens aanvrager**

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 11500  
Naam instelling of organisatie: UMC Utrecht / Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht  
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: [REDACTED]  
KvK-nummer: 30244197  
Postbus: 12007  
Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT  
IBAN: NL27INGB0000425267  
Tenaamstelling van het rekeningnummer: Universiteit Utrecht

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

**Over uw aanvraag**

Wat voor aanvraag doet u?

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

**Datum:**

4 juli 2017

**Aanvraagnummer:**

AVD150020172485

**Over uw project**

Geplande startdatum:

1 september 2017

Geplande einddatum:

1 september 2022

Titel project:

Strategies for vascularized bone regeneration in maxillofacial surgical interventions

Titel niet-technische samenvatting:

Strategieën voor gevasculariseerde botregeneratie in kaak- en aangezichtschirurgische

Naam DEC:

DEC-RUG

Postadres DEC:

Postbus 85500 3508 GA Utrecht

E-mailadres DEC:

dec-utrecht@umcutrecht.nl

**Betaalgegevens**

De leges bedragen:

€ 1.541,-

De leges voldoet u:

na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

Verplichte bijlagen:

- Projectvoorstel  
 Beschrijving Dierproeven  
 Niet-technische samenvatting

**Ondertekening**

Naam:

[Redacted]

Functie:

[Redacted]

Plaats:

Utrecht

Datum:

29 juni 2017



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UU-ASC  
Postbus 80.011  
3508 TA UTRECHT  


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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD1150020172485  
**Bijlagen**  
2

Datum 4 juli 2017  
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**  
Factuurdatum: 4 juli 2017  
Vervaldatum: 3 augustus 2017  
Factuurnummer: 172485  
Ordernummer: CB. 841910.3.01.011

| Omschrijving  | Bedrag     |
|---|------------|
| Betaling leges projectvergunning dierproeven<br>Betreft aanvraag AVD1150020172485 | € 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.

**A. Algemene gegevens over de procedure**

1. Aanvraagnummer : 2017.I.543.008
2. Titel van het project : Strategies for vascularized bone regeneration in maxillofacial surgical interventions
3. Titel van de NTS : Strategieën voor gevasculariseerde botregeneratie in kaak- en aangezichtschirurgische ingrepen

## 4. Type aanvraag:

- nieuwe aanvraag projectvergunning  
 wijziging van vergunning met nummer :

## 5. Contactgegevens DEC

- Naam DEC : DEC Utrecht  
Telefoonnummer contactpersoon : 088 – 75 59 247  
Emailadres contactpersoon : dec-utrecht@umcutrecht.nl

## 6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):

- ontvangen door DEC: 13-04-2017  
 aanvraag compleet:  
 in vergadering besproken: 03-05-2017 en 31-05-2017  
 anderszins behandeld:  
 termijnonderbreking(en) van / tot : 08-05-2017/22-05-2017 en 06-06-2017/07-06-2017  
 besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:  
 aanpassing aanvraag:  
 advies aan CCD: 26-06-2017

## 7. De aanvraag is afgestemd met de IvD en deze is hiermee akkoord.

## 8. Eventueel horen van aanvrager

- Datum:
- Plaats:
- Aantal aanwezige DEC-leden:
- Aanwezige (namens) aanvrager:
- Gestelde vragen en verstrekte antwoorden:
- Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag.

## 9. Correspondentie met de aanvrager

- Datum vragen: 08-05-2017
- Datum antwoord: 22-05-2017
- Gestelde vragen en antwoorden:



## Projectvoorstel

- 3.1 Achtergrond: Er is uitvoerig gesproken of deze aanvraag wel één project is, meerdere projecten, of een programma. De onderzoekers presenteren de aanvraag als één project over botregeneratie. Botregeneratie op zichzelf is echter dusdanig algemeen en breed, dat dit wordt gezien als een programma in plaats van een project. De DEC meent dat het minimaal om twee projecten gaat en mogelijk zelfs drie: één project betreft het 'intramembranous' onderdeel, en één project betreft het 'endochondra-█' onderdeel, waarbij het gedeelte over de interactie tussen het implantaat en het █, zeker als men wil gaan onderzoek hoe de reactie van het █, ook nog als een apart project kan worden opgevat. Deze onderdelen zijn onderzoeklijnen die interessante inzichten in botregeneratie kunnen opleveren, maar staan in feite los van elkaar. De DEC verwacht dat de CCD dit zal zien als losse projecten en de onderzoekers zal vragen om de aanvraag op te splitsen. Daarom zou de DEC de onderzoekers adviseren om ofwel losse projecten in te dienen, of duidelijk aan te geven hoe de onderdelen verband houden met elkaar. Dat het subcutane model met de pockets in de rat voor beide onderdelen als model worden gebruikt, is op zich geen argument om het geheel als één project te beschouwen. Daar zijn inhoudelijke argumenten voor nodig. Als de DEC het goed heeft begrepen worden de beschreven onderdelen niet na elkaar uitgevoerd, maar naast elkaar en tegelijk. Wanneer de aanvrager de huidige aanvraag als één project zou willen indienen, dan dient er onderlinge afhankelijkheid tussen de beschreven onderdelen te zijn. Het is de DEC wel duidelijk dat zonder vascularisatie de cellen en constructen niet overleven; wellicht kunnen de onderzoekers hierop inhaken en op die manier duidelijk maken dat de twee onderdelen sterk samenhangen. De DEC zou de onderzoekers willen verwijzen naar het document 'Handreiking Invulling Definitie Project' op de CCD website onder het kopje onderwerpen, of de link:

<https://www.centralecommissiedierproeven.nl/onderwerpen/handreiking-invulling-definitie-project>. In dit document staan een aantal schematisch uitgewerkte voorbeelden. De DEC is van mening dat de aanvraag in zijn huidige format valt onder voorbeeld 4A. Indien de onderzoekers de samenhang kunnen aantonen en beschrijven op het niveau van de onderdelen 'intramembranous' en 'endochondra-█' (o.a. in de flowchart) kan het project wellicht vallen onder voorbeeld 4B. Het verdere verloop van de aanvraag waarbij de in vitro modellen worden beschreven, waarna wordt overgegaan op ratten en vervolgens geiten is helder en komt overeen met voorbeeld 1 van de 'Handreiking Invulling Definitie Project'.

*Er is voor gekozen om de aanvraag op te splitsen in twee projecten: de endochondrale botregeneratie en gevasculariseerde constructen voor botvorming. Voor vereenvoudiging is verder het █ aspect bij de endochondrale aanpak minder benadrukt omdat het inderdaad gaat om een secundaire uitkomstparameter. Hierna zullen de vragen die betrekking hebben op het gevasculariseerde deel beantwoord worden. Dit deel is als een nieuwe aanvraag aangeboden.*

- 3.1 Achtergrond: De DEC adviseert om de bijlage met de flowchart, de tekst en het voorbeeld figuur op te nemen in de aanvraag zelf onder 3.1.3. Dit maakt de structuur van de aanvraag meteen duidelijk, waardoor ook de leesbaarheid van het vervolg toeneemt. *De flowchart en delen van de tekst zijn ingevoegd in 3.1.3. De toevoeging van de tekst is verdeeld over de twee nieuwe aanvragen.*
- 3.2 Doel: Het gaat om langlopend onderzoek. De DEC zou graag willen weten wat de onderzoekers na 5 jaar onderzoek willen hebben bereikt. Zonder concrete doelstellingen en milestones voor de duur van dit project kan de haalbaarheid van dit project niet goed worden beoordeeld. *Onder 3.2 is een extra punt opgenomen onder 'The aims are achievable in 5 years', waarin voor het gevasculariseerd bot deel staat: 'At present, connection of microvascular structures to a host vasculature upon subcutaneous implantation is achievable. ██████████ also demonstrated this before ██████████. However, simultaneous bone formation is challenging. To solve this, we will adapt our previous approach by ██████████. ██████████. This can be done by including ██████████ biomaterials or growth factors, such as ██████████. Also, we have developed new biomaterials that better mimic the natural environment of bone cells to stimulate the osteogenic process. The AV loop models have been developed and used by others. Ook in 3.3 is voor elk (sub-)aim een zin opgenomen die aangeeft wat het project kan opleveren.*
- 3.4 Onderzoeksstrategie: De DEC raadt de onderzoekers aan om in de tekst onder 3.4.2. te verwijzen naar de bijlages; dit werkt verhelderend en zo wordt de lezer beter verwezen naar wat hij/zij waar kan vinden. *De lezer wordt in 3.4.2 nu verwezen naar de box in het figuur in de flowchart in 3.1.3 waarover in elke paragraaf over gesproken wordt.*
- 3.4 Onderzoeksstrategie: Er wordt nergens in het project vermeld hoe lang de dieren in experiment blijven. De DEC ziet graag dat U deze informatie toevoegt en beargumenteert. *De duur van experimenten is in 3.4.2 van beide voorstellen toegevoegd. Voor de ratten is de duur maximaal 12 weken en voor de geiten is dit maximaal 24 weken.*

#### Bijlage 1:

- H. Pijn en pijnbestrijding. De DEC merkt op dat u verzuimt hier de anesthesie te noemen. Dit geldt voor alle bijlagen. *De anesthesie is in alle bijlagen toegevoegd onder H.*
- K. Classificatie van ongerief. De DEC is van mening dat deze dierproeven matig ongerief veroorzaken. De IvD, aanwezig bij de vergadering deelde, na enige discussie, deze mening. Volgens de DEC betreffen chirurgische ingrepen en het bijkomen uit de anaesthesie vrijwel altijd matig ongerief ongeacht het type operatie. Graag veranderen. *De mate van ongerief voor de chirurgische interventie is aangepast naar matig.*

- K. Classificatie van ongerief. De DEC vraagt zich af of de naakte, immunodeficiënte dieren ongerief ervaren als gevolg van hun genetische mutatie? Kunt u de aspecten van het fenotype beschrijven die volgens u tot ongerief leiden?  
*Er werd verondersteld dat alle genetisch gemuteerde dieren enig ongerief zouden ervaren. Dit is onjuist. Punt 1 is daarom geheel verwijderd.*

Bijlage 3 (let op: dit is nu bijlage 2):

- B. De dieren: De onderzoekers geven aan ratten te gebruiken van 7-10 weken oud terwijl in bijlage 1 en 2 ratten worden gebruikt van tenminste 12 weken. De DEC is van mening dat ratten van 7-10 weken nog niet geheel volgroeid zijn. Wat is de argumentatie voor deze leeftijd?  
*Dit is inderdaad niet correct. De leeftijd is aangepast naar de volgroeide leeftijd.*
- B. De dieren: Benoem ook hier het aantal dieren wat wordt aangevraagd.  
*Het aantal dieren is toegevoegd.*

Bijlage 4 (let op: dit is nu bijlage 3):

- Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: A.3: De DEC adviseert om wellicht meer dieren aan te vragen, aangezien de berekening van de statisticus hoger uitvalt. Dit zal U dan moeten onderbouwen.  
*Waarschijnlijk was de toelichting van de berekening onduidelijk. Het gaat in totaal om vier groepen, waaronder een controle. De tekst is verduidelijkt om dit beter weer te geven. De berekening blijft hetzelfde. Indien het met de nieuwe uitleg nog steeds niet klopt, zouden wij graag meer details over de berekening van de statisticus ontvangen om te begrijpen waar het verschil in zit en het aantal dieren te kunnen aanpassen.*
  - B. De dieren: De DEC adviseert u om het aantal dieren hier ook te noemen.  
*Het aantal dieren is toegevoegd.*
  - E. Herhaling: N.v.t. invullen. Deze tekst hoort hier niet.  
*De tekst is verwijderd.*
- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.
- Datum vragen: 06-06-2017
- Datum antwoord: 07-06-2017
- Gestelde vragen en antwoorden:
- Bijlage 2
- K. Classificatie van ongerief: immunodeficiënte dieren (1) kunnen hier verwijderd worden omdat ze geen ongerief ervaren.  
*Dit is aangepast.*

### Bijlage 3

- Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: In de zin: "*Studies involving a rat AV loop model (described in 3.4.4.2) will proceed the goat studies described here*", moet proceed vermoedelijk zijn precede.

*Dit is aangepast.*

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

#### 10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC)

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

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

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

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

1. Door trauma, aangeboren afwijkingen of het verwijderen van tumoren, kunnen patiënten botweefsel missen. Momenteel wordt dit botweefsel vervangen door bot elders uit het lichaam, maar hierdoor ontstaat er een extra defect en bovendien vergt het een langdurige operatie. Een mogelijke oplossing hiervoor is het maken van botweefsel in het laboratorium. Tot nu toe zijn er verschillende strategieën voor botregeneratie onderzocht, waarbij geprobeerd is om de meest effectieve celpopulatie te combineren met het ideale dragermateriaal en de optimale stimulatiefactoren. De belangrijkste uitdaging daarbij is het opschalen van weefselgrootte naar een klinisch relevante dimensie (in de cm range), omdat gebleken is dat weefselconstructen de implantatie niet kunnen 'overleven' wanneer zij groter zijn dan 400µm. Onderzoekers proberen dit nu op te lossen door: 1) vasculaire structuren in de constructies te introduceren, of door 2) botvorming vanuit kraakbeen te stimuleren, de endochondrale route naar botvorming. Het onderhavige projectvoorstel richt zich op de eerste aanpak.

Er zal worden gestart met een *in vitro* studie (geen onderdeel van het projectvoorstel), waarbij de constructen getest worden op non-toxiciteit, osteogenese en vasculogenese. Wanneer dit is bevestigd, worden de constructen geëvalueerd in het subcutane rattenmodel. Dit model geeft een eerste indruk van het potentieel voor osteogenese, anastomose en functionele perfusie van het pre-vasculaire netwerk. Het is ook geschikt als screeningsmodel om de optimale constructsamenstelling te bepalen aangezien meerdere samples van verschillende groepen geïmplanterd kunnen worden in één dier. Alleen de meest geschikte constructen zullen

vervolgens in de volgende stap worden toegepast: het AV loop model in de rat. Dit model wordt gebruikt om te bepalen welke combinatie van scaffolds, celtypen en groeifactoren leidt tot de meeste vasculogenese/angiogenese en botvorming in de geïmplanteerde constructen. De meest optimale constructen worden geëvalueerd in het rat AV-loop model en vervolgens in het geit AV-loopmodel. Het laatste model kan tevens inzicht geven in of het construct zorgt voor weefselvorming op klinisch relevante grootte.

De aanvraag komt qua structuur overeen met voorbeeld 1 uit de "Handreiking Invulling Definitie Project". De DEC is derhalve van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

2. Voor zover de DEC bekend, is er geen mogelijk tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de dierexperimenten in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën sluiten aan bij de hoofddoelstelling(en).

#### *Belangen en waarden*

4. Het directe doel van het project is het creëren van een gevasculariseerd construct voor botregeneratie, met de focus op ██████████ klinische toepassing. Hiertoe wordt er geprobeerd om 1) een uitgebreid perfuseerbaar microvasculair netwerk op te zetten, dat verbonden kan worden met de bloedvoorziening na implantatie, en 2) een groter vat te creëren waarop dit netwerk kan worden aangesloten en dat stevig genoeg is om te kunnen vasthechten aan een bestaand vat (AV-loop model). Het uiteindelijke doel van het project is het vervangen van botweefsel in de kaak en het aangezicht door middel van botweefsel uit het laboratorium. De DEC is van mening dat er in voldoende mate een relatie is tussen het directe doel en het uiteindelijke doel.
5. De belangrijkste belanghebbenden in dit onderzoeksproject zijn: de proefdieren, de doelgroep/patiënt en de onderzoekers. Voor de proefdieren geldt dat hun welzijn en integriteit worden aangetast. De dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en pijn ervaren. De dieren zullen in het kader van het onderzoek gedood worden.  
Zoals bij C1 vermeld, is het vervangen van botweefsel door bot elders uit het lichaam een ingreep die vaak gepaard gaat met letsel op de plek waar het bot vandaan wordt gehaald. Door het ontwikkelen van botweefsel in het laboratorium, dat ook bij een grootte >400µm kan overleven, kunnen patiënten in de toekomst eenvoudiger, zonder extra chirurgische ingreep en zonder bijkomende defecten als gevolg van het verwijderen van botweefsel, behandeld worden. Voor de onderzoekers geldt dat dit project kan bijdragen aan een goede wetenschappelijke reputatie en kan leiden tot nieuwe wetenschappelijke inzichten. Wetenschappelijke reputatie kan door de onderzoeker van belang geacht worden, maar dient naar de mening van de DEC geen rol te spelen in de ethische afweging over de toelaatbaarheid van het gebruik van proefdieren.

6. De aanvrager geeft niet aan nadelige effecten op het milieu te verwachten. De DEC ziet geen aanleiding om aan te nemen dat zich toch nadelige effecten zullen voordoen.

#### *Proefopzet en haalbaarheid*

7. De onderzoeksgroep heeft veel ervaring met het doen van onderzoek naar botregeneratie en de PI specifiek met diermodellen voor onderzoek naar botregeneratie. Daarnaast is er, zowel binnen als buiten de instelling, samenwerking met groepen die zich eveneens bezighouden met botregeneratie. De DEC is er daarom van overtuigd dat de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen beschikt om de projectdoelstelling met de gekozen strategie/aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren. De DEC is er bovendien van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project zal kunnen voldoen aan de 3V-beginselen om te voorkomen dat teveel proefdieren zullen worden ingezet en dat ze onnodig nadeel zullen ondervinden van de experimenten.
8. Het project is goed opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten logisch en helder aan bij de aangegeven doelstellingen en de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project (zie hiervoor ook de tekst bij C1).

#### *Welzijn dieren*

9. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
- Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
  - Niet-menselijke primaten (10e)
  - Dieren in/uit het wild (10f)
  - Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I EU richtlijn)
  - Zwerfdieren (10h)
  - Hergebruik (1e lid 2)
  - Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
  - Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
  - Dodingsmethode niet volgens bijlage IV EU richtlijn (13c lid 3)
10. De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de EU richtlijn. Alleen na de operatie worden de dieren enkele dagen solitair gehuisvest totdat de wond geheeld is.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. De experimentele handelingen aan de dieren zullen (gezien hun aard) licht tot matig ongerief veroorzaken. Cumulatief is voor alle bijlagen het ongerief ingeschat als matig.
12. De integriteit van de dieren wordt fysiek aangetast door het implanteren van de scaffolds.

13. De humane eindpunten zijn in de bijlage dierproeven goed gedefinieerd en het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt bereikt is goed ingeschat. In bijlage 1 wordt verwacht dat maximaal dan 5% van de dieren het humane eindpunt bereikt. Voor bijlage 2 is dat minder dan 20%. De ratten in deze bijlagen zullen nauwlettend gemonitord worden op algeheel welzijn, waarbij met name wordt gelet op een infectie van de chirurgische wond(en), hijgen, speekselvloed, immobiliteit, aanhoudend beven, aanhoudende krampen, zelfmutilatie, pilo erectie en abnormale houding en onacceptabel/langdurig gewichtsverlies (zichtbare wervelkolom of rib). In bijlage 2 wordt tevens gelet op een infectie of defect van de anastomose, oedeem en zwelling. In bijlage 3 wordt verwacht dat minder dan 15% van de dieren (afhankelijk van of het AV loop model wordt toegepast) het humane eindpunt bereikt. De geiten in deze bijlage zullen eveneens nauwlettend gemotord worden op het algeheel welzijn, waarbij met name wordt gelet op ernstige wond-/implantaat-infecties, slechte mobiliteit, ernstig gewichtsverlies t.o.v. het start gewicht en langzame wondgenezing.

### 3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Voor aanvang van de *in vivo* studies wordt *in vitro* onderzoek verricht, waarbij de constructen getest worden op non-toxiciteit, osteogenese en vasculogene. Omdat de systemische effecten van de implantaten, zoals de invloed op de aantrekking van stamcellen uit de bloedstroom en het beenmerg, en de ingroei en binding van het implantaat met het omliggende weefsel, alsook de snelheid van omgroei naar nieuw bot, waarbij cellen nodig zijn vanuit het lichaam, niet *in vitro* na te bootsen zijn is het gebruik van diermodellen noodzakelijk. Ook de aansluiting van een vaatnetwerk of klein vat op de bloedsomloop kan niet volledig worden nagebootst in het lab. Om op termijn de translatiestap naar de mens te maken is het noodzakelijk om de klinische situatie zo goed mogelijk na te bootsen in een groot dier.
15. Het aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en er is een heldere strategie om ervoor te zorgen dat tijdens het project met het kleinst mogelijke aantal dieren wordt gewerkt waarmee nog een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Voor het berekenen van het aantal benodigde dieren worden statistische methoden toegepast. Daarnaast wordt onnodig proefdiergebruik voorkomen met behulp van heldere go/no-go momenten waarbij alleen de best werkende combinatie gebruikt wordt bij de volgende fase. De dierproeven zijn zodanig opgezet dat er onderhuids meerdere combinaties (van scaffolds, celtypen en groeifactoren) in één dier geplaatst kunnen worden. Dit vermindert het aantal benodigde dieren.
16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project is zodanig opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. De dieren worden goed gemonitord om ongerief tijdig te kunnen vaststellen en onnodig lijden te voorkomen en zullen worden geëuthanaseerd zodra ze één van de vooraf nauwkeurig gedefinieerde humane eindpunten bereiken. De onderzoekers zullen een specifieke training in



microchirurgie volgen en er wordt uitgebreid op kadavermateriaal geoefend voordat de experimentele fase gestart wordt. In bijlage 1 wordt het s.c. rattenmodel gebruikt omdat het een goede screening van de implantaten toestaat en er meerdere verschillende combinaties van implantaten in één dier geplaatst kunnen worden. Voor het AV- loop rattenmodel is gekozen omdat het reeds beschreven is in de literatuur door andere groepen. Deze ervaring kan de onderzoeksgroep helpen om de operatie te verfijnen, de meest innovatieve groepen en type implantaten te bepalen en de uitkomstparameters vast te stellen. Een groot diermodel in de geit wordt gebruikt om de situatie van de mens zo goed mogelijk na te bootsen.

17. Er is geen sprake van wettelijk vereist onderzoek.

#### *Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef*

18. Omdat mannelijke en vrouwelijke ratten een ander bot metabolisme hebben, wordt de voorkeur gegeven aan het gebruik van één sekse. Het gebruik van beide seksen zal leiden tot een grotere variatie en het gebruik van meer dieren. Aangezien stress en leeftijd invloed hebben op het oestrogeen niveau en oestrogenen van invloed zijn op bot regeneratie, gaat in bijlage 1 de voorkeur uit naar het gebruik van mannelijke muizen. In bijlage 2 gaat eveneens de voorkeur naar het gebruik van mannelijke ratten omdat het skelet van de vrouwelijke rat niet groot genoeg is om de scaffolds in de lies te plaatsen. In bijlage 3 worden mannelijke geiten aangevraagd ook vanwege de vrouwelijke hormonale invloed op de botvorming. De DEC is er van overtuigd dat de aanvrager in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd dat het, om de doelstellingen te bereiken, noodzakelijk is om de proeven met alleen mannelijke dieren uit te voeren.
19. De dieren worden in het kader van het project gedood, voor histologisch onderzoek van de constructen. De dieren worden volgens een, bijlage IV van de EU richtlijn, passende methode gedood.
20. De vraag over hergebruik is niet van toepassing omdat de dieren gedood worden in het kader van het experiment.

#### *NTS*

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

### **D. Ethische afweging**

1. De morele vraag die de DEC dient te beantwoorden is of het belang van dit onderzoek, namelijk het creëren van een gevasculariseerd construct voor botregeneratie, voor maxillofaciale klinische toepassing, de onvermijdelijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de gebruikte proefdieren kan rechtvaardigen.



2. Er vindt een aanzienlijke aantasting van welzijn en integriteit van de proefdieren plaats, met matig ongerief.

Echter, indien de hierboven genoemde doelstellingen behaald worden, dan zal dit project er toe bijdragen dat patiënten die botweefsel missen in de kaak of het aangezicht, een transplantatie kunnen ondergaan van, in het laboratorium ontwikkeld, gevasculariseerd bot, zonder de nadelen die een bottransplantatie uit een ander deel van het lichaam van de patiënt met zich meebrengt. De DEC kent daar veel gewicht aan toe. Wanneer het onderzoekers bovendien lukt om dit gevasculariseerde botweefsel te ontwikkelen in het lab, kan in de toekomst wellicht ook de vertaalslag worden gemaakt naar andere weefsels en organen.

Het is aannemelijk dat de fundamentele en translationele doelstellingen behaald zullen worden. Daarvoor is de inzet van proefdieren noodzakelijk, maar de onderzoekers doen al het mogelijke om het ongerief voor de dieren en het aantal dieren tot een minimum te beperken.

3. Op grond van het bovenstaande is de DEC van oordeel dat, hoewel de experimenten leiden tot een aanzienlijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de proefdieren, het in het laboratorium ontwikkelen van gevasculariseerd botweefsel, ter vervanging van een bottransplantatie elders uit het lichaam, een substantieel belang vertegenwoordigt dat opweegt tegen de aantasting van het welzijn en de integriteit van de proefdieren. Het gebruik van de proefdieren zoals beschreven in de aanvraag is daarmee gerechtvaardigd.

#### **E. Advies**

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden.

De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.
3. Er zijn geen knelpunten/dilemma's naar voren gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht / Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

centralecommissiedierproeven.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

info@zbo-ccd.nl

**Onze referentie**

Aanvraagnummer

AVD1150020172485

**Bijlagen**

1

Datum 20 juli 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 30 juni 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Strategies for vascularized bone regeneration in maxillofacial surgical interventions" met aanvraagnummer AVD1150020172485. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

### **Beslissing**

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

De algemene voorwaarde(n) zijn opgenomen op grond van artikel 1d lid 4, artikel 10a1 lid 2, artikel 10 lid 2 en/of artikel 10a3 van de wet.

U kunt met uw project "Strategies for vascularized bone regeneration in maxillofacial surgical interventions" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 september 2017 tot en met 31 augustus 2022. Deze termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat een vergunning een looptijd van maximaal 5 jaar kan hebben.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

### **Procedure**

Wij hebben advies gevraagd bij de Dierexperimentencommissie DEC Utrecht. Dit advies is opgesteld op 26 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:**  
AVD1150020172485

### **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](http://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: UMC Utrecht / Instantie voor Dierenwelzijn  
Utrecht

Adres: Postbus 12007

Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT

Deelnemersnummer: 11500

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 september 2017 tot en met 31 augustus 2022, voor het project "Strategies for vascularized bone regeneration in maxillofacial surgical interventions" met aanvraagnummer AVD1150020172485, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Utrecht. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 30 juni 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 30 juni 2017;
  - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 30 juni 2017;
  - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 26 juni 2017, ontvangen op 30 juni 2017.

| Naam proef  | Diersoort/ Stam                           | Aantal dieren | Ernst | Opmerkingen |
|---|---|---------------|-------|-------------|
| <b>3.4.4.1 Subcutaneous construct implantation in rats</b>    |   |               |       |             |
|   | Ratten ( <i>Rattus norvegicus</i> ) /     | 70            | Matig |             |
| <b>3.4.4.2 AV loop model in rats</b>                          |   |               |       |             |
|   | Ratten ( <i>Rattus norvegicus</i> ) /     | 296           | Matig |             |
| <b>3.4.4.3 Intramuscular+orthotopic+AV loop model in goat</b> |   |               |       |             |
|   | Geiten ( <i>Capra aegagrus hircus</i> ) / | 40            | 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:**  
AVD1150020172485

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:**  
AVD1150020172485

## 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:**  
AVD1150020172485

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 NTS20172506             | 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                             | DEC-advies                         |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |      |
| 6                             | Ontvangstbevestiging               |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |      |
| 7                             | Advies CCD                         |                 | x    |        |       |                   |        |        | x    |
| 8                             | Beschikking en vergunning          |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |      |





## Aanvraag

### Projectvergunning Dierproeven

*Administratieve gegevens*

- U bent van plan om één of meerdere dierproeven uit te voeren.
- Met dit formulier vraagt u een vergunning aan voor het project dat u wilt uitvoeren. Of u geeft aan wat u in het vergunde project wilt wijzigen.
- Meer informatie over de voorwaarden vindt u op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://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?<br><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 50100<br><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>TNO</td></tr> <tr><td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td><td>[REDACTED]</td></tr> <tr><td>KvK-nummer</td><td>27376655</td></tr> <tr><td>Straat en huisnummer</td><td></td></tr> <tr><td>Postbus</td><td>96800</td></tr> <tr><td>Postcode en plaats</td><td>2509 JE DEN HAAG</td></tr> <tr><td>IBAN</td><td>NL39INGB0657819271</td></tr> <tr><td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td><td>TNO</td></tr> </table> | Naam instelling of organisatie | TNO        | Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde        | [REDACTED]       | KvK-nummer  | 27376655           | Straat en huisnummer                  |            | Postbus | 96800          | Postcode en plaats | 2509 JE DEN HAAG | IBAN        | NL39INGB0657819271 | Tenaamstelling van het rekeningnummer | TNO |
| Naam instelling of organisatie                      | TNO   |   |                                |            |  |                  |             |                    |                                       |            |         |                |                    |                  |             |                    |                                       |     |
| Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde | [REDACTED]  |   |                                |            |  |                  |             |                    |                                       |            |         |                |                    |                  |             |                    |                                       |     |
| KvK-nummer  | 27376655  |   |                                |            |  |                  |             |                    |                                       |            |         |                |                    |                  |             |                    |                                       |     |
| Straat en huisnummer                                |   |   |                                |            |  |                  |             |                    |                                       |            |         |                |                    |                  |             |                    |                                       |     |
| Postbus   | 96800   |   |                                |            |  |                  |             |                    |                                       |            |         |                |                    |                  |             |                    |                                       |     |
| Postcode en plaats                                  | 2509 JE DEN HAAG  |   |                                |            |  |                  |             |                    |                                       |            |         |                |                    |                  |             |                    |                                       |     |
| IBAN  | NL39INGB0657819271  |   |                                |            |  |                  |             |                    |                                       |            |         |                |                    |                  |             |                    |                                       |     |
| Tenaamstelling van het rekeningnummer               | TNO   |   |                                |            |  |                  |             |                    |                                       |            |         |                |                    |                  |             |                    |                                       |     |
| 1.3   | Vul de gegevens van het postadres in.<br><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>96800</td></tr> <tr><td>Postcode en plaats</td><td>2509 JE DEN HAAG</td></tr> <tr><td>IBAN</td><td>NL39INGB0657819271</td></tr> <tr><td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td><td>TNO</td></tr> </table>   | Postbus                        | 96800      | Postcode en plaats   | 2509 JE DEN HAAG | IBAN        | NL39INGB0657819271 | Tenaamstelling van het rekeningnummer | TNO        |         |                |                    |                  |             |                    |                                       |     |
| Postbus   | 96800   |   |                                |            |  |                  |             |                    |                                       |            |         |                |                    |                  |             |                    |                                       |     |
| Postcode en plaats                                  | 2509 JE DEN HAAG  |   |                                |            |  |                  |             |                    |                                       |            |         |                |                    |                  |             |                    |                                       |     |
| IBAN  | NL39INGB0657819271  |   |                                |            |  |                  |             |                    |                                       |            |         |                |                    |                  |             |                    |                                       |     |
| Tenaamstelling van het rekeningnummer               | TNO   |   |                                |            |  |                  |             |                    |                                       |            |         |                |                    |                  |             |                    |                                       |     |
| 1.4   | Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.  | <table border="1"> <tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[REDACTED]</td><td>x Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td></tr> <tr><td>Functie</td><td>Onderzoeker</td><td></td></tr> <tr><td>Afdeling</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr> <tr><td>Telefoonnummer</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr> <tr><td>E-mailadres</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr> </table>   | (Titel) Naam en voorletters    | [REDACTED] | x Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.                        | Functie          | Onderzoeker |                    | Afdeling                              | [REDACTED] |         | Telefoonnummer | [REDACTED]         |                  | E-mailadres | [REDACTED]         |                                       |     |
| (Titel) Naam en voorletters                         | [REDACTED]  | x Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.   |                                |            |  |                  |             |                    |                                       |            |         |                |                    |                  |             |                    |                                       |     |
| Functie   | Onderzoeker   |   |                                |            |  |                  |             |                    |                                       |            |         |                |                    |                  |             |                    |                                       |     |
| Afdeling  | [REDACTED]  |   |                                |            |  |                  |             |                    |                                       |            |         |                |                    |                  |             |                    |                                       |     |
| Telefoonnummer                                      | [REDACTED]  |   |                                |            |  |                  |             |                    |                                       |            |         |                |                    |                  |             |                    |                                       |     |
| E-mailadres   | [REDACTED]  |   |                                |            |  |                  |             |                    |                                       |            |         |                |                    |                  |             |                    |                                       |     |
| 1.5   | <i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.  | <table border="1"> <tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[REDACTED]</td><td><input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td></tr> <tr><td>Functie</td><td>Onderzoeker</td><td></td></tr> <tr><td>Afdeling</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr> <tr><td>Telefoonnummer</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr> <tr><td>E-mailadres</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr> </table>  | (Titel) Naam en voorletters    | [REDACTED] | <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. | Functie          | Onderzoeker |                    | Afdeling                              | [REDACTED] |         | Telefoonnummer | [REDACTED]         |                  | E-mailadres | [REDACTED]         |                                       |     |
| (Titel) Naam en voorletters                         | [REDACTED]  | <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.  |                                |            |  |                  |             |                    |                                       |            |         |                |                    |                  |             |                    |                                       |     |
| Functie   | Onderzoeker   |   |                                |            |  |                  |             |                    |                                       |            |         |                |                    |                  |             |                    |                                       |     |
| Afdeling  | [REDACTED]  |   |                                |            |  |                  |             |                    |                                       |            |         |                |                    |                  |             |                    |                                       |     |
| Telefoonnummer                                      | [REDACTED]  |   |                                |            |  |                  |             |                    |                                       |            |         |                |                    |                  |             |                    |                                       |     |
| E-mailadres   | [REDACTED]  |   |                                |            |  |                  |             |                    |                                       |            |         |                |                    |                  |             |                    |                                       |     |

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

## 2 Over uw aanvraag

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

## 3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- |            |                |
|------------|----------------|
| Startdatum | 01 - 01 - 2018 |
| Einddatum  | 31 - 12 - 2023 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Investigating potential cardiovascular safety issues of drugs and other substances
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Het testen van medicijnen en andere stoffen op hart- en vaatziekten gerelateerde bijwerkingen
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- |             |                        |
|-------------|------------------------|
| Naam DEC    | DEC-TNO                |
| Postadres   | 96800 2509 JE DEN HAAG |
| 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  
 s.v.p. uw factuur o.v.v. 'vooruitbetaling' en het bestelnummer 3100165835/1 indienen via e-mail bij [redacted] adres:  
 TNO T.a.v. Accounts Payable  
 Postbus 96829  
 2509 JE DEN HAAG

## 5 Checklist bijlagen

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

## 6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:
- Centrale Commissie  
 Dierproeven  
 Postbus 20401  
 2500 EK Den Haag
- Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondergetekende verklaart:
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
  - dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
  - dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
  - dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
  - dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam [redacted]

Functie [redacted]

Plaats Den Haag

Datum 05 - 07 - 2017

Handtekening [redacted]



## Form Project proposal

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

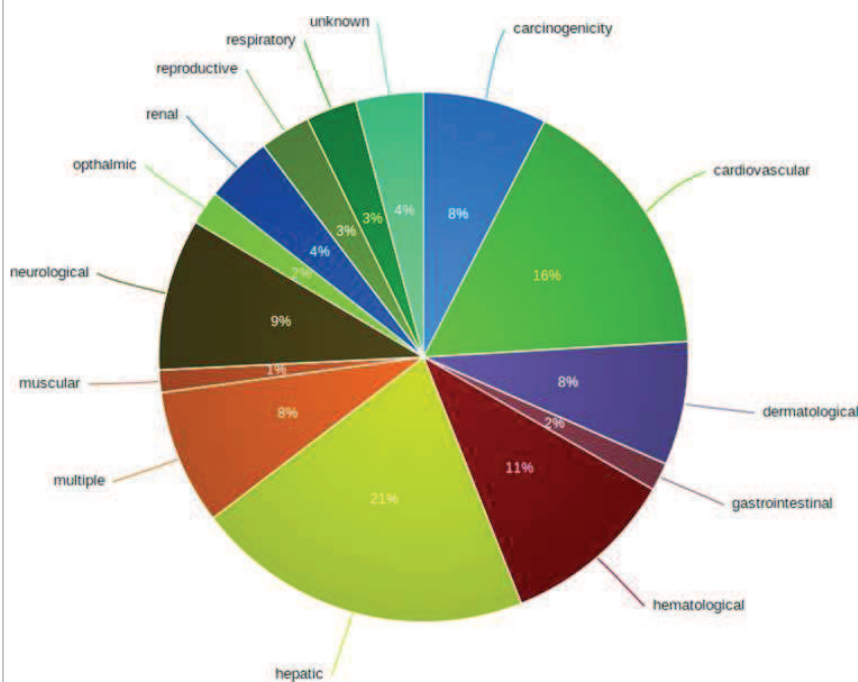
Describe the project (motivation, background and context) with respect to the categories selected in 2.

- 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.

#### Cardiovascular safety

Efficacy and safety are two decisive factors that affect the viability of new drugs. Over the decades, drug regulatory agencies, pharmaceutical companies and various clinical studies have reported the events of drug withdrawals due to severe adverse side-effects. In a recent publication (Siramshetty et al, Nucleic Acids Res 2016) a database was presented with an extensive list of withdrawn and discontinued drugs in the USA and Europe, including the reason for withdrawal, eq. the type of adverse effect. 16% of the withdrawn drugs were associated with cardiovascular safety issues.

Figure 1: Overview of safety/toxicity issues associated with drug withdrawal (see also database <http://cheminfo.charite.de/withdrawn>)



Also other substances (chemicals) could be associated with cardiovascular safety issues in humans, when (chronic) exposure of these substances to humans occur. As an example we mention the persistent perfluorinated hydrocarbons (PFOS and PFOA), which show a positive association in cross-sectional epidemiological studies with increased plasma cholesterol levels (a risk factor for cardiovascular disease; see also below).

These cardiovascular safety issues were not detected preclinically in the standard regulatory safety/toxicity studies. This is because standard regulatory safety/toxicity studies are primarily performed in young and healthy mice and rats. Since these animals do not have a predisposition for cardiovascular disorders, potential adverse (side) effects of new drugs and other substances (chemicals) on cardiovascular risk factors are not likely to be picked up in these healthy animals.

### Cardiovascular disease and risk factors

Cardiovascular disease (CVD) is the leading cause of death worldwide. Its major underlying pathology is atherosclerosis, a complex, multi-factorial disease that is driven by dyslipidaemia and chronic inflammation. Obesity is strongly related to major cardiovascular risk factors such as raised blood pressure, glucose intolerance/insulin resistance, type 2 diabetes and dyslipidaemia. These metabolic abnormalities tend to cluster together and this combination is called Metabolic Syndrome. The liver plays a central role in the control of lipid metabolism and contributes to systemic inflammatory changes, insulin resistance and hyperlipidaemia determining progression of CVD. Recently, accumulating evidence suggests that obesity induced fattening of the liver (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD or

nonalcoholic steatohepatitis (NASH) in case the liver is also inflamed) may pose a cardiovascular risk above and beyond that is conferred by traditional cardiovascular risk factors. CVD is likely to continue to grow due to increased obesity rates and our aging society.

In the past 30 years, TNO has developed translational animal models that allow detailed analysis of different cardiovascular risk factors. In contrast to wild type mice, these animal models develop subclinical phenotypes of cardiovascular risk factors, in which (adverse) effects can be very well studied. In recent years, we have found that our translational animal models and technology are particularly suited to provide a meaningful contribution to research into the potential cardiovascular safety aspects of new drugs (which are already on the market or still in a preclinical or clinical study phase) and other substances with potential cardiovascular safety aspects.

Identifying the potential cardiovascular/metabolic safety issues allow our partners in the chemical & pharmaceutical industry to develop ways to prevent or mitigate these safety issues.

Through our portfolio, we support both the chemical & pharmaceutical industry as well as academia and medical centers. We strive to continuously incorporate new insights and technologies in our portfolio to offer the best possible preclinical research tools to perform cardiovascular safety studies in relevant translational animal models.

---

### 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?

Our aim is to provide a meaningful contribution to research into the potential cardiovascular/metabolic safety aspects of (new) drugs and other substances.

Based on preclinical, clinical or post-clinical adverse drug reactions or epidemiological studies (in case of (chronic) exposure of humans to chemicals) in association with cardiovascular safety, we (together with, or on behalf of our pharmaceutical or chemical industry partners) will investigate drugs with cardiovascular/metabolic safety aspects. The specific research question of a study will generally focus on the potential adverse effect of the drugs or other substances on one or more cardiovascular risk factors and/or the elucidation of the mechanism involved. We also further aid our pharmaceutical and chemical industry partners by screening other candidate drugs in a pre-clinical, clinical or post-clinical phase or other substances in order to select drugs or other substances that do not show these cardiovascular/metabolic safety aspects.

Approximately 70% of our studies will be applied research performed to investigate the adverse effects of drugs or substances on one or more cardiovascular risk factors. In addition, about 30% of our studies is translational research performed to investigate the underlying working mechanism of the adverse effects.

If for example in a study a new drug shows adverse effects on the cardiovascular risk factor hyperlipidaemia, the next study could be a further elucidation of the mechanisms involved. Or the next study could also be investigating potential adverse effects other drugs (in the same class) or investigating whether the drug also has adverse effects on atherosclerosis development.

---

This project has a high feasibility:

Within the strategy of TNO, Healthy Living is one of the five focus areas. Within the focus area of Healthy Living research is being done that varies from the development of healthy and safe food, children growing up healthily or working healthily to predictive health technologies. A substantial portion of the research is dedicated to education, prevention and treatment, either commissioned by the government or in collaboration with academia or industry. The research described in this project is embedded within the theme of predictive health technologies that aims to have a better understanding of health and diseases and better predict (adverse) effects of drugs and other substances.

Researchers within the group are already more than 20 years working in the field of cardiovascular and metabolic diseases (both efficacy studies, fundamental research as safety studies), and have an extensive track record of more than 150 peer-reviewed international publications. For the research described in this project, focusing on cardiovascular/metabolic safety aspects of drugs and other substances, we have performed numerous studies. For example, in a translational mouse model for hyperlipidemia and atherosclerosis, we have performed a number of studies in which the adverse effects of new drugs on lipid metabolism were investigated: HIV-inhibitors (against AIDS), JAK inhibitors (in development for rheumatoid arthritis), bexarotene (against metastatic differentiated thyroid carcinoma) and tyrosine kinase inhibitors (chronic myeloid leukemia), and torcetrapib (a CETP inhibitor with adverse cardiovascular side effects). We have also performed studies on the mechanism of action of the widely used and persistent perfluorinated hydrocarbons (PFOS and PFOA), which show a positive association in cross-sectional epidemiological studies with increased plasma cholesterol levels.

A large network has been built within both the academic world and the pharmaceutical industry, as well as biotech companies, academic medical centers, patient organizations and governments. Within this network we have conducted more than 150 cooperation projects over the past 15 years (both bilaterally and in larger consortia). Our previous achievements show that with the experiments described in this project we contribute to our main focus area Healthy Living.

---

### 3.3 Relevance

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

Over the decades, drug regulatory agencies, pharmaceutical companies and various clinical studies have reported the events of drug withdrawals due to severe adverse side-effects. 16% of the withdrawn drugs in the USA and Europe were associated with cardiovascular safety issues.

CVD represents a major economic burden on health care systems in terms of direct (eg, hospitalizations, rehabilitation services, physician visits, drugs) and indirect costs associated with mortality and morbidity (eg, losses of productivity due to premature mortality and short- or long-term disability). The effects of CVD are not limited to health, but can seep into social aspects of life as well (physical limitations, social limitations, decreased life expectancy).

Investigating potential cardiovascular safety issues of drugs (designed for treatment of other diseases) or other substances will be important for better predicting potential adverse cardiovascular effects which will allow our partners of the pharmaceutical and chemical industry to develop ways to prevent or mitigate these safety issues.

---

### 3.4 Research strategy

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

---



All studies that will be conducted in this project will be cardiovascular safety studies to evaluate the potential adverse effect of the new drugs or other substances on one or more cardiovascular risk factors and/or the elucidation of the mechanism involved.

Cardiovascular safety issues of drugs are mainly discovered in a clinical or post-clinical phase. Associations between cardiovascular adverse effects and other substances humans can be (chronically) exposed to are mainly discovered in epidemiological studies. Also if preclinical *in vitro*, *in vivo* or *in silico* (Target Safety Assessment) studies give potential cardiovascular safety issues, or if there are known properties of a (certain class of) compound(s) which could cause potential cardiovascular issues, this will be a reason to evaluate this further in relevant models. We (together with, or on behalf of our pharmaceutical or chemical industry partners) will investigate these drugs or other substances on their potential cardiovascular safety aspects and/or underlying mechanism(s). We will first perform a literature search what already is known about the specific drug/substance and what is known about the potential cardiovascular safety aspects of the drug. The partner will also be asked what is already known of the drug/substance. Then, based on this knowledge and the research question, we will decide and advise our partner whether the research question can be answered using *in vitro* (eg primary human cells), *ex vivo* (existing patient materials or materials available from previous animal studies) or *in silico* models (target safety assessment) or whether our translational *in vivo* models are necessary (or a combination of these models are necessary).

### **3 R developments in metabolic disorder research: possibilities and limitations**

TNO has set up a research program to refine, reduce and replace animal testing. In this program, TNO collaborates with others to accelerate the process of developing alternatives. TNO is constantly looking for new insights and technologies that can reduce animal experiments. Our department has an extensive track record using primary human cells (a.o. primary human hepatocytes or HUVECs) for research questions in the field of cardiovascular and metabolic diseases. TNO also makes use of *in silico* models (target safety assessment) to predict potential safety liabilities. However, the development of cardiovascular disease and its underlying atherosclerosis is a complicated multifactorial process in which multiple organs interact and especially if the mechanism of potential adverse (side) effects of drugs on metabolic disorders is not clear, at present time it will not be possible to use only *in vitro* and *in silico* models to investigate these potential cardiovascular issues. Therefore, we also have a number of highly translational subclinical animal models in which we investigate potential cardiovascular issues of drugs and other substances.

For each individual *in vivo* study, the partner(s) will be advised on the optimal study design which includes aspects such as choosing the most suitable model (see also table 1), the experimental design, the route of administration, treatment frequency, power analysis, the concentration of choice, the primary and secondary read-out parameters, etc. If insufficient information is available, it will be decided to first perform a pilot experiment to obtain the desired information. For instance, a dose-finding pilot study could first be performed to find the dose in mice which correlates with a clinically relevant dose in humans (metabolic rate in mice is generally higher than in humans, so for equal plasma concentrations, mostly a higher dose is needed).

One of the most important selection points in our studies, is the choice of animal model to be used (see also table 1). This choice depends very much on which cardiovascular safety aspect(s) of the new drug is to be evaluated. Since each model has different cardiovascular risk factor characteristics, the combination of certain characteristics may fit better, dependent on the research question and any knowledge.

Study specific designs can vary and depend on the type of potential cardiovascular risk factor(s) of the new drug or substance are to be investigated and length of the study (for example, adverse effects on dyslipidaemia can be investigated fairly quickly (4 weeks, but atherosclerosis development in this mouse model takes much longer (16 weeks) to provide a window to investigate the potential adverse effects).



---

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.

---

In order to induce the cardiovascular risk factors of interest a suitable mouse model from our portfolio is chosen (see table 1). The choice of the mouse model will depend on the research question. In general, the APOE\*3Leiden(CETP) mouse is the preferred model as compared to the APOE -/- and LDLR-/- mouse, because, since in our view the APOE\*3Leiden(CETP) mouse is the best translational model to evaluate potential cardiovascular issues. The APOE\*3Leiden mouse contains the human APOE\*3Leiden transgene which results a human-like (V)LDL clearance. The APOE\*3Leiden.CETP mouse has the same characteristics as the APOE\*3Leiden mouse in terms of (V)LDL metabolism, but also expresses human CETP, which results in a human-like HDL metabolism. So, if there are potential adverse effects on HDL metabolism (can be in addition to potential adverse effects on (V)LDL metabolism), the APOE\*3Leiden.CETP mouse is the preferred model when compared to the APOE\*3Leiden mouse. The APOE\*3Leiden mouse would be preferred over the APOE\*3Leiden.CETP mice if we want to exclude potential effects on CETP mediated HDL-metabolism or if the focus of the study is on adverse effects on chronic inflammation.

We would like to use the APOE- /- mouse or the LDLR -/- mouse model if, for example, we want an independent confirmation of data in the literature or if we want to exclude the involvement of ApoE or LDLR mediated (V)LDL clearance in potential cardiovascular issues.

The mice will be fed a western type diet to mimic the consumption in the Western World, thereby inducing the cardiovascular risk factors. The new drug or substance to be tested on its cardiovascular safety aspects will be administered via admix food, admix drinking water, gavages or injections or osmotic minipumps. During the study parameters will be measured:  
Body weight and food intake will be monitored regularly during the study and blood samples will be taken regularly for measurement of lipids, inflammation markers etc. At the end of the study animals are euthanized and blood and tissues are collected for further analyses. More specific parameters can be measured during the study and are mentioned in the appendix. Diets and parameters to be measured are described in more detail in the appendix.

Table 1. Mouse models and cardiovascular risk factors to be studied

---

| Mouse model       | Cardiovascular risk factor      | Notes   |
|-------------------|---------------------------------|---|
| ApoE*3Leiden      | hyperlipidemia                  | Mice carrying a human APOE*3Leiden transgene that leads to a defective clearance of triglyceride and cholesterol-rich lipoproteins (VLDL and LDL). While normal wild-type mice have a very rapid clearance of VLDL and LDL, ApoE*3Leiden (E3L) mice have an impaired clearance and are thereby mimicking the slow clearance observed in humans. APOE*3-Leiden transgenic mice are highly responsive to fat, sugar and cholesterol feeding with respect to the effects on plasma cholesterol and triglyceride levels. APOE*3Leiden animals have proven very suitable for cardiovascular safety studies. Males and females can be used to evaluate adverse lipid effects, however they respond very different on dietary cholesterol induced hyperlipidemia. Therefore there is a preference per study to use female or male mice only. |
|                   | atherosclerosis                 | Only females are suitable to evaluate adverse effects on atherosclerosis development. Male mice do not/hardly develop atherosclerosis.  |
|                   | chronic inflammation            | Only females on a high cholesterol diet are suitable to evaluate adverse effects on chronic inflammation (plasma and in vessel wall).   |
| APOE*3Leiden.CETP | hyperlipidemia, atherosclerosis | APOE*3Leiden.CETP: In contrast to humans, wild type mice express no CETP (which transfers cholesterol from HDL to (V)LDL). The double transgenic ApoE3*Leiden.CETP mouse brings CETP to expression and therefore this model is translational to the human situation regarding HDL metabolism, so suitable to test potential adverse effects on HDL-cholesterol. Furthermore, this mouse has the same characteristics as the APOE*3Leiden mouse regarding its (V)LDL metabolism.   |
| LDLR-/-           | hyperlipidemia, atherosclerosis | Both males and females can be used to evaluate adverse effects on lipids and atherosclerosis. The mice lack a specific receptor (Ldlr) and reflect a particular group of patients that have the same genetic impairment (patients with defective or absent Ldlr). This model is not to be used when LDLR could be involved in (side) adverse effect of new drug.  |
| ApoE-/-           | hyperlipidemia, atherosclerosis | Both males and females can be used to evaluate adverse effects on lipid and atherosclerosis. This is a model with higher lipid levels and more atherosclerosis as compared to all models above. This model is not to be used when ApoE could be involved in the adverse effect under investigation.   |

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.

Different cardiovascular risk factors can be induced in translational animal models: obesity, insulin resistance, Type 2 Diabetes, hyperlipidemia, atherosclerosis, NAFLD and NASH. Our department currently focuses on potential adverse effects on hyperlipidemia, inflammation and atherosclerosis, based on our expertise in this area and cardiovascular safety issues of drugs and other substances tested by us thus far. The coherence between the studies is that in all studies potential adverse effects on cardiovascular risk factors and/or underlying mechanism are being studied. Identifying the potential cardiovascular/metabolic safety issues allow our partners in the chemical & pharmaceutical industry to develop ways to prevent or mitigate these safety issues, in order to reduce CVD.

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             | Cardiovascular safety study |
| 2             |                             |
| 3             |                             |
| 4             |                             |
| 5             |                             |
| 6             |                             |
| 7             |                             |
| 8             |                             |
| 9             |                             |
| 10            |                             |
| 11            |                             |



## 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](http://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'. 50100
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. The Netherlands Organisation for Applied Scientific Research (TNO)
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure   |
|---------------|--|
| 3.4.4.1       | Investigating potential cardiovascular safety issues of drugs and other substances |
- 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.

Different mouse models and conditions can be used. The general design of cardiovascular safety studies is treatment of (transgenic) mice with a western type diet (a cholesterol and fat rich diet) to mimic the consumption in the Western World, thereby inducing the cardiovascular risk factors and giving the necessary window to examine potential adverse effects on the risk factors. Fructose in drinking water could also be added which will result in a more atherogenic lipoprotein profile. The detailed study design being used depends on which cardiovascular safety issues are being investigated: hyperlipidemia, chronic inflammation, atherosclerosis.

The study duration and subsequently the length of the study ranges from approx. 8-24 weeks and will depend on the diet being used, the sensitivity of a mouse strain towards this diet, induction time of cardiovascular risk factor and the new drug under investigation (as an example: female ApoE\*3Leiden.CETP mice fed cholesterol containing western type diet develop hyperlipidemia very quickly (3-4 weeks), but it takes a longer time to develop atherosclerosis (16-20 weeks).

Importantly, the specific combination of animal model + diet (e.g. the percentage of cholesterol) determines which cardiovascular safety issues can be investigated (see also table 1 in the general part of the project proposal).

A study can include the following groups:

1. control group (mice are fed a western type diet, no intervention).
2. reference control group (mice are fed a western type diet; intervention is with a drug or substance known to have adverse cardiovascular effects (reference control)).
3. Treatment group (mice are fed a western type diet; and new drugs or substances with potential cardiovascular safety issues are applied)

After a run-in period on the western type diet, the mice are matched into groups based on body weight, age plasma lipids or inflammation markers (which parameters to be used is based on research question). Hereafter treatment with the drugs or substances with potential cardiovascular safety issues starts. The study varies in duration based on which cardiovascular safety issues are under investigation

Additional groups can be added as well: additional groups for PK/PD analysis could be added if an additional research question is also to obtain more PK/PD information on the administered compounds. Furthermore, it can also be decided to first perform a pilot experiment if crucial information is lacking (for example, first a dose-finding pilot study could be performed to find the optimal dose in mice which correlate to clinical dose in humans (= clinically relevant plasma levels of compound)).

Besides directly testing the potential adverse effects, also more basic research studies are performed aiming at understanding the underlying mechanisms of the potential adverse effect. For all studies, it is very important that we use translational models that reflect the cardiovascular risk factors in humans as much as possible. These studies provide necessary information for the development of drugs that do not have CVD (cardiovascular disease) side effects

The primary outcome parameters will depend on the specific research question:

- For investigating potential cardiovascular adverse effects on **hyperlipidemia**, the primary outcome parameters will be plasma lipids.
- For investigating potential cardiovascular adverse effects on **chronic inflammation**, the primary outcome parameters will be plasma inflammation markers and/or inflammation markers in the vessel wall).
- For investigating potential cardiovascular adverse effects on **atherosclerosis**, the primary outcome parameters will be histological analysis of plaque size and severity in aortic root area or aorta.

In general, body weight and food intake will be monitored and during the study blood/plasma measurements will be performed to analyse plasma parameters. At the end of each study, tissues will be collected for analysis of atherosclerosis.

Maximum volume and frequency injections/oral gavages/blood samples to be taken are according to what is considered good practice (Diehl et al., J Appl Toxicol. 2001 Jan-Feb; 21(1):15-23).

---

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

As mentioned above, the precise study design depends on which cardiovascular safety issues are to be studied.

During every study body weight and food intake are monitored regularly, different blood samples will be taken during the study and at the end mice will be euthanized and tissues will be collected. Depending on the research questions, extra procedures for measurement of additional parameters could be added to the study (see below for details).

There are different possibilities for administration routes of new drugs of substances:

- Oral administration via diet admix or via drinking water
-

- Oral administration (p.o.) by gavage
- Intraperitoneal injection (i.p.)
- Subcutaneous injection (s.c.)
- Intravenous injection (i.v.)
- Intramuscular injection (i.m.)
- Via osmotic mini-pump (s.c.): Using appropriate anesthesia and analgesia, osmotic minipumps suitable for mice will be placed subcutaneously. During an experiment, it might be necessary to replace the minipump.

During the study at several time-points blood samples will be taken for plasma measurements. Blood samples can be taken:

- via tail vein after 4-5 hours fasting
- via tail vein after overnight fasting (in particular cases it may be necessary to collect blood after prolonged fasting, e.g. when ketone bodies or free fatty acids or other markers of fasting are measured or if we need blood samples that do not contain chylomicrons or any food derived markers).
- via tail vein non-fasted (in particular cases it may be necessary to collect non-fasted blood, e.g. after postprandial challenge tests after meal).

The frequency and volume of blood taken will be within good practice limits as described in Diehl et al. (2001)

At the end of the experiment mice will be euthanized, and plasma and different tissues will be collected.

During the study the following procedures could be added:

#### **Deuterated water administration (D<sub>2</sub>O)**

To be able to trace newly formed proteins (lipids for instance) within a given period, D<sub>2</sub>O can be given for a short period (number of days) or long (several weeks) period in our studies. Labeling can take place at various times of the study and depends on the specific question. D<sub>2</sub>O will be built into all the newly synthesized proteins and in this way newly formed protein can be traced. On the first day, the mice receive a single i.p. injection with body warm D<sub>2</sub>O 100% / 0.9% NaCl to label the body water around 2-5% of the mouse. Then the D<sub>2</sub>O body water levels will be maintained by adding D<sub>2</sub>O in the drinking water (containing 4-8% D<sub>2</sub>O) until the end of the study.

**Feces collection** (for measurements of fatty acids, sterols, for example, to be able to evaluate the effect on lipid excretion)

- By collecting feces after several days from the cage bed (on group level) or after lifting mice (individual feces collection)
- By taking rectal swabs

#### **VLDL production** (measurement of VLDL production; non-recovery)

Mice are fasted for 4 hours, and then anesthetized with appropriate injection anesthesia. Under anesthesia Tran 35S-label is injected intravenously in the tail vein for measurement of the apoB novo synthesis and 30 minutes thereafter the mice are injected with Triton WR 1339 (iv, tail) for complete blocking of VLDL clearance. 0, 15, 30, 60 and 90 minutes after Triton injection, a blood sample (40 µl) is taken via the tail for measurement of plasma triglycerides (VLDL production measurement). After 90 minutes, the mice are euthanized via cervical dislocation and the remaining blood is collected via cardiac puncture for VLDL isolation and determination of the ApoB novo synthesis and lipid composition VLDL. Different tissues can be isolated as well.

#### **VLDL clearance** (measurement of VLDL clearance; non-recovery)

For this purpose, mice will be fasted for 4 hours after which mice will receive VLDL-like particles labeled with 3 H-triolein and 14C-cholesteryl oleate via an injection into the tail vein. After 2, 5, 10 and 15 minutes, a blood sample is taken via the tail (40 µl per time point). The mice are euthanized by cervical dislocation and blood is collected at the end of the experiment by means of a heart puncture and different tissues are isolated as well. 3H and 14C activity is measured in tissues and plasma samples.

**Challenge measurement** (to measure potential adverse effects of new drugs or other substances after application of acute metabolic stressor)

- Administration of dietary challenge (bolus of dietary fat, lipids, bile acids, fatty acids, cholesterol) to assess the metabolic response after set time points.
- Challenges with heparin administration (iv or ip injection) for determination of lipoprotein lipase (LPL) activity.

Blood samples can be taken before, during and after the challenge (one or more blood samples, depending on the specific research question).

**Blood pressure measurement** (to measure potential adverse effects of new drugs or other substances on blood pressure).

In principle all procedures, except VLDL clearance and production (both non recovery procedures), could be performed in the same mouse. The study will be designed in a way that the mice will be given time between these procedures (good practice).

---

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

To estimate the number of animals to be used in an experiment, we use the adverse effect size (if known, e.g., from data in the literature, clinical studies and post clinical observations, from our own historical data or years of experience with similar type of experiments or if unknown from pilot studies) to estimate the sample size needed to achieve a certain power (usually between 0.8-0.9) with appropriate statistical tests like the t-test with a  $p < 0.05$ .

As an indication: usually  $n=8$  mice will be used to investigate the adverse effects on plasma lipids and plasma inflammation markers, and  $n=15$  mice per group for to investigate the adverse effects on atherosclerosis and/or inflammation in the vessel wall.

In addition, there could be low-responders / outliers. For ApoE\*3Leiden and ApoE\*3Leiden.CETP mice it is well known that a certain percentage of the mice does not respond to a cholesterol containing diet with respect to the development of hyperlipidemia. For lipid and atherosclerosis studies, these mice will be excluded in the beginning of the study to reduce the variation and thus the number of animals required per group. If possible different study groups will be combined, so that different treatment groups can share the same control groups.

---

## **B. The animals**

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

Mice, ApoE\*3Leiden, ApoE\*3Leiden.CETP mice from our own breeding facility, 8-22 weeks old will be used. In addition, ApoE<sup>-/-</sup>, LDLR<sup>-/-</sup>, 8-22 weeks old can be used.

*ApoE\*3Leiden*: Mice carrying a human APOE\*3Leiden transgene that leads to a defective clearance of Triglyceride and cholesterol-rich lipoproteins (VLDL and LDL). While normal wild-type mice have a very rapid clearance of VLDL and LDL, ApoE\*3Leiden (E3L) mice have an impaired clearance and are thereby mimicking the slow clearance observed in humans. APOE\*3-Leiden transgenic mice are highly responsive to fat, sugar and cholesterol feeding with respect to the effects on plasma cholesterol and triglyceride levels. APOE\*3Leiden animals have proven to be responsive to the most of the drugs that are also used in the clinic, and also very suitable for cardiovascular safety studies. Males and females can be used to evaluate adverse lipid effects, however they respond very different on dietary cholesterol induced hyperlipidemia. Therefore there is a preference per study to use female or male mice only. Only females are suitable to evaluate adverse effects on atherosclerosis development. Male mice do

not/hardly develop atherosclerosis.

*APOE\*3Leiden.CETP*: In contrast to humans, wild type mice express no CETP (which transfers cholesterol from HDL to (V)LDL). The double transgenic ApoE3\*Leiden.CETP mouse brings CETP to expression and therefore this model is translational to the human situation regarding HDL metabolism, so suitable to test potential adverse effects on HDL-cholesterol. Furthermore, this mouse has the same characteristics as the APOE\*3Leiden mouse regarding its (V)LDL metabolism.

The two mice models above are, in our view the most translational mouse models to investigate potential cardiovascular safety issues of compounds, however, based on the research question and/or what is known from literature, the commercially available LDLR<sup>-/-</sup> and ApoE<sup>-/-</sup> mice could also be used to investigate potential cardiovascular safety issues.

*LDLR<sup>-/-</sup>*: both males and females can be used to evaluate adverse effects on lipids and atherosclerosis. The mice lack a specific receptor (Ldlr) and reflect a particular group of patients that have the same genetic impairment (patients with defective or absent Ldlr). This model is not to be used when LDLR could be involved in (side) adverse effect of new drug.

*ApoE<sup>-/-</sup>mice*: both males and females can be used to evaluate adverse effects on lipid and atherosclerosis. This is a model with higher lipid levels and more atherosclerosis than the models mentioned above. This model is not to be used when ApoE could be involved in the adverse effect under investigation.

Please note that all mouse models show a subclinical phenotype and do not lead to discomfort. Similarly as in humans, that are often unaware of these disturbances until a very late stage. Also the adverse effects are aimed and expected to show a subclinical phenotype without any discomfort.

The required number of mice for cardiovascular/metabolic safety studies will be estimated to be 1500 for a period of 5 years. This is based on an expected number of cardiovascular safety studies of approx. 5 per year. The average study will consist of 3-6 groups of 8-15 mice each, so on average 50 mice per study. This leads to a required total number of 1250 mice (5 studies x 50 animals / study x 5 years). Expected low/non-responders are 250 mice, so the required number of mice will be estimated to be 1500 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 continuously seek to replace animal studies with other methods, preferably using human tissue or cells. We work with human cells and in silico models, where possible, since that helps us to make better predictions about potential cardiovascular issues. When we have discovered ways to replace animal testing, we use them ourselves and encourage others to apply these alternative tests. Non-testing techniques, such as computer modelling (target safety assessment), are continually being developed and improved.

---



Before we consider to perform a novel cardiovascular safety study, we will first analyse appropriate cell lines, existing patient materials or materials available from previous animal studies, which contributes to a reduction of animal numbers. The use of human material and in vitro cultures allows this project to comply with the 3Rs (replacement, reduction and refinement) by keeping the animal numbers to a minimum.

However, animal studies are currently unavoidable to study the complex organ-organ interactions that are intrinsic to all CVD. The development of CVD is a too complicated multifactorial process in which multiple organs and cells interact. Hence, given the complexity of the lipid metabolism, the potential cardiovascular safety issues of drugs can be examined only in intact animal models with intact vascular system and there are currently no established alternative methods to investigate these processes.

**Reduction:** TNO aims to reduce the number of animals involved in testing. We regularly review our testing methods and implement integrated testing strategies. This helps us to determine whether animal testing is needed or whether the same information can be obtained in other ways. Power analyses are made for each experiment. Whenever possible, we will perform pilot studies with the minimum number of animals possible. Experiments will be done sequentially, where on basis of the results, decisions will be taken for the next steps. If possible different study groups from different studies will be combined, so that they can share the same control groups.

**Refinement:** We continuously aim to develop, validate and adapt (preferentially non-invasive) test methods in such a way that the test animals are exposed to as little discomfort and stress as possible. All animal handlings will be carried out by authorized and qualified persons. Where possible, all animals will be group housed and environmental enrichment will be provided.

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

Appropriate possibilities to reduce pain, fear or suffering will be used. All work will be carried out by a small number of highly trained bio-technicians. Injection fluids will be brought to room or body temperature before injection. In consultation with the attending veterinarian, for surgery appropriate peri-operative care, including appropriate anaesthesia and analgesia, is determined and frequently reviewed and updated towards best practices. The welfare of the animals will be observed daily by different people. If there are clear signs of unexpected severe discomfort, the animals will be euthanized. There are no negative environmental effects; all mice will be housed under strict D1 conditions.

## Repetition and duplication

### E. Repetition

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

N.a.

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

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

No

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

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

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

## Classification of discomfort/humane endpoints

### H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

For more invasive procedures (placing of osmotic pumps), appropriate anesthesia / analgesia will be used or the procedure will be terminal. In consultation with the attending veterinarian, surgery protocols, including appropriate anaesthesia and analgesia is determined and frequently reviewed and updated towards best practices.

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

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

The induction of the cardiovascular risk factors: hyperlipidemia, chronic inflammation and atherosclerosis do not lead to discomfort. Similarly as in humans, they are often unaware of these disturbances until a very late stage. Based on historical data, we expect the risk of clinical symptoms developing in the animals to be <0.1%

With respect to discomfort caused by drugs and other substances: Although the drugs/substances to be tested are expected to have adverse effects on cardiovascular safety, we aim in our studies that the adverse effects will not cause any discomfort to these animal models. We will perform studies predominantly in earlier phases of disorders and work with efficacy/clinically relevant doses of the drugs or other substances (far below acute toxic levels)

The drugs and chemicals have already been tested in standard regulatory safety/tox preclinical studies and often also clinical safety studies.

Although we do not expect discomfort, we cannot exclude this. Mice will be monitored daily and in case of discomfort, cages will be labelled and the affected mice will be closely monitored to observe whether the health status is improving or deteriorating. Deterioration of the health status with unexpected weight loss, severe wounds and/or signs of general sickness and/or discomfort, will lead to the decision that mice will be euthanized.

Explain why these effects may emerge.

We cannot exclude the possibility that the combination of the compounds in our models leads to unexpected adverse effects. The likelihood (based on historical data of last 5 years) is <0.1%.

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

Upon start of treatment mice will be closely monitored and upon signs of animal discomfort, the situation will be discussed with the animal welfare officer or veterinarian and if possible proper measurements will be taken to relieve the animal discomfort or animals will be taken out of experiment and 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.

Indicate the likely incidence.

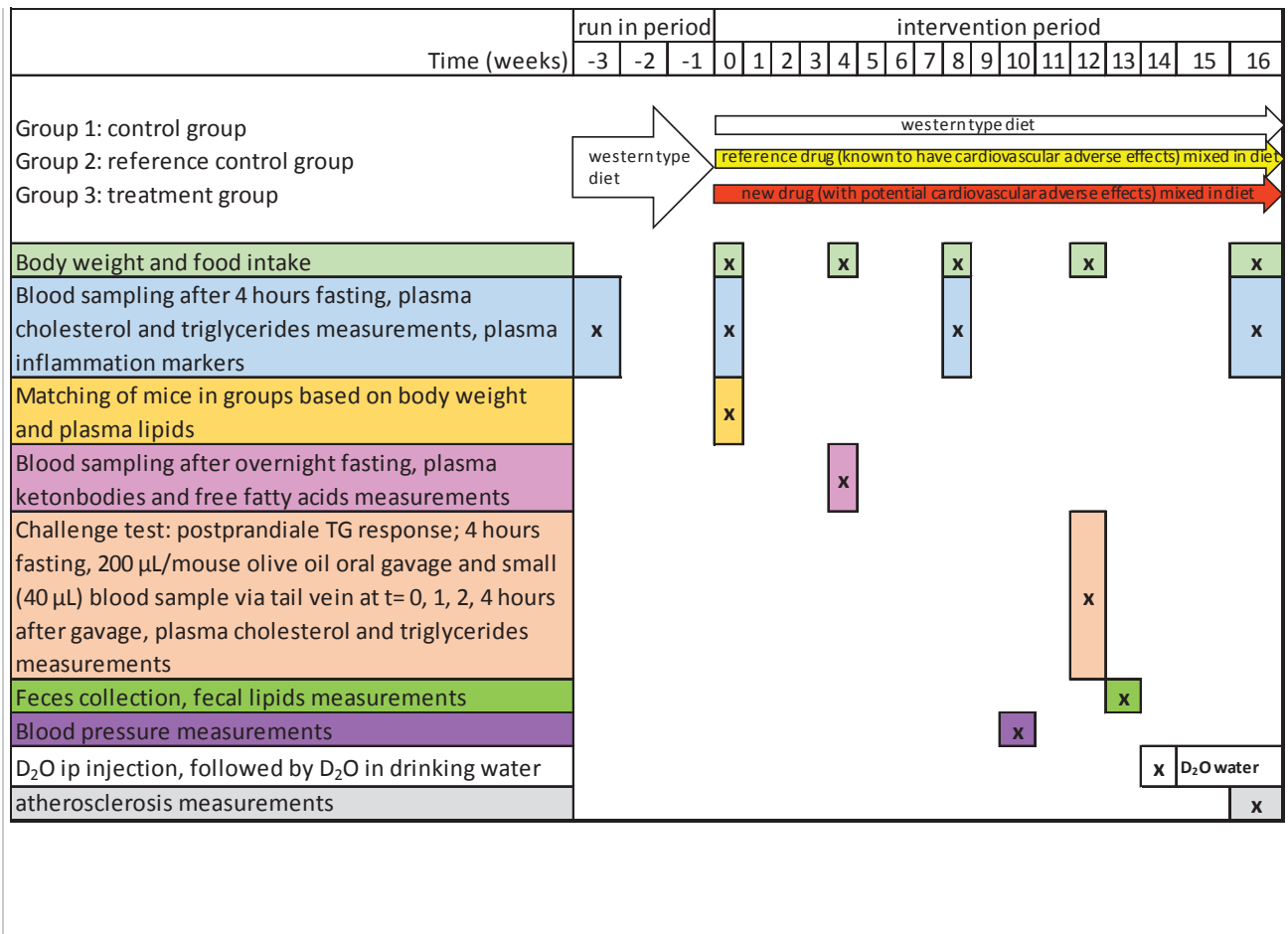
### **K. Classification of severity of procedures**

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

In general, the cumulative discomfort for cardiovascular safety studies will be mild or moderate and will not extend beyond moderate. We expect that 95% of the mice will reach a mild cumulative discomfort and 5% of the mice will reach a moderate cumulative discomfort. The different procedures that can be used, will all be within good practice (Diehl et al., J Appl Toxicol. 2001 Jan-Feb; 21(1):15-23) and are assigned to the following categories:

| <b>Animal procedure:</b>  | <b>Level of discomfort:</b>              |
|---|--|
| Diet interventions  | mild                                     |
| Drinking water interventions  | mild                                     |
| D <sub>2</sub> O drinking water   | mild                                     |
| Blood sampling, non-fasted or after 4 or 5 hours fasting period or after overnight fasting period | mild                                     |
| Multiple blood sampling via tail vein within good practice  | mild                                     |
| Single or multiple gavage or injections (iv, ip, im, sc)  | mild, incidentally extending to moderate |
| Feces collection or fecal swabs   | mild                                     |
| VLDL production test  | non-recovery                             |
| VLDL clearance test   | non-recovery                             |
| Challenge tests   | mild or moderate                         |
| Surgery: s.c. osmotic minipumps   | moderate                                 |
| Euthanasia  | mild                                     |
|   |  |

Depending on the research question, different procedures will be performed in a study. In principle all procedures, except VLDL clearance and production (both non recovery procedures), could be performed in the same mouse. The study will be designed in a way that the mice will be given time to recover between these procedures. Example of an experimental set up:



### End of experiment

#### L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

Cardiovascular disease manifests within tissues and cannot be analyzed only via plasma. Therefore, the tissues are needed for measurements: heart, aortic root or aorta for atherosclerosis analysis

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

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

X Yes

**A. Algemene gegevens over de procedure**

1. Aanvraagnummer :
2. Titel van het project : Investigating potential cardiovascular safety issues of drugs and other substances
3. Titel van de NTS : Het testen van medicijnen en andere stoffen op hart- en vaatziekten gerelateerde bijwerkingen
4. Type aanvraag:
  - nieuwe aanvraag projectvergunning
  - wijziging van vergunning met nummer :
5. Contactgegevens DEC
  - Naam DEC : DEC TNO
  - Telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
  - Emailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
  - ontvangen door DEC: 4-5-2017
  - aanvraag compleet:
  - in vergadering besproken: 11-5-2017
  - anderszins behandeld:
  - termijnonderbreking(en) van / tot : van 15-5-2017 (vragen) tot 21-6-2017 (antwoorden)
  - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
  - aanpassing aanvraag: 21-6-2017
  - advies aan CCD: 30-6-2017
7. De aanvraag is afgestemd met de IvD en deze is hiermee akkoord.
8. Eventueel horen van aanvrager : n.v.t.
  - Datum:
  - Plaats:
  - Aantal aanwezige DEC-leden:
  - Aanwezige (namens) aanvrager:
  - Gestelde vragen en verstrekte antwoorden:
  - Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag.
9. Correspondentie met de aanvrager
  - Datum vragen: 15-5-2017
  - Datum antwoord: 21-6-2017
  - De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.
  - Gestelde vragen en antwoorden:

1. Kunt u de titel van het projectvoorstel nader preciseren? De huidige titel lijkt een heel programma van onderzoek te kunnen vertegenwoordigen, terwijl het project een heel specifiek onderdeel weergeeft van 'cardiovascular safety'. In onze ogen dekt de frase 'Investigating potential cardiovascular safety issues of drugs' uit 3.3 de lading van het gehele project. We verzoeken u de titel van de NTS hierop te laten aansluiten.  
De titel is nu aangepast naar "Investigating potential cardiovascular safety issues of drugs and other substances"
2. De DEC heeft uitgebreid gediscussieerd over de aanleiding van het doen van een studie binnen dit project. We maken ons zorgen dat alleen bij epidemiologische gegevens die richting een cardiovasculair effect van een compound wijzen, meer onderzoek gedaan wordt naar dergelijke effecten van een stof. Zijn er ook andere aanleidingen om onderzoek te doen in deze richting, zoals bepaalde bekende eigenschappen van stoffen die om nader onderzoek vragen?  
Ook als preklinische in vitro en in vivo of in silico (TSA) studies potentiële cardiovasculaire issues geven en ook als er bekende eigenschappen van stofklassen zijn die mogelijk cardiovasculaire issues geven is dit een aanleiding om nader onderzoek te doen in relevante modellen. Dit is bij 3.4 Research strategy toegevoegd.
3. De DEC vond het schema van de verschillende diersmodellen een zeer heldere en beknopte weergave van de toepassing. Kunt u ook specifiek beschrijven hoe u op basis van gegevens van een compound of effecten die gezien zijn de keuze maakt tussen de verschillende diersmodellen? Om een weging te kunnen maken moet deze strategie helder zijn. Betrek in deze strategie ook het gebruik van de C57BL6/J wild-type muis. Deze ontbreekt namelijk in de tabel onder 3.4.2 van het projectvoorstel.  
We hebben de C57BL6/J wild type muis weggehaald bij de appendix bij B animals, omdat deze tot op heden niet als geschikt model is gekozen voor CV safety studies, en naar verwachting ook in de toekomst niet gekozen zal worden als model.

De keuze van het muismodel hangt af van de onderzoeksvraag. In het algemeen kunnen we zeggen dat de APOE\*3Leiden of APOE\*3Leiden.CETP muis de voorkeur heeft ten opzichte van de APOE-/- en LDLR-/- muis omdat de APOE\*3Leiden of de APOE\*3Leiden.CETP muis naar onze mening het beste translationele model is om potentiële cardiovasculaire issues te onderzoeken. De APOE\*3Leiden muis bevat het humane APOE\*3Leiden transgen wat zorgt voor een vertraagde, op de mens lijkende, (V)LDL klaring. De APOE\*3Leiden.CETP muis heeft dezelfde karakteristieken als de APOE\*3Leiden muis wat betreft het (V)LDL metabolisme, maar heeft hiernaast ook het humane CETP gen, waardoor de muis ook translationeel is wat betreft het HDL metabolisme. Als er mogelijk nadelige effecten zijn op het HDL metabolisme (naast mogelijke nadelige effecten op het (V)LDL metabolisme) heeft de APOE\*3Leiden.CETP muis de voorkeur ten opzichte van de APOE\*3Leiden muis. De APOE\*3Leiden muis heeft de voorkeur ten opzichte van de APOE\*3Leiden.CETP muis als we het CETP gemedieerde HDL-metabolisme willen uitsluiten of als de focus van de studie ligt op nadelige effecten op chronische inflammatie.

De APOE-/- muis of de LDLR-/- muis wordt gebruikt als we de betrokkenheid van ApoE of LDLR gemedieerde (V)LDL klaring bij de potentiële cardiovasculaire issues willen uitsluiten of als we bijvoorbeeld een onafhankelijke bevestiging zouden willen van gegevens met deze stammen in de literatuur. Dit is nu verwerkt in de tekst bij 3.4.2.

4. In uw projectaanvraag lezen we dat de dieren geen ongerief ondervinden van de specifieke cardiovasculaire fysiologie bij deze modellen. Tenzij wij dit verkeerd begrepen hebben, kan in de bijlage onder 2.J humane eindpunten, de vraag met "No" beantwoord worden. De informatie die u daar geeft is echter wel relevant, en past goed in I van de bijlage.  
Dit is nu aangepast, tekst is verhuist naar bijlage2 i, en bij 2.j is antwoord nu no geworden
5. Om een afweging te maken is het voor ons van belang dat het helder is hoe de dieren ingedeeld zijn in de verschillende ongeriefklassen. In de bijlage onder 2.K, de classificatie van het ongerief, missen we de percentages van dieren die naar verwachting elk van de klassen zullen bereiken, gerelateerd aan handelingen en herhalingen of combinaties daarvan (cumulatief ongerief). 5% moderate en 95% mild, dit is nu in 2.K toegevoegd.
6. In 2.K is sprake van de toepassing van 'good practice'. Kunt u dit preciseren? Hoe bepaalt u bijvoorbeeld hoeveel handelingen u doet aan een dier? We hebben nu toegevoegd dat dit good practice according to Diehl et al is., hoeveelheid en welke handelingen worden uitgevoerd bij een dier is afhankelijk van de onderzoeksvraag, waarbij natuurlijk wel genoeg tijd tussen de verschillende handelingen zit, om het dier te laten herstellen indien van toepassing. In principe zouden alle handelingen in één studie kunnen worden uitgevoerd, behalve de VLDL klaring en productie studie (beiden non-recovery). Deze zinnen zijn nu toegevoegd aan 2K. Tevens is een voorbeeld toegevoegd van een studieopzet waarin voor zover combineerbaar in een studie alle handelingen zijn opgenomen. Dit geeft de DEC een idee van het maximum aan handelingen dat een muis zal ondergaan.

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 (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Er zijn geen DEC-leden betrokken bij het betreffende project.

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

1. De aanvraag is toetsbaar en heeft voldoende samenhang. Het betreft het in opdracht controleren van verschillende medicijnen en stoffen op ongunstige bijwerkingen op het gebied van hart en bloedvaten. Om die specifieke en veel voorkomende bijwerkingen op te sporen worden muizen gebruikt die speciaal gevoelig zijn voor dit soort aandoeningen. Hoewel vooraf niet bekend is welke opdrachten er te verwachten zijn, ligt er met dit projectvoorstel een concrete aanpak op tafel die per opdracht kan worden toegepast op grond van strategische keuzes. In totaal vormt dit een logische eenheid. Naar de mening van de DEC heeft dit project dan ook voldoende samenhang en is het als een geheel te benaderen.
2. Voor zover de DEC bekend is, er is geen mogelijk tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de dierexperimenten in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) sluit(en) aan bij de hoofddoelstelling(en). Het gaat om translationeel/toegepast onderzoek, namelijk het testen van medicijnen en stoffen op ongunstige bijwerkingen op het gebied van hart en bloedvaten bij de mens.

#### *Belangen en waarden*

4. Het directe doel van het project is van concrete medicijnen en stoffen achterhalen of zij een risico vormen voor hart en bloedvaten. Het uiteindelijke doel van het project is bijdragen aan onderzoek op het gebied van veiligheid van medicijnen en stoffen, voor hart en bloedvaten. De aanvrager maakt helder dat de dierexperimenten daadwerkelijk kunnen bijdragen aan dit uiteindelijke doel. De DEC is daarom van mening dat er in voldoende mate een relatie is tussen het directe doel en het uiteindelijke doel. De experimenten worden gedaan als er epidemiologische aanleiding is om cardiovasculaire bijwerkingen te vermoeden of als er op andere wijze (in vitro, in vivo, op grond van eigenschappen van stofklassen) aanleiding is om

dergelijke bijwerkingen te verwachten, zoals duidelijk is geworden in het antwoord op vraag 2 van de DEC.

5. De belangrijkste belanghebbenden in dit onderzoeksproject zijn: personen die gevoelig zijn voor cardiovasculaire bijwerkingen en de muizen die als proefdier gebruikt worden. Daarnaast hebben opdrachtgevers belang bij informatie over hun (potentiële) product. Ook de uitvoerende organisatie en de medewerkers die aan het onderzoek werken hebben een belang. Voor de personen met een verhoogd risico van cardiovasculaire aandoeningen is direct hun veiligheid in het geding en indirect, wegens het ziekterisico: leven, gezondheid, welzijn en het kunnen ontplooiën van activiteiten. Voor de proefdieren zijn in het geding: leven, gezondheid, welzijn en het kunnen vertonen van natuurlijk gedrag. Voor de opdrachtgevers en de uitvoerende organisatie gaat het voornamelijk om een economisch belang. Voor de betrokken medewerkers van TNO gaat het om hun professionele ontwikkeling.
6. De DEC ziet geen aanleiding om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken. De voorschriften voor werken met genetisch gemodificeerde organismen worden in acht genomen.

#### *Proefopzet en haalbaarheid*

7. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd en dragen eraan bij dat de doelstellingen behaald kunnen worden, dat aan de 3V-beginselen voldaan kan worden en dat voorkomen kan worden dat mens, dier en milieu negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven. De aanvrager werkt met specialistische onderzoeksgroepen met jaren ervaring, zowel op het gebied van veiligheid van stoffen als van cardiovasculaire aandoeningen. Bij punt 3.2 van de aanvraag wordt duidelijk dat de organisatie al concrete resultaten heeft geboekt op het genoemde terrein. Ook is er grondige kennis aanwezig van de specifieke diermodellen, evenals een netwerk dat actuele kennisuitwisseling bevordert.
8. Het project is goed opgezet. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten logisch en helder aan bij de aangegeven doelstellingen, en de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Muizen krijgen de onderzochte stoffen toegediend op een wijze die telkens past bij de voorliggende onderzoeksvraag, waarna diverse parameters worden gemeten. De strategie is nauwkeurig omschreven en met het antwoord op vraag 3 van de DEC extra verduidelijkt wat betreft de keuze van de diermodellen.

#### *Welzijn dieren*

9. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:  
 Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)



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

10. De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de EU-richtlijn.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. De DEC had hierover wel enkele vragen (4, 5 en 6). De antwoorden daarop hebben duidelijkheid verschaft en zijn opgenomen in de aangepaste bijlage. Ongerief wordt vrijwel uitsluitend verwacht als gevolg van handelingen die met het onderzoek te maken hebben. Het zal zelden gebeuren dat een dier klinische symptomen ervaart (<0,1%). Het cumulatieve ongerief betreft dan ook verschillende handelingen, waarbij rustpauzes in acht worden genomen zoals verduidelijkt in het voorbeeldschema bij 2.K in de bijlage. De DEC is van mening dat de tabel, eveneens onder 2.K, een passende schatting van het ongerief biedt, ook wat betreft de geschatte percentages dieren met (cumulatief) 5% matig en 95% mild ongerief.
12. De integriteit van de dieren wordt aangetast in die zin dat ze als proefdier worden gebruikt en worden gedood. Er is geen andere aantasting van de integriteit van het dier.
13. De humane eindpunten zijn in de bijlage dierproeven goed gedefinieerd en het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt bereikt is goed ingeschat. Naar schatting zal een zeer klein deel van de dieren het eindpunt bereiken, namelijk <0,1%. Dit zal niet gebeuren als gevolg van de experimentele handelingen. Daarom is op advies van de DEC bij 2.J in de bijlage "no" aangekruist en onder 2.I kort beschreven wat criteria zijn voor het uit de proef halen van dieren in incidentele gevallen. Dit is zo gedaan naar aanleiding van vraag 4 van de DEC.
- 3V's
14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Dit komt voornamelijk door de complexiteit van cardiovasculaire aandoeningen.
15. Het aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en er is een heldere strategie om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Dit gebeurt door middel van vooronderzoek, pilotstudies, poweranalyses, een stapsgewijze aanpak en het maken van combinaties van studies, zoals toegelicht in 2.D van de bijlage.

16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project is zodanig opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Dit toont zich in diverse maatregelen vermeld onder 2.D van de bijlage, bijvoorbeeld observatie van de dieren door verschillende personen.
17. Er is geen sprake van wettelijk vereist onderzoek.

*Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef*

18. Er zullen volgens de bijlage zowel mannelijke als vrouwelijke dieren worden gebruikt, maar het is niet te voorspellen of die twee in balans zullen zijn. Men is hierbij afhankelijk van het optimale geslacht per studie om een goed onderzoeksresultaat te behalen. De DEC is ervan overtuigd dat de aanvrager in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd dat het, om de doelstellingen te bereiken en de kwaliteit van de studies te garanderen, noodzakelijk is om de proeven soms met mannelijke, soms met vrouwelijke dieren uit te voeren.
19. De dieren worden in het kader van het project gedood. Dit is noodzakelijk om lichaamsmaterialen nader te onderzoeken ten behoeve van analyse van de uitwerking van bepaalde stoffen. De dieren worden op een volgens de bijlage IV van de EU-richtlijn passende methode gedood.
20. Omdat in het projectvoorstel muizen worden aangevraagd is de vraag over herplaatsing/hergebruik niet van toepassing.

*NTS*

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

**D. Ethische afweging**

1. De centrale morele vraag luidt: rechtvaardigt het verminderen van risico's op het gebied van cardiovasculaire bijwerkingen de dood van 1.500 muizen en het voor (naar schatting) 95% van de dieren lichte, voor 5% van de dieren matige ongerief?
2. Het belang van veiligheid van stoffen en medicijnen voor personen die gevoelig zijn voor cardiovasculaire aandoeningen is groot. Deze aandoeningen komen veel voor en zijn veelal ernstig en soms levensbedreigend. Het belang van de 1.500 muizen om van ongerief verschoond te blijven (voornamelijk licht ongerief, deels matig ongerief) is ook aanzienlijk. De belangen van organisaties en bij de proeven betrokken personen zijn hierbij vergeleken klein.

3. De DEC is overtuigd van het belang van de doelstelling om de veiligheid van stoffen en medicijnen voor personen met aanleg voor cardiovasculaire aandoeningen te vergroten. De DEC weegt het voordeel voor deze personen zwaarder dan het nadeel voor de 1.500 proefdieren. De DEC vindt het belangrijk dat dit soort onderzoek wordt gedaan, omdat het om grote risico's voor de betreffende personen gaat, en om een grote bevolkingsgroep. Op grond van het bovenstaande is de DEC TNO van mening dat het gebruik van de dieren voor dit onderzoeksproject gerechtvaardigd is.

### **E. Advies**

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden.

De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

3. De volgende knelpunten/dilemma's zijn naar voren gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies. De DEC heeft gediscussieerd over de vraag of het voldoende is om te reageren op epidemiologische signalen dat er iets mis is met een stof of medicijn, omdat daarmee ziekte niet wordt voorkomen. Hierop is door de aanvrager afdoende antwoord gegeven bij vraag 2 van de DEC. Andere, eerdere, signalen worden ook meegenomen. Dit is door de aanvrager expliciet gemaakt bij de onderzoeksstrategie onder 3.4 in de aanvraag.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

TNO

Postbus 96800

2509 JE 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  
AVD5010020172506

**Bijlagen**

2

Datum 5 juli 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 5 juli 2017. Het gaat om uw project "Investigation potential cardiovascular safety issues of drugs and other substances". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD5010020172506. 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](http://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:**

AVD5010020172506

**Datum:**

5 juli 2017

**Aanvraagnummer:**

AVD5010020172506

### **Gegevens aanvrager**

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 50100

Naam instelling of organisatie: TNO

Naam portefeuillehouder of  
diens gemachtigde:

KvK-nummer: 27376655

Postbus: 96800

Postcode en plaats: 2509 JE DEN HAAG

IBAN: NL39INGB0657819271

Tenaamstelling van het  
rekeningnummer: TNO

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam:

Functie: Onderzoeker

Afdeling:

Telefoonnummer:

E-mailadres:

**Datum:**  
5 juli 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD5010020172506

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens gemachtigde

Naam: [REDACTED]  
Postbus: 96800  
Postcode en plaats: 2509 JE DEN HAAG

Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Ja

Wat mag de gemachtigde doen?


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

**Over uw aanvraag**

Wat voor aanvraag doet u?

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

**Over uw project**

Geplande startdatum: 1 januari 2018  
Geplande einddatum: 31 december 2023  
Titel project: Investigation potential cardiovascular safety issues of drugs and other substances  
Titel niet-technische samenvatting: Het testen van medicijnen en andere stoffen op hart- en vaatziekten gerelateerde bijwerkingen  
Naam DEC: DEC-TNO  
Postadres DEC: 96800 2509 JE DEN HAAG  
E-mailadres DEC: 

**Datum:**  
5 juli 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD5010020172506

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 1035,-  
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

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


**Ondertekening**

Naam:   
Functie:   
Plaats: Den Haag  
Datum: 5 juli 2017





> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

TNO  
T.a.v. Accounts Payable  
Postbus 96829  
2509 JE 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  
AVD5010020172506  
**Bijlagen**  
2

Datum 5 juli 2017  
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 5 juli 2017  
Vervaldatum: 4 augustus 2017  
Factuurnummer: 172506  
Ordernummer: s.v.p. uw factuur o.v.v. 'vooruitbetaling' en het bestelnummer 3100165835/1

| Omschrijving  | Bedrag    |
|---|-----------|
| Betaling leges projectvergunning dierproeven<br>Betreft aanvraag AVD5010020172506 | € 1035,00 |

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

TNO

Postbus 96800

2509 JE 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  
AVD5010020172506  
**Bijlagen**  
1

Datum 18 juli 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 5 juli 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Investigation potential cardiovascular safety issues of drugs and other substances" met aanvraagnummer AVD5010020172506. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

#### **Beslissing**

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

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

U kunt met uw project "Investigation potential cardiovascular safety issues of drugs and other substances" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 januari 2018 tot en met 31 december 2022. Deze termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat U een looptijd van 6 jaar aanvraagt; de maximale looptijd van een vergunning bedraagt 5 jaar.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

#### **Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-TNO gevoegd. Dit advies is opgesteld op 30 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:**  
18 juli 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD5010020172506

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

Centrale Commissie Dierproeven



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: TNO  
Adres: Postbus 96800  
Postcode en plaats: 2509 JE DEN HAAG  
Deelnemersnummer: 50100

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 januari 2018 tot en met 31 december 2022, voor het project "Investigation potential cardiovascular safety issues of drugs and other substances" met aanvraagnummer AVD5010020172506, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-TNO. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Onderzoeker.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 5 juli 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 5 juli 2017;
  - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 5 juli 2017;
  - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 30 juni 2017, ontvangen op 5 juli 2017.

| Naam proef  | Diersoort/ Stam         | Aantal dieren | Ernst                       | Opmerkingen |
|---|-------------------------|---------------|-----------------------------|-------------|
| <b>3.4.4.1 Investigating potential cardiovascular safety issues of drugs and other substances</b> |                         |               |                             |             |
|   | Muizen (Mus musculus) / | 1.500         | 5%<br>Matig<br>95%<br>Licht |             |

### Voorwaarden

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

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

In artikel 10, lid 1 sub a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen

**Aanvraagnummer:**  
AVD5010020172506

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:**  
AVD5010020172506

## 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:**

AVD5010020172506

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.