



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

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

Onze referentie
W17-11

Uw referentie

Briefkenmerk

24 APR 2018

Datum

Betreft Wob-besluit W17-11

Geachte

In uw e-mail van 24 juli 2017 heeft u met een beroep op de Wet openbaarheid van bestuur (hierna: Wob) bij de Centrale Commissie Dierproeven (hierna: CCD) om informatie verzocht met betrekking tot de projectvergunningen die de CCD in de maand juni 2017 heeft afgegeven (uw kenmerk:).

Dit verzoek is door de CCD behandeld onder het kenmerk W17-11. In deze brief vindt u een overzicht van de gevolgde procedure en het besluit op het verzoek. In de overwegingen vindt u een toelichting op de inhoudelijke afwegingen over de openbaarmaking.

1. Besluit

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

2. Procedure

- De ontvangst van uw verzoek (met ons kenmerk W17-11) is op 25 juli 2017 per brief (per e-mail verzonden) aan u bevestigd.
- Met de brief van 21 augustus 2017 (per e-mail aan u verzonden) heeft de CCD u laten weten dat de beslistermijn met vier weken is verdaagd.
- Vervolgens is met de brief van 23 augustus 2017 (op deze datum per e-mail aan u verzonden) aangegeven dat de beslistermijn met vier weken is opgeschort – gerekend vanaf 23 augustus 2017 – vanwege het vragen van zienswijzen aan derde belanghebbenden.
- Met de brief van 30 oktober 2017 (per e-mail verzonden) heeft de CCD u nader geïnformeerd over de voortgang van uw verzoek.
- Op 8 januari 2018 heeft de CCD een bezwaarschrift van uw gemachtigde, de heer Van Drunen, ontvangen tegen het niet tijdig nemen van de beslissing op uw Wob-verzoek van



24 juli 2017.

3. Wettelijk kader

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

4. Inventarisatie documenten

Onder uw verzoek vallen 19 projectvergunningen. Het betreft de vergunningen met de nummers van de Niet Technische Samenvatting (hierna: NTS):

- | | |
|-----------------|-----------------|
| 1. NTS2016607 | 11. NTS20171424 |
| 2. NTS2016634 | 12. NTS20171629 |
| 3. NTS2017791 | 13. NTS20171632 |
| 4. NTS2017881 | 14. NTS20171674 |
| 5. NTS2017895 | 15. NTS20171684 |
| 6. NTS2017896 | 16. NTS20171744 |
| 7. NTS20171047 | 17. NTS20171824 |
| 8. NTS20171085 | 18. NTS20171825 |
| 9. NTS20171204 | 19. NTS20171826 |
| 10. NTS20171304 | |

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

5. Zienswijzen

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

6. Reeds openbare documenten

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

7. Overwegingen

Op grond van artikel 3, lid 5 van de Wob wordt een verzoek om informatie ingewilligd met inachtneming van hetgeen is bepaald in de artikelen 10 en 11 van de Wob. Hierna licht de CCD eerst in algemene zin toe welke kaders de Wob geeft voor openbaarmaking. Vervolgens wordt per weigeringsgrond, ingeroepen door derde belanghebbenden bij dit Wob-verzoek en/of bij eerdere Wob-verzoeken, ingegaan op de algemene overwegingen die de CCD maakt en wat dit betekent voor het al dan niet openbaar maken van (delen van) de betreffende vergunningen.

Het recht op openbaarmaking op grond van de Wob dient uitsluitend het publieke belang van een goede en democratische bestuursvoering. Het komt iedere burger in gelijke mate toe. Daarom kan ten aanzien van de openbaarheid geen onderscheid worden gemaakt naar gelang de persoon of de bedoeling of belangen van de verzoeker. De te verrichten belangenafweging betreft dan ook het



algemene belang van openbaarmaking van de gevraagde informatie en de door de weigeringsgronden te beschermen belangen, maar niet het specifieke belang van de verzoeker.

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

7.1. Misbruik van recht

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

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

7.2. Wob vs Wod en Europese regelgeving

Belanghebbenden verzoeken om de openbaarmaking van alle documenten geheel te weigeren. Hierbij wordt verwezen naar artikel 43 de Europese richtlijn 2010/63/EU (hierna: Richtlijn) en de Europese richtlijn 2010/63/EU om aan te geven dat openbaarmaking van meer informatie dan de NTS-en in conflict is met deze richtlijn. Tevens wordt verwezen naar artikel 39 van het Europees verdrag inzake de handelsaspecten van intellectueel eigendom (TRIPs), naar artikel 8 van het Europees Verdrag voor de Rechten van de Mens (EVRM), artikel 7 van het Handvest voor de Grondrechten van de EU (Handvest) en naar artikel 4, lid 3 van het Verdrag betreffende de Europese Unie (VEU).

Richtlijn

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



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

TRIPs

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

Nederland is verdragspartij bij het TRIPs-verdrag en dit verdrag is door de EU goedgekeurd. Het TRIPs-verdrag voorziet expliciet in de bescherming van bedrijfsgeheimen en andere niet openbaar gemaakte informatie. Artikel 39 lid 3 TRIPs schrijft voor dat leden de gegevens tegen oneerlijke concurrentie beschermen. Het TRIPs-verdrag maakt onderdeel uit van het Wereldhandelsverdrag. Het Hof van Justitie heeft vanaf 1999 consequent bepaald dat het Wereldhandelsverdrag geen rechtstreekse werking heeft². Dit betekent dat de lidstaten het verdrag dienen te implementeren op basis van Europese of nationale regelingen en dat een rechtstreeks beroep op TRIPs niet kan slagen.

De bescherming van bedrijfsgeheimen is gewaarborgd in artikel 10, lid 1 sub c van de Wob. Hiermee is de beoordeling conform de Wob niet in strijd met artikel 39 lid 3 TRIPs. De vraag of de gegevens wel of niet mogen worden verstrekt, kan dus worden beantwoord na afweging van het bepaalde in de artikelen 10 en 11 van de Wob (en niet artikel 39 TRIPs).

EVRM

Artikel 8 van het EVRM en artikel 7 van het Handvest gaan over de bescherming van persoonsgegevens. De bescherming van de persoonlijke levenssfeer wordt gewaarborgd door artikel 10, lid 2, onderdeel e van de Wob. Hiermee is de beoordeling conform de Wob niet in strijd met artikel 8 van het EVRM.

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

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

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



7.3. Bedrijfs- en fabricagegegevens

Artikel 10, lid 1 aanhef en onder sub c van de Wob bepaalt dat het verstrekken van informatie achterwege blijft voor zover dit bedrijfs- en fabricagegegevens betreft, die door natuurlijke personen of rechtspersonen vertrouwelijk aan de overheid zijn medegedeeld.

Volgens vaste jurisprudentie dient artikel 10, lid 1 onder c van de Wob restrictief te worden uitgelegd. Om te kunnen spreken van bedrijfs- en fabricagegegevens dient inzichtelijk te zijn dat de informatie in de betreffende onderdelen van de documenten, afzonderlijk en in onderlinge samenhang beschouwd, zijn aan te merken als concurrentiegevoelige bedrijfsinformatie, waarvan openbaarmaking leidt tot wetenswaardigheden met betrekking tot de technische bedrijfsvoering of het productieproces, dan wel met betrekking tot de afzet van de producten of de kring van afnemers en leveranciers. Ook gegevens die uitsluitend de financiële bedrijfsvoering betreffen, kunnen onder omstandigheden als bedrijfsgegevens worden aangemerkt. Daarbij zal de actualiteit van de gegevens moeten worden betrokken. De CCD verwijst in dit kader naar de uitspraak van de Raad van State van 23 december 2015 (ECLI:NL:RvS:2015:3976). In deze uitspraak zijn de namen van leveranciers aangemerkt als bedrijfsgegevens. Details over de onderzoeksopzet kunnen eveneens worden aangemerkt als bedrijfsgegevens. De CCD verwijst in dit kader naar de uitspraak van de rechtbank Noord-Nederland van 16 oktober 2015 (ECLI:NL:RBNNE:2015:4811).

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

Instellingsgegevens

Er wordt betoogd dat algemene instellingsgegevens, zoals de naam van de instelling, het deelnemernummer bij de NVWA, het KvK-nummer en het IBAN-rekeningnummer, onder de bedrijfsgegevens vallen waarvan openbaarmaking op grond van artikel 10, lid 1 aanhef en onder sub c van de Wob geweigerd zou moeten worden.

De CCD is van oordeel dat met betrekking tot deze instellingsgegevens van vergunninghouders en DEC's niet gesproken kan worden van bedrijfsgegevens. Hierbij verwijst de CCD naar de uitspraak van de rechtbank Gelderland 12 juni 2014 (ECLI:NL:RBGEL:2014:3654). In deze uitspraak geeft de rechtbank aan dat het deelnemernummer of de naam dan wel aanduiding van een organisatorische werkeenheid van vergunninghouder niet valt aan te merken als bedrijfs- of fabricagegegevens. Openbaarmaking van algemene instellingsgegevens wordt niet op deze weigeringsgrond geweigerd.



7.4. Persoonsgegevens

Conform artikel 10, lid 1 aanhef en onder sub d van de Wob blijft het verstrekken van informatie achterwege voor zover het persoonsgegevens betreft als bedoeld in paragraaf 2 van hoofdstuk 2 van de Wet bescherming persoonsgegevens, tenzij de verstrekking kennelijk geen inbreuk op de persoonlijke levenssfeer maakt.

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

7.5. Eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer

Op grond van artikel 10, lid 2 aanhef en onder sub e van de Wob blijft verstrekking van informatie achterwege voor zover het belang daarvan niet opweegt tegen het belang dat de persoonlijke levenssfeer wordt geëerbiedigd.

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

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

Deze gegevens staan vermeld in de aanvraagformulieren, de ontvangen en verzonden brieven, ontvangen en verzonden e-mails en de vergunningen en beschikkingen.

De CCD is van oordeel dat ten aanzien van deze gegevens, voor alle vergunningen het belang dat de persoonlijke levenssfeer wordt geëerbiedigd zwaarder moet wegen dan het belang van openbaarheid. Daarbij is van belang dat met het openbaar maken van persoonsnamen en tot personen herleidbare gegevens, deze gegevens voor een ieder openbaar zijn en ook openbaar blijven. De CCD licht dit als volgt toe.

Uit de Memorie van Toelichting bij de Wet op de dierproeven (Tweede Kamer, vergaderjaar 2012–2013, 33 692, nr. 3) volgt dat de belangen van de bescherming van de gegevens die herleidbaar zijn naar personen in afweging tot openbaar maken van deze gegevens zwaar moet wegen. Betrokkenen moeten vrijelijk en anoniem hun werk kunnen doen. Daarbij speelt een rol dat personen



die betrokken zijn bij het verrichten van dierproeven een maatschappelijke taak uitoefenen en het risico lopen slachtoffer te worden van dierenrechtenactivisme.

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

Uit de uitspraak van de Raad van State van 12 juni 2013 (ECLI:NL:RVS:CA2883) volgt dat ambtenaren met een publieke functie en de in de openbaarheid tredende ambtenaren die besluiten krachtens mandaat hebben ondertekend in beginsel wel moeten aanvaarden dat hun namen met de ondertekening van de besluiten naar buiten komen. De naam van de secretaris van de CCD wordt dan ook openbaar gemaakt.

Dreiging dierenrechtenactivisme

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

Wanneer men de publicaties van het DTN van de afgelopen tien jaren bekijkt, is te zien dat er een golfbeweging is met betrekking tot de mate van acties van dierenrechtenactivisten, waarbij niet valt uit te sluiten dat het dierenrechtenactivisme weer opkomt. Dit is afhankelijk van allerlei factoren, die zich vooraf niet laten voorspellen. Hierdoor is niet in te schatten welke vergunning een dreiging van dierenrechtenactivisme met zich meebrengt. Het gegeven dat in het recente DTN (nummer 47) geen dreigingsbeeld van dierenrechtenactivisten is opgenomen, betekent niet dat (de vrees voor) bedreigingen en intimidatie van het dierenrechten extremisme niet meer actueel zijn. Het dreigingsbeeld toont immers de afgelopen tien jaren een afwisselend beeld met een hoger en minder hoog dreigingsbeeld.

Dat er nog steeds een reële dreiging van radicaal dierenrechtenactivisme uitgaat, blijkt ook uit de recente uitspraken van de Afdeling bestuursrechtspraak van de Raad van State van 15 maart 2017 (ECLI:NL:RVS:2017:680), 5 april 2017 (ECLI:NL:RVS:2017:952), 7 juni 2017 (ECLI:NL:RVS:2017:1498) en 14 februari 2018 (ECLI:NL:RVS:2018:492).

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



7.6. Het voorkomen van onevenredige bevoordeling of benadeling

Conform artikel 10, lid 2 aanhef en onder sub g van de Wob blijft verstrekking van informatie achterwege voor zover het belang daarvan niet opweegt tegen het belang van het voorkomen van onevenredige bevoordeling of benadeling van bij de aangelegenheid betrokken natuurlijke personen of rechtspersonen, dan wel van derden.

Herleidbaarheid

Diverse vergunninghouders hebben verzocht om weigering van een deel van de documenten aangezien hierin informatie is opgenomen die op zeer eenvoudige wijze te herleiden is naar de betrokken personen. Dit betekent een onevenredige benadeling van betrokken personen, die niet opweegt tegen de belangen van openbaarmaking. Voor de toelichting verwijst de CCD naar hetgeen is uiteengezet onder 'eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer'.

Als gevolg hiervan zullen, naast de gegevens die reeds zijn vermeld onder 'eerbiediging van persoonlijke levenssfeer' eveneens de volgende gegevens – die herleidbaar zijn naar personen – uit de documenten worden verwijderd:

- gegevens over proefdierlocaties en sublocaties, zoals straatnaam, postcode, plaats, maar ook het organisatieonderdeel wanneer deze door de betreffende organisatie nog niet zijn geopenbaard, door bijvoorbeeld een vermelding op een website.

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

De hoofdlocaties van de verschillende instellingen worden, indien er geen bijzondere omstandigheden zijn, geopenbaard. Deze gegevens zijn over het algemeen reeds openbaar. De openbaarmaking van proefdier- dan wel sublocaties die direct tot personen herleidbaar zijn en niet al eerder, bijvoorbeeld door middel van publicatie op een website, zijn geopenbaard, wordt geweigerd. Op de proefdierlocatie worden de proefdieren gehouden en worden de dierproeven uitgevoerd. Deze informatie kan dierenrechtenextremisten aanleiding geven tot bedreiging en intimidaties. Hiervoor kan aansluiting worden gezocht bij de uitspraak van de rechtbank Gelderland van 21 april 2016 (AWB 15/6463). Voor wat betreft de specifieke dierproeflocaties kan tevens aangesloten worden bij de uitspraak van de rechtbank Gelderland van 22 juli 2014 (ECLI:NL:RBGEL:2014:4543) en de Memorie van Toelichting bij de Wod (*Kamerstukken II* 2012/13, 33692, nr. 3, p. 14).

In dit kader wordt eveneens verwezen naar de uitspraken van de Afdeling bestuursrechtspraak van de Raad van State van 15 maart 2017 (ECLI:NL:RVS:2017:680), 5 april 2017 (ECLI:NL:RVS:2017:952), 7 juni 2017 (ECLI:NL:RVS:2017:1498) en 14 februari 2018 (ECLI:NL:RVS:2018:492). De Afdeling stelt in genoemde uitspraken dat het betrokken bestuursorgaan zich in redelijkheid op het standpunt heeft kunnen stellen dat het belang van betrokken derde belanghebbenden om tegen bedreigingen en intimidatie van dierenrechtenactivisten beschermd te blijven en daarmee het belang van het



voorkomen van onevenredige benadeling als bedoeld in artikel 10, tweede lid, aanhef en onder g Wob zwaarder dient te wegen dan het publieke belang bij openbaarmaking van de gevraagde gegevens. Uit de uitspraken volgt dat het belang van bescherming van werknemers van vergunninghouders, proefdierinstellingen en andere betrokkenen groot is en in de afweging van belangen zwaarder weegt dan het publieke belang van openbaarmaking van de gevraagde gegevens.

Algemene (instellings)gegevens

Diverse vergunninghouders hebben verzocht om de openbaarmaking van algemene (instellings)gegevens te weigeren, zoals de naam van de instelling of DEC, instellingsnummer bij de NVWA, het KvK-nummer en het IBAN-rekeningnummer. De vergunninghouders geven aan dat de combinatie van het project en de instellingsgegevens eenvoudig te herleiden zijn naar individuele personen. Met name indien het een kleine afdeling betreft met een zeer beperkte groep onderzoekers. Zij verzoeken om deze reden de openbaarmaking van deze gegevens te weigeren in verband met de vrees voor dierenrechtenactivisten. De context dan wel bijzonderheden van de gevraagde documenten in relatie tot de naam van de vergunninghouder of adviserende DEC kunnen reden zijn voor het weigeren van hun bedrijfsnamen (verwezen wordt naar de uitspraak van de rechtbank Gelderland van 21 april 2016, AWB 15/6463).

Bij het verzoek om dergelijke gegevens te weigeren overweegt de CCD of er sprake is van een bijzondere situatie. Indien er sprake is van een bijzondere situatie kan er in bepaalde gevallen aanleiding zijn tot weigering van de naam van algemene instellingsgegevens zoals de naam van een vergunninghouder en/of de adviserende DEC. Van een bijzondere situatie kan bijvoorbeeld gesproken worden bij een actuele dreiging en/of aantoonbare dreigingen jegens de vergunninghouder of DEC, in bijvoorbeeld de vorm van acties van dierenrechtenactivisten. Indien er geen bijzondere situatie is worden deze gegevens geopenbaard.

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

Literatuurverwijzingen

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

De CCD is van oordeel dat het belang van openbaarmaking in dit geval niet opweegt tegen de onevenredige benadeling als gevolg van de herleidbaarheid naar de betrokken personen, dan wel de bescherming van de persoonlijke levenssfeer van de betrokken personen. Indien de literatuurverwijzingen afkomstig zijn van bij deze onderzoeken betrokken personen, rechtstreeks verwijzen naar, of rechtstreeks zouden leiden naar betrokken personen, dan worden de literatuurverwijzingen geanonimiseerd. In enkele gevallen wordt eveneens de openbaarmaking geweigerd van verwijzingen naar eerdere



onderzoeken van de betreffende onderzoeksgroep. De reden hiervoor is dat op basis van de betreffende kernwoorden en de openbare gegevens over het onderzoek in diverse zoekmachines eenvoudig is te achterhalen welke onderzoekers bij het project betrokken zijn.

Voorkomen van fraude

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

Concurrentiegevoelige informatie

1. Onderzoeksstrategie

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

2. Publicaties

In aanvulling hierop wijst de CCD op het volgende. Het is een algemeen geldende, ongeschreven regel van (academisch) onderzoek op het terrein van medische en biologische wetenschappen, dat een onderzoeksrapport waaruit al eerder gegevens, analyses of resultaten openbaar zijn gemaakt, in beginsel niet meer voor acceptatie door een gerenommeerd wetenschappelijk tijdschrift in aanmerking komt. Daar waar gegevens herleidbaar zijn tot de onderzoeksstrategie kunnen andere onderzoekers deze overnemen. Met name in de beginfase van een onderzoek zou dit tot onevenredige bevoordeling van de concurrerende onderzoeksgroepen leiden. Openbaarmaking van specifieke informatie kan daarnaast publicatie in wetenschappelijke tijdschriften verhinderen. Het is een gegeven dat het van wezenlijk belang is voor wetenschappelijk onderzoekers om als eerste te kunnen publiceren in gerenommeerde tijdschriften. Als openbaarmaking van informatie toekomstige publicaties in de weg staat, zorgt dit voor een onevenredige benadeling van betrokken onderzoekers. Verwezen wordt naar onder meer de uitspraak van de rechtbank Gelderland van 22 juli 2014 (ECLI:NL:RBGEL:2014:4555).

3. Financiële schade/imagoschade

De onevenredige benadeling als gevolg van het vroegtijdig openbaar maken van specifieke informatie kan tevens zien op het financiële nadeel en de imagoschade die vergunninghouders lijden indien zij geen patent kunnen aanvragen, eerste



publicatie mislopen en/of concurrerende onderzoekers de informatie gebruiken voor het eigen onderzoek.

Het voorgaande betekent dat indien voldoende inzichtelijk is dat openbaarmaking van concurrentiegevoelige bedrijfsinformatie inderdaad leidt tot voordeel voor andere ondernemingen en/of onevenredige benadeling van de vergunninghouder en/of DEC, openbaarmaking van de betreffende delen van de informatie op grond van deze weigeringsgrond wordt geweigerd.

Naam onderzoekspartners en leveranciers

Een aantal vergunninghouders heeft verzocht om de namen van de onderzoekspartners en leveranciers niet te openbaren. De desbetreffende vergunninghouders vrezen dat, zodra de namen van onderzoekspartners en leveranciers zijn geopenbaard, deze partijen te maken krijgen met dierenrechtactivisme. Openbaarmaking van de namen van deze partijen zou ertoe kunnen leiden dat onderzoekspartners en leveranciers de samenwerking met vergunninghouders opzeggen. De CCD is van mening dat het belang van openbaarmaking van de namen van onderzoekspartners en leveranciers niet opwegen tegen de belangen van vergunninghouders, aangezien openbaarmaking in het uiterste geval kan leiden tot het stopzetten van projecten van de desbetreffende vergunninghouders.

7.7. Persoonlijke beleidsopvattingen in een stuk bestemd voor intern beraad

Artikel 11, lid 1 van de Wob bepaalt dat in geval van een verzoek om informatie uit documenten, opgesteld ten behoeve van intern beraad, geen informatie wordt vertrekt over daarin opgenomen persoonlijke beleidsopvattingen.

Voor wat betreft documenten ten behoeve van intern beraad is het oogmerk waarmee het document is opgesteld daartoe bepalend. Uit de uitspraak van de Raad van State van 21 december 2016 (ECLI:NL:RVS:2016:3376) blijkt uit rechtsoverweging 2.2: *"Zoals eveneens volgt uit de geschiedenis van de totstandkoming van de Wob (Kamerstukken II 1986/87, 19 859, nr. 3, bl. 14 en 38) en zoals de Afdeling evenzeer eerder heeft overwogen (onder meer in de uitspraak van 18 augustus 2010, ECLI:NL:RVS:2010:BN4268), beoogt artikel 11, eerste lid, van de Wob ter bescherming van de vrije meningsvorming te verzekeren dat de bij ontwikkeling van beleid van een bestuursorgaan betrokken personen in alle vrijheid en in een vertrouwelijke sfeer hun gedachten en opvattingen kunnen uiten zonder vrees voor gezichtsverlies."*

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



Tenslotte volgt uit deze uitspraak dat artikel 11, lid 1 van de Wob bestuursorganen gebiedt om geen informatie over persoonlijke beleidsopvattingen openbaar te maken uit documenten die ten behoeve van intern beraad zijn opgesteld en dit artikel laat geen ruimte voor een belangenafweging.

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

Aan de adviezen over de vergunningen die onder dit verzoek vallen, heeft een beperkte en aanwijsbare groep ambtenaren gewerkt. De CCD acht het niet van belang voor een goede en democratische bestuursvoering indien standpunten en adviezen van ambtenaren zelfstandig worden betrokken in de publieke discussie. De CCD ziet dan ook geen aanleiding om met toepassing van artikel 11 lid 2 van de Wob in niet tot personen herleidbare vorm informatie te verstrekken over deze persoonlijke beleidsopvattingen.

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

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

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

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

Het feit dat de definitieve versies slechts op kleine (zins)onderdelen afwijken van de eerdere versies geeft voor de CCD wel aanleiding om eerdere versies niet



separaat te openbaren. De CCD zoekt hiervoor aansluiting bij artikel 7, lid 2, sub b van de Wob. De verschillen tussen versies volgen reeds uit de correspondentie tussen de aanvrager en de CCD, en/of uit het advies van de DEC – meer specifiek onderdeel A van het advies. Uit dit onderdeel volgt welke vragen de DEC heeft gesteld aan de aanvrager, de antwoorden van de aanvrager, en tot welke aanpassingen van de aanvraag dit geleid heeft. Voor het overige komen de versies exact overeen, waarmee de verzochte informatie beschikbaar is.

8. Beoordeling per vergunning

Voor alle vergunningen wordt de openbaarmaking geweigerd van gegevens die direct te herleiden zijn naar personen zoals namen van onderzoekers en contactpersonen, directe telefoonnummers en directe e-mailadressen, functies van personen, sub-locaties, handtekeningen, en eventueel faxadressen en rekeningnummers die direct herleidbaar zijn tot personen (op grond van zowel artikel 10, lid 2, onderdeel e als onderdeel g van de Wob). Deze gegevens staan met name op de aanvraagformulieren, de ontvangen en verzonden brieven en e-mails en de vergunningen en beschikkingen. Voor de onderbouwing van de weigering tot openbaarmaking verwijzen wij naar paragraaf 7.5.

De namen van afdelingen of organisatieonderdelen worden geweigerd indien deze zo klein zijn dat betrokkenen eenvoudig te herleiden zijn. De vermelding van kamernummers wordt geweigerd, aangezien deze in combinatie met de adresgegevens direct zijn te liëren aan de betrokken onderzoekers.

Algemene adressen en rekeningnummers die reeds door de organisatie zijn geopenbaard door bijvoorbeeld een vermelding op een website, worden wel geopenbaard.

De aard van bovenstaande geweigerde gegevens is direct af te leiden uit de opbouw en de context van de documenten.

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

1. NTS2016607

Voor NTS2016607 worden naast de persoonsgegevens ook de naam van de afdeling geweigerd. De omvang van de afdeling is dermate gering dat de combinatie van de afdelingsnaam en de functie kan leiden naar specifieke individuen.



2. NTS2016634

Voor NTS2016634 wordt de openbaarmaking geweigerd van enkele literatuurverwijzingen, omdat deze verwijzingen ook namen bevatten van betrokken onderzoekers. Verder is een aantal kernwoorden weggelakt, omdat deze kernwoorden herleidbaar zijn naar de namen van de betrokken onderzoekers. Daarnaast wordt de openbaarmaking geweigerd van de namen van de partijen waarmee vergunninghouder samenwerkt. Openbaarmaking van deze informatie kan enerzijds leiden tot dierenrechtactivisme richting deze partijen. Anderzijds heeft vergunninghouder er (commercieel) belang bij dat de namen van de samenwerkende partijen niet bekend worden bij concurrente partijen.

Daarnaast is informatie weggelakt over de bedrijfsvoering, methoden en gebruikte middelen. Deze informatie is concurrentiegevoelig, omdat openbaarmaking van deze informatie kan leiden tot contractsbeëindiging door samenwerkende partijen. Bovendien betreft het een innovatief onderzoek. Voortijdige publicatie van essentiële informatie zal het onderzoek frustreren. Vergunninghouder heeft er (commercieel) belang bij om de resultaten van het onderzoek als eerste te publiceren, zodra het onderzoek is afgerond.

De naam van de instelling en de DEC worden wel openbaar gemaakt evenals de algemene functiebenamingen van onderzoekers.

3. NTS2017791

Van NTS2017791 wordt de openbaarmaking van de naam van de vergunninghouder en de hiernaar herleidbare gegevens geweigerd. In afwijking van de zienswijze van vergunninghouder wordt het NTS-nummer niet geweigerd. Openbaarmaking van het NTS-nummer leidt er niet toe dat er naar de vergunninghouder herleidbare gegevens worden geopenbaard.

De openbaarmaking van de naam van de DEC wordt eveneens geweigerd, omdat de naam en de adresgegevens van de DEC direct zijn te relateren aan één individu. Bovendien vreest de vergunninghouder en de DEC dat openbaarmaking van de naam en de vestigingsplaats van de DEC kan leiden tot ongewenst dierenrechtactivisme.

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

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



versies op slechts kleine (zins)onderdelen af van de eerdere versies, waarvan niet wordt aangevoerd dat deze persoonlijke beleidsopvattingen zou bevatten.

4. NTS2017881

Van NTS20177881 wordt de openbaarmaking van de naam van de vergunninghouder en de hiernaar herleidbare gegevens geweigerd. Vergunninghouder heeft ten behoeve van een andere Wob-procedure (ons kenmerk: W17-12) een opsomming gegeven van incidenten met dierenrechtactivisten. Vergunninghouder heeft daarmee naar ons oordeel voldoende onderbouwd dat openbaarmaking van de naam en (adres)gegevens van de onderzoekslocatie leidt tot ongewenst dierenrechtactivisme. In afwijking van de zienswijze van vergunninghouder wordt het NTS-nummer niet geweigerd. Openbaarmaking van het NTS-nummer leidt er niet toe dat er naar de vergunninghouder herleidbare gegevens worden geopenbaard.

De openbaarmaking van de naam van de DEC wordt eveneens geweigerd, omdat de naam en de adresgegevens van de DEC direct zijn te relateren aan de vergunninghouder. Tevens wordt de openbaarmaking geweigerd van enkele literatuurverwijzingen, omdat deze verwijzingen namen bevatten van betrokken onderzoekers. Vergunninghouder heeft in de zienswijze aangegeven om openbaarmaking van alle literatuurverwijzingen te weigeren. In afwijking van deze zienswijze heeft de CCD enkel de verwijzingen naar de bij het onderzoek betrokken personen weggelakt. Vergunninghouder heeft immers niet onderbouwd dat ook de nog resterende verwijzingen namen bevatten van personen die direct bij het onderzoek zijn betrokken.

5. NTS2017895

Voor NTS2017895 wordt de openbaarmaking geweigerd van enkele literatuurverwijzingen, omdat deze verwijzingen namen bevatten van betrokken onderzoekers. De naam van de instelling en de DEC worden wel openbaar gemaakt evenals de algemene functiebenamingen van onderzoekers.

6. NTS2017896

Voor NTS2017896 worden naast de persoonsgegevens tevens de naam van een leverancier van proefdieren niet openbaar gemaakt. Vergunninghouder wil hiermee voorkomen dat de desbetreffende leverancier te maken krijgt met ongewenst dierenrechtactivisme. Bovendien bestaat de mogelijkheid dat de desbetreffende leverancier als gevolg van openbaarmaking van zijn naam in de toekomst niet meer met vergunninghouder wenst samen te werken. Verder wordt de openbaarmaking van de naam van de afdeling geweigerd. De omvang van de afdeling is dermate gering dat de combinatie van de afdelingsnaam en de functie kan leiden naar specifieke individuen.

7. NTS20171047

Voor NTS20171047 wordt de openbaarmaking geweigerd van een specifieke onderzoekslocatie, omdat de vergunninghouder vreest voor dierenrechtactivisme op deze locatie. Tevens wordt de openbaarmaking geweigerd van enkele



literatuurverwijzingen, omdat deze verwijzingen namen bevatten van betrokken onderzoekers. De naam van de instelling en de DEC worden wel openbaar gemaakt evenals de algemene functiebenamingen van onderzoekers.

Verder wordt de openbaarmaking geweigerd van ongepubliceerde data en methodes zoals deze zijn opgenomen in het projectvoorstel. Het voortijdig openbaar maken van deze preliminaire data kan voor concurrenten aanleiding zijn om een vergelijkbaar onderzoek op te zetten en de resultaten van deze onderzoeken eerder te publiceren dan vergunninghouder. De bij vergunninghouder werkzame onderzoekers worden daardoor onevenredig benadeeld mede omdat het vervolgens onmogelijk is om een patent te vestigen op reeds gepubliceerde informatie.

8. NTS20171085

Voor NTS 20171085 wordt de openbaarmaking geweigerd van enkele literatuurverwijzingen, omdat deze verwijzingen namen bevatten van betrokken onderzoekers. Daarnaast wordt openbaarmaking geweigerd van de (inter)nationale samenwerkingspartners. Tevens wordt openbaarmaking geweigerd van de locatie en het mailadres van de DEC. De reden waarom openbaarmaking van deze informatie wordt geweigerd is, omdat vergunninghouder vreest dat dierenrechtactivisten de samenwerkingspartners en de leden van de DEC gaan benaderen.

9. NTS20171204

Voor NTS20171204 worden geen aanvullende specifieke gegevens geweigerd.

10. NTS20171304

Voor NTS20171304 worden geen aanvullende specifieke gegevens geweigerd.

11. NTS20171424

Voor NTS 20171424 wordt de openbaarmaking geweigerd van een aantal figuren en tabellen in het projectvoorstel. Deze figuren en tabellen bevatten nog niet gepubliceerde vertrouwelijke en patentgevoelige informatie over het lopende onderzoek. Openbaarmaking van deze informatie schaadt de positie van de betrokken onderzoekers. Immers, het voortijdig openbaar maken van deze preliminaire data kan voor concurrenten aanleiding zijn om een vergelijkbaar onderzoek op te zetten en de resultaten van deze onderzoeken eerder te publiceren dan vergunninghouder. De bij vergunninghouder werkzame onderzoekers worden daardoor onevenredig benadeeld mede omdat het vervolgens onmogelijk is om een patent te vestigen op reeds gepubliceerde informatie.

12. NTS20171629

Van NTS20171629 wordt de openbaarmaking van de naam van de vergunninghouder en de hiernaar herleidbare gegevens geweigerd. De openbaarmaking van de naam van de DEC wordt eveneens geweigerd, omdat de



naam en de adresgegevens van de DEC direct zijn te relateren aan één of enkele individuen. Openbaarmaking van deze informatie wordt geweigerd, omdat vergunninghouder vreest dat dierenrechtactivisten bij de vergunninghouder werkzame personen en de leden van de DEC gaan benaderen en onheus zullen bejegenen.

Daarnaast is informatie weggelakt over de strategie en onderzoeksmethoden die specifiek door vergunninghouder zijn ontwikkeld. Hoewel een deel van de gelakte informatie algemeen bekend is, kan uit de combinatie van deze gegevens of volgorde van een aantal species, aard en frequentie van afname van biologisch materiaal worden afgeleid welke pathogenen vergunninghouder belangrijk acht en welke strategieën en onderzoeksmethoden vergunninghouder zal toepassen. Bij openbaarmaking van deze informatie bestaat de kans dat concurrenten deze informatie gaan gebruiken over eigen onderzoeken. Vergunninghouder heeft er (financieel) belang bij om exclusief gebruik te maken van deze informatie en als eerste over de resultaten te publiceren.

In afwijking van de zienswijze van de vergunninghouder wordt het totaal aantal te gebruiken konijnen, muizen, ratten, cavia's en kippen zoals deze zijn opgenomen in de vergunning wel openbaar gemaakt. Openbaarmaking van deze informatie kan niet meer worden geweigerd, omdat deze totalen ook zijn opgenomen in de NTS en de NTS al is gepubliceerd.

13. NTS20171632

Voor NTS20171632 is een bepaalde benaming van een onderzoeksdocument weggelakt. Uit deze informatie kunnen concurrenten afleiden wat vergunninghouder met de geboekte resultaten wenst te doen.

14. NTS20171674

Voor NTS20171674 worden geen aanvullende specifieke gegevens geweigerd.

15. NTS20171684

Voor NTS20171684 worden geen aanvullende specifieke gegevens geweigerd. In afwijking van de door vergunninghouder ingediende zienswijze worden algemene functiebenamingen zoals "promovendus" wel geopenbaard. De CCD is van mening dat een dergelijke algemene functiebenaming niet herleidbaar is tot een concreet individu.

16. NTS20171744

Voor NTS20171744 worden een aantal kernwoorden en bestanddelen gelakt uit het projectvoorstel, omdat uit deze kernwoorden de onderzoeksstrategie van vergunninghouder kan worden afgeleid.



17. NTS20171824

Voor NTS20171824 wordt de openbaarmaking geweigerd van enkele literatuurverwijzingen, omdat deze verwijzingen ook namen bevatten van betrokken onderzoekers. Verder is een aantal kernwoorden weggelakt, omdat deze kernwoorden herleidbaar zijn naar de namen van de betrokken onderzoekers. Daarnaast wordt de openbaarmaking geweigerd van de specifieke kennis waarover de instelling beschikt en de onderzoeksstrategie. Zo wordt de openbaarmaking van een aantal te gebruiken bestanddelen en modellen geweigerd, omdat uit deze informatie de onderzoeksstrategie kan worden afgeleid. Verder bevatten de documenten ongepubliceerde, preliminaire data. Openbaarmaking van deze data zal vergunninghouder onevenredig benadelen, ook omdat deze informatie gebruikt zal worden voor publicaties en eventuele patenten. De naam van de instelling en de DEC wordt wel openbaar gemaakt evenals de algemene functiebenamingen van onderzoekers.

18. NTS20171825

Voor NTS20171825 wordt de openbaarmaking van de projectbenaming en de samenwerkingspartner geweigerd, omdat openbaarmaking van deze informatie kan leiden tot concrete individuen. Verder is de openbaarmaking geweigerd van een specifieke onderzoeksstrategie, omdat juist deze strategie zou kunnen leiden tot de ontwikkeling van een patentwaardig geneesmiddel. Openbaarmaking van deze informatie kan ertoe leiden dat concurrenten een vergelijkbaar onderzoek zullen gaan starten. De CCD is van mening dat vergunninghouder hierdoor onevenredig zal worden benadeeld.

19. NTS20171826

Voor NTS20171826 is de benaming van een specifieke diersoort niet geopenbaard, omdat er maar één onderzoeksgroep is in Nederland die werkt met deze specifieke diersoort. Openbaarmaking van deze diersoort kan ertoe leiden dat de namen van deze onderzoeksgroep bekend worden. Verder wordt de openbaarmaking geweigerd van enkele literatuurverwijzingen, omdat deze verwijzingen ook namen bevatten van betrokken onderzoekers.

9. Wijze van openbaarmaking

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

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



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

Ik vertrouw erop dat ik u hiermee voldoende heb geïnformeerd.

Hoogachtend,

De Centrale Commissie Dierproeven,
namens deze.



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

Bezwaar

Indien u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen. Het bezwaarschrift kunt u sturen naar de Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag. Bij het indienen van een bezwaarschrift vragen wij u in ieder geval – buiten de in de wet geregelde voorschriften – de datum van de beslissing waartegen u bezwaar maakt en het onderwerp te vermelden. U vindt deze gegevens bovenaan deze brief. Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat het bestreden besluit wel in werking treedt en geldig is. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige voorziening vragen bij de voorzieningenrechter van de rechtbank. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisend belang. Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx kunt u zien onder welke rechtbank uw vestigingsplaats valt.

Inventaris Wob-verzoek W17-11		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	documenten NTS2016607	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
1	Aanvraagformulier				x		x		
2	Projectvoorstel				x		x		
3	Niet-technische samenvatting oud			x					
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1 oud				x		x		
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2 oud				x		x		
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3 oud				x		x		
7	Bijlage beschrijving dierproeven 4 oud				x		x		
8	DEC-advies				x		x		
9	Ontvangstbevestiging				x		x		
10	Verzoek aanvulling aanvraag				x		x		
11	Reactie verzoek aanvulling			x					
12	Projectvoorstel nieuw				x		x		
13	Bijlage beschrijving dierproeven 1 nieuw				x		x		
14	Bijlage beschrijving dierproeven 2 nieuw				x		x		
15	Bijlage beschrijving dierproeven 3 nieuw				x		x		
16	Bijlage beschrijving dierproeven 4 nieuw				x		x		
17	Niet-technische samenvatting nieuw	x							
18	Bijlage beschrijving dierproeven 3 nieuwst				x		x		
19	Bijlage beschrijving dierproeven 4 nieuwst				x		x		
20	Advies CCD		x						x
21	Beschikking en vergunning				x		x		



Aanvraag

Projectvergunning Dierproeven

Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in	11600
		<input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen	
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	Academisch Ziekenhuis Leiden
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	Leids Universitair Medisch Centrum
		KvK-nummer	27366422
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	Straat en huisnummer	Albinusdreef 2
		Postbus	9600
		Postcode en plaats	2300 RC Leiden
		IBAN	NL11DEUT0451001400
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	LUMC
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]
		Functie	Associate Professor
		Afdeling	[Redacted]
		Telefoonnummer	[Redacted]
		E-mailadres	[Redacted]
1.5	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[Redacted] <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.
		Functie	Post doctoral researcher
		Afdeling	[Redacted]
		Telefoonnummer	[Redacted]
		E-mailadres	[Redacted]

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- | | |
|------------|--------------|
| Startdatum | 1 - 6 - 2017 |
| Einddatum | 1 - 6 - 2022 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- The Role of the Solute Carrier Transporter 44A2 (SLC44A2) Gene in the Pathophysiology of Venous Thromboembolism
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- De Rol van de Erfelijke Factor 'Solute Carrier Transporter 44A2' (SLC44A2) in de Ontwikkeling van de Ziekte Veneuze Trombose
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|------------|
| Naam DEC | DEC Leiden |
| Postadres | [Redacted] |
| E-mailadres | [Redacted] |

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1684 Lege
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.
- Via een eenmalige incasso
 Na ontvangst van de factuur

5 Checklist bijlagen

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

6 Ondertekening

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

Centrale Commissie
 Dierproeven
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag

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

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

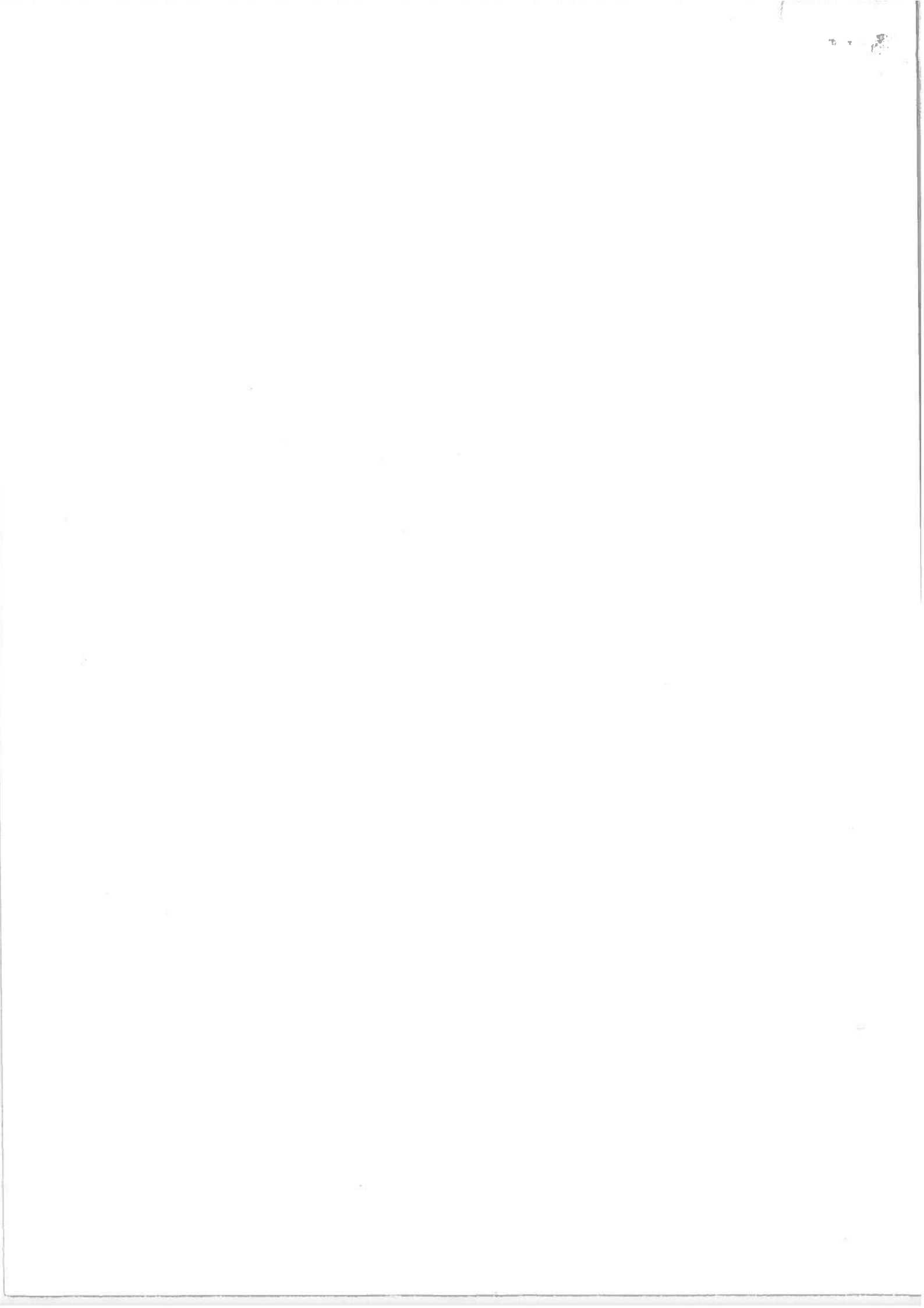
Naam 

Functie Gemandateerd vergunninghouder

Plaats Leiden

Datum 8 - 5 - 17

Handtekening 





Begeleidend schrijven

afdeling
postzone
afzender
bezoekadres
telefoon



fax
e-mail



onze referentie
uw referentie

datum
onderwerp

11-05-2017
Administratieve gegevens
AVD116002016607

aantal pagina's

1

aan

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Geachte heer/mevrouw ,

Bijgaand doen wij u toekomen de administratieve gegevens van AVD116002016607: The Role of the Solute Carrier Transporter 44A2 (SLC44A2) Gene in the Pathophysiology of Venous Thromboembolism.

- naar aanleiding van uw telefonisch/schriftelijk verzoek d.d.
- op verzoek van
- volgens afspraak
- retour met dank voor inzage
- met verzoek om advies / bericht / nadere informatie
- met verzoek de (verdere) behandeling over te nemen
- ter kennisname / inzage
- ter doorzending aan
- gaarne retour
-

Met vriendelijke groet,







Form Project proposal

- This form should be used to write the project proposal for animal procedures.
- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed.
- For more information on the project proposal, see our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 Provide the title of the project.

2 Categories

- 2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.
- Basic research
- Translational or applied research
- Regulatory use or routine production
- Research into environmental protection in the interest of human or
- Research aimed at preserving the species subjected to procedures
- Higher education or training
- Forensic enquiries
- Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

3 General description of the project

3.1 Background

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

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

Venous thromboembolism (VTE) is the third leading cause of cardiovascular mortality worldwide and is responsible for approximately half a million associated deaths in Western Europe each year (Cohen et al

Thromb Haemost 2007). In addition, adverse events linked to VTE, i.e. deep vein thrombosis (DVT) and pulmonary embolism (PE), are major contributing factors to the growing number of years lived with a disability and results in a marked reduction in the quality of life for millions of people every year. VTE is a complex thrombotic disorder influenced both by environmental aspects as well as in particular by genetic predisposition. As part of the [REDACTED], within the Leiden University Medical Center (LUMC), our research mainly focuses on the underlying mechanisms associated with VTE and places a strong emphasis on the role of genetics in this process. This has led to seminal contributions in the VTE field including the discovery of the factor V Leiden mutation in the mid-nineties and subsequently several other genetic variations which can predetermine thrombotic risk. Although there have been several advances in the field with the identification of many genetic variants linked to VTE, they still only explain a minor percentage of VTE risk in many cases.

Recently, as part of the international INVENT consortium, we undertook a meta-analysis of genome-wide association studies (GWAS) to identify additional VTE susceptibility genes (Germain et al. 2015 *Am. J. Human Genetics*). Twelve GWAS totalling 7,507 VTE cases and 52,632 controls formed our discovery stage where 6,751,884 single nucleotide polymorphisms (SNPs) were tested for association with VTE. Nine loci reached the genome-wide significance level including 6 already known to associate with VTE (ABO, F2, F5, F11, FGG and PROC1R) and 3 unsuspected genes. SNPs mapping to the latter genes were selected for replication in 3 independent case-control studies totalling 3,009 VTE patients and 2,586 controls. This strategy led to the identification of *SLC44A2* as a new risk locus (p value = 2.75×10^{-15}). The lead SNP at the *SLC44A2* SNP locus is the non-synonymous rs2288904 previously shown to associate with transfusion related acute lung injury (TRALI). Importantly, a second independent GWAS study found that a locus also located within the *SLC44A2* gene is a genetic risk factor for both stroke and cardiovascular disease, further substantiating a possible role for *SLC44A2* in VTE pathogenesis (Hinds et al. 2016 *Hum Mol Genet*.) *SLC44A2* has not been described to associate with known haemostatic markers, thus interestingly, *SLC44A2* does not belong to conventional pathways for thrombosis, nor has it been associated with other cardiovascular diseases or related quantitative biomarkers.

The VTE lead SNP, *SLC44A2* rs2288904 (A or G), coincides with an amino acid substitution in the extracellular domain of the Solute Carrier 44 A2 protein (*SLC44A2* R154 or Q154, respectively) and is known to trigger antibody formation in carriers of the minor A allele, both during pregnancy and upon exposure to the major G allele variant. Upon transfusion, these antibodies induce neutrophil activation, sequestration, and finally, endothelial barrier damage which can result in possibly fatal transfusion related acute lung injury (TRALI). *SLC44A2* is expressed on neutrophils, which is the postulated target cell for the anti-*SLC44A2* antibodies in TRALI, although *SLC44A2* is also expressed on vascular endothelial cells. Our collaborators at Giessen University, Germany, demonstrated *in vivo* that the anti-*SLC44A2* antibodies induce loss of endothelial barrier integrity. In this model, neutrophils aggravated the destructive effects of anti-*SLC44A2*. Furthermore, they demonstrated *in vitro* that *SLC44A2* can act as a receptor for von Willebrand Factor (vWF), a factor expressed on the endothelium and a key molecule important for normal haemostasis. In addition, it has become evident that two isoforms of *SLC44A2* exist (i.e P1 and P2) with endothelial cells and neutrophils showing variable expression (P1 and P2 vs P1 only) possibly affecting *SLC44A2* functionality.

Initial work characterizing the *SLC44A2* global knockout mouse from a haemostasis perspective was performed in the laboratory of our collaborators at the University of Michigan in Ann Arbor, Michigan, USA. Preliminary testing found increased transcript levels of tissue plasminogen activator (tPA) in the lung of *SLC44A2* knock out mice indicating that these mice may have a better capacity for clearing blood clots. Furthermore, upon laser induced injury of the cremaster muscle, *SLC44A2* knockouts exhibited a reduction in fibrin formation, again suggesting that the mice have a faster clearance of clotting factors. These data point to a possible role for *SLC44A2* in the process of haemostasis, which has not been previously described, however, the mechanisms behind these observations remain unclear.

Also of particular interest is the recent identification of autoantibodies against *SLC44A2* in patients with autoimmune hearing loss (Kommareddi et al. 2009 *Laryngoscope*). The binding of these antibodies to *SLC44A2* expressing cells in the inner ear leads to a detrimental effect on hair cell survival and hearing, again demonstrating that anti-*SLC44A2* antibodies can have a disruptive effect on normal cellular

function. Several autoantibodies against haemostatic proteins such as prothrombin and thrombomodulin, in addition to antibodies targeting phospholipids, have been identified and linked to VTE, showing that autoantibodies can also contribute to the pathophysiology of VTE. We believe it is possible, as an alternative hypothesis, that a similar mechanism may also be occurring in the context of SLC44A2 and preliminary work by collaborators has even identified potential SLC44A2 autoantibodies in patients with VTE.

Altogether SLC44A2 appears to be relevant in both TRALI and VTE, two diseases where endothelial cells, neutrophils and their interactions are considered key to vascular pathophysiology. Importantly, antibodies can also play a destructive role in both of these conditions. Based on this knowledge, the current project proposal aims to further analyse the function of SLC44A2, including the interactions with autoantibodies, and unravel the mechanism underlying the association between SLC44A2 and VTE. We will focus in particular on the role of SLC44A2 in endothelial cells, neutrophils as well as with autoantibodies. We expect that the proposed project will provide novel therapeutic insight for the development of improved VTE treatments. Since all the current therapeutic strategies for VTE are directed at targeting coagulation factors and consequently have major bleeding as an unwanted side-effect and SLC44A2 has not been linked to traditional haemostasis, further understanding into its function may lead to the discovery of a unique treatment strategy without the adverse side effects of the current therapeutics.

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?

SLC44A2 has been identified as a new VTE-associated locus, one with a strongly significant association with the disease ($p=2.75 \times 10^{-15}$). However, at present, it is not understood how SLC44A2 and the allelic variation at amino acid 154 play a role in VTE pathophysiology. To further elucidate how SLC44A2 contributes to VTE pathogenesis, we formulated the following research questions: 1. What is the role of SLC44A2 during haemostasis? 2. How do autoantibodies targeting SLC44A2 affect haemostasis? 3. How does SLC44A2 contribute to VTE pathophysiology? 4. Do SLC44A2 targeting antibodies exacerbate the effects of VTE? 5. Are the contributions of SLC44A2 to VTE cell specific? Finding the answer to these questions will help us achieve our main objective which is to determine how SLC44A2 modulates the interactions between the blood and venous vessel wall, and thereby the initiation and/or propagation of venous thrombotic disease.

The current proposal is the result of a unique collaboration between the [REDACTED], [REDACTED], LUMC, The Netherlands and the [REDACTED], Giessen, Germany. Thus, expertise from both institutes will join at the pre-clinical and basic science level to clarify the function of SLC44A2 and the relevance of SLC44A2 and of SLC44A2 antibodies in VTE. Recently, mice with a conditional floxed *Slc44a2* allele (with loxP sites flanking *Slc44a2* exon 3-10) were generated by a research group at [REDACTED] at the University of Michigan in Ann Arbor, Michigan, USA. We have established a collaboration with this group, and in March 2016 we received embryos of these conditional *Slc44a2* mice that will be used for the present project. Cryorecovery of the embryos was performed in April 2016 and the first offspring carrying the conditional allele became available in Leiden as of May 2016. As all parties involved have extensive experience with the experimental disease models included in this proposal, the principles of replacement, reduction and refinement will be wholly implemented in an effort to prevent as many negative consequences for the involved animals as possible.

Upon completion of this project, we expect to have a coherent answer to all of the above mentioned research questions and thus a much better understanding of the role of SLC44A2 not only in normal haemostasis, but in the pathological condition of VTE as well. With this knowledge, we can then begin to translate our observations into those from a clinical perspective with an aim to design better therapeutics

with less detrimental side effects for patients and ultimately improve the quality of life for those living with the symptoms associated with VTE.

3.3 Relevance

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

SLC44A2 is a novel susceptibility gene for VTE, however, very little is known about the protein and thus, at this juncture, it does not belong to any conventional pathways for VTE or have a role in haemostasis pathways. Therefore, the proposed objectives create an opportunity to elucidate the function of SLC44A2 in the context of physiological and pathological haemostasis. In regards to the impact this may have on the field as a whole, these studies may discover previously unknown mechanisms involved in the pathogenesis of VTE as well as establish a unique biomarker for the disease. Moreover, these findings may further prove significant in the clinical setting as targeting SLC44A2 might provide a more effective treatment strategy in VTE, as it is not linked to traditional haemostasis and would reduce the chance of adverse side effects such as bleeding, which accompanies all of the current therapeutics available.

3.4 Research strategy

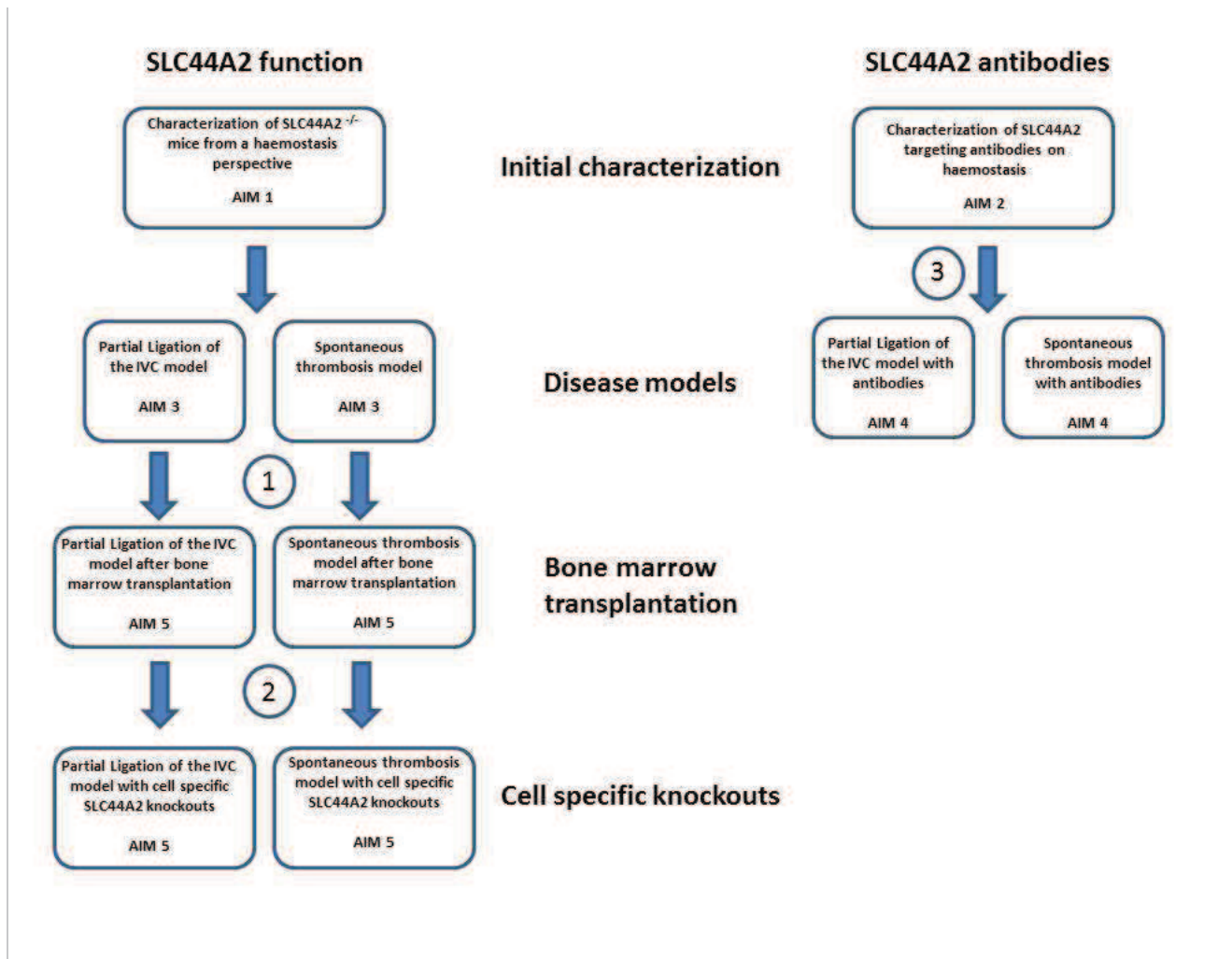
3.4.1 Provide an overview of the overall design of the project (strategy).

Haemostasis and subsequently VTE, are complex processes which involve various cell types and cell products from different biological systems including endothelial cells (circulatory), neutrophils (immune) and the production of coagulation factors by hepatocytes (digestive). There is also the added element of continuous blood flow, a physical factor that is difficult to replicate precisely *in vitro*, in addition to the possible changes in the immune profile. Therefore, it is only possible to truly define key interactions central to these processes using a model organism. In order to investigate the role of SLC44A2 in the pathogenesis of VTE we will make use of the recently generated *Slc44a2* exon 3-10 deficient knock out mice which allow for conditional deletions using the Cre-Lox recombination system. Our collaborator demonstrated that the *EIIa* Cre-mediated germ line inactivation of *Slc44a2* results in mice globally lacking *Slc44a2* (full knockouts) that appear viable and healthy with no spontaneous discomfort other than hearing loss upon a hearing challenge. This phenotype is only observed in the FVB genetic background and not the C57Black/6J background which we intend to use.

Using the mice in this manner we can then achieve the following aims:

1. Establish the role of SLC44A2 (if any) during traditional haemostasis
2. Determine if autoantibodies targeting SLC44A2 affect traditional haemostasis
3. Detect mechanisms which connect SLC44A2 to VTE pathophysiology
4. Test if SLC44A2 targeting antibodies exacerbate the effects of VTE
5. Dissect out the cell specific (i.e. endothelial cells or neutrophils) contributions of SLC44A2 to VTE

The following aims are summarized in the design overview below:



3.4.2 Provide a basic outline of the different components of the project and the type(s) of animal procedures that will be performed.

In order to determine the importance of SLC44A2 function during normal haemostasis we will begin by characterizing the global *Slc44a2* knockout mice from a haemostasis perspective, focusing on the organs that are central to this process such as blood, liver and immune cells (AIM 1). It is at this point we will also determine whether or not it is necessary to include both male and female mice in the subsequent studies, as the response is well described to be bi-distributional and therefore the two genders cannot be combined. As obvious differences may not be detected in these mice under normal homeostatic conditions, regardless of the findings from this characterization, upon completion, we will move forward to the disease models (AIM 3). In this respect, we will employ two different models of venous thrombosis (VT), namely the partial ligation model and the spontaneous induced thrombosis model. With these two systems, we will cover all relevant aspects which are crucial to the induction of VT and overcome the limitations that each model presents such as retrograde thrombus formation in the ligation model and the lack of influence by neutrophils in the spontaneous model. The results from AIM 3 will then determine our first go/no go moment (arrow 1). If the disease models point to a clear effect of SLC44A2 in VT pathophysiology, we will then proceed to first part of AIM 5, which is the use of bone marrow transplantation in order to identify the cellular compartment expressing SLC44A2 that is contributing to the induction of VT, i.e. the stromal or hematopoietic compartment. The outcomes from these studies will then comprise our second go/no go moment (arrow 2). If the loss of SLC44A2 in either the stromal or hematopoietic compartment does not elicit differences in the propagation of VT, then we will conclude that ubiquitous expression of SLC44A2 is important in VT pathogenesis and no further study will be needed. However, if the findings point to a certain compartment as being the main contributor in the disease, then we will continue to pinpoint the specific cell type that is central to this process. To achieve this final objective of AIM 5, we will generate either endothelial cell (stromal) or neutrophil (hematopoietic) specific SLC44A2 knockout mice and then induce disease using the models described in

AIM 3.

In parallel to the above studies, we will also explore the contributions of SLC44A2 targeting antibodies in haemostasis and possibly VT. In order to do this, we must first find a working concentration of SLC44A2 antibody that can be tolerated by the mice without being cleared from the blood within a 72 hour time frame, specifically the duration of the disease model. In addition to titrating the amount of antibody that is suitable for later models, we will also determine the effect that these molecules have on haemostasis. These are the two main goals of AIM 2. The outcome of these studies will then form a go/no go moment for this portion of the project (arrow 3). If we can find an amount of SLC44A2 antibody that circulates freely within in the mouse without causing an acute reaction, we will proceed to use disease models in combination with autoantibodies (AIM4). However, if the mice have a severe response to the antibodies (which we do not expect) or if the antibodies do not remain in circulation long enough, then we will conclude this half of the project.

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.

Altogether the different components of this project culminate to form an explanation as to how SLC44A2 contributes to VTE. The initial study proposed in aim 1 will determine if SLC44A2 is involved in traditional haemostasis pathways through characterization of the *Slc44a2* global knockout mouse from a haemostasis perspective. We will evaluate whether the loss of SLC44A2 has any effect on the production of coagulation factors and subsequently blood clotting, which is the source of clinically manifested events associated with VTE. **As the effects of the loss of SLC44A2 may not be evident under normal homeostatic conditions and only upon vascular injury, regardless of the outcome of this aim, we will proceed to the disease models described in aims 3-5** Additionally, in aim 2, we will also investigate the effect that SLC44A2 targeting antibodies have on haemostasis as these corresponding antibodies have already been implicated in vascular disease such as transfusion related acute lung injury (TRALI). Together these findings will form the first milestone of the project as such a detailed examination has yet to be described and is crucial before studying further aspects of SLC44A2 involvement in VTE. These results may also help us to hone our focus on certain mechanisms that may be amplified at later stages in the disease models included in aims 3-5. Moreover, the initial trials studying SLC44A2 targeting antibodies are of particular importance as these will establish the appropriate concentration of antibodies as well as administration schedule that will be used in aim 4. Upon completion of this initial characterization, we will move forward with aim 3 and determine the importance of SLC44A2 in the propagation of VTE using two independent disease models of thrombosis, namely the partial ligation and spontaneous model. It is vital to utilize both models of VTE as each has its disadvantages such as extensive surgical handling and retrograde thrombi formation in the ligation model and no role for neutrophils in the spontaneous model. Thus, using these systems in combination is essential and will ensure that we fully cover all aspects that are key to VTE pathophysiology. These data will then mark the second milestone of the project as it will become clear as to whether SLC44A2 is a central contributor in the induction of thrombosis. If mice lacking SLC44A2 are protected or exhibit a less severe thrombotic phenotype, we will conclude that this is directly linked to the loss of SLC44A2. However, if we do not observe such an effect, we will conclude that SLC44A2 does not play a role in VTE and will not proceed with experiments associated with aim 5. In addition, as detailed in aim 4, in order to distinguish the importance of SLC44A2 targeting antibodies in VTE pathogenesis we will include such antibodies, as defined by aim 2, in addition to the two thrombosis models and measure the additive effect that antibodies may have on vessel injury. The outcome from these studies will constitute another major milestone of the project as it would establish whether autoantibodies against SLC44A2 in particular can exacerbate the symptoms associated with VTE. This has yet to be described and may have strong implications for the clinical setting. Lastly, when the evidence from aim 3 supports further study of SLC44A2, we will continue to dissect out its importance by defining the cellular players that are contributing to disease induction, as described in aim 5. We will first utilize bone marrow isolated from WT and *Slc44a2* global knockout mice which is then transferred back to either WT or mice lacking *Slc44a* before the challenge of thrombosis. In this way we can begin to identify the cellular compartments (stromal or hematopoietic) that support the propagation of VTE as it relates to SLC44A2. Concurrently, we will also breed *Slc44a2* floxed mice with *Tie-2* Cre and *LysM* Cre in order to generate cell specific knockout mice, lacking SLC44A2 in either endothelial cells or neutrophils, respectively. Thrombosis will then be promoted in these mice and based on these results, we will be able to identify which of these cell types is driving the pathogenesis of VTE. This will be the final milestone of

the project as not only will we have determined the importance of SLC44A2 in VTE, but identified the principal cell types that are essential in SLC44A2 associated VTE pathogenesis.

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	Haemostasis characterization of <i>Slc44a2</i> knockout mice
2	Effect of SLC44A2 targeting antibodies on haemostasis
3	Venous thrombosis through partial ligation of the caval vein
4	Spontaneous venous thrombosis through RNAi
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Format

Niet-technische samenvatting

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

1 Algemene gegevens

1.1 Titel van het project	De Rol van de Erfelijke Factor 'Solute Carrier Transporter 44A2' (SLC44A2) in de Ontwikkeling van de Ziekte Veneuze Trombose
1.2 Looptijd van het project	5 jaar
1.3 Trefwoorden (maximaal 5)	SLC44A2; Veneuze Trombose

2 Categorie van het project

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

3 Projectbeschrijving

3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)	<p>Erfelijke factoren bepalen voor een belangrijk deel wie veneuze trombose (een ziekte waarbij bloedstolsels in de aderen kunnen ontstaan) krijgt en wie niet, maar de erfelijke achtergrond van de ziekte is nog lang niet helemaal duidelijk. Onlangs ontdekten we dat het gen SLC44A2 (Solute Carrier Transporter 44A2) een rol zou kunnen spelen en we willen nu onderzoeken of dat klopt en wat die rol is. Het gen is actief in de witte afweercellen in ons bloed en in de cellen die onze bloedvaten bekleden.</p> <p>Waar de andere bekende erfelijke factoren voor veneuze trombose ingrijpen op de cascade van reacties die tot</p>
---	---

bloedstolling leidt, lijkt SLC44A2 op een andere manier van invloed te zijn. Kennis over de rol van dit gen kan dan ook nieuwe inzichten geven in het ontstaan van veneuze trombose en leiden tot nieuwe behandelingen. Bestaande medicijnen remmen de stollingscascade en verhogen daarmee het risico op spontane bloedingen.

Veneuze trombose raakt het leven van miljoenen mensen over de hele wereld. De ziekte kan fatale gevolgen hebben, maar ook de kwaliteit van leven van patiënten verminderen, onder meer doordat zij langdurig, soms levenslang, medicijnen moeten gebruiken.

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

We hopen te ontrafelen hoe de nieuwe erfelijke factor bijdraagt aan de ontwikkeling van veneuze trombose, daardoor beter te begrijpen hoe de ziekte ontstaat en aanknopingspunten te vinden voor betere en veiliger behandelingsstrategieën.

Dit project heeft twee hoofdvragen:

1) Heeft SLC44A2 invloed op de normale functies van bloed en bloedvaatwand?

2) Wat is de rol van SLC44A2 in de ontwikkeling van veneuze trombose?

We zullen nagaan:

- of het ontbreken van SLC44A2 veranderingen in normale functies van bloed en de bloedvaatwand veroorzaakt;
- of andere factoren in bloed en de bloedvaatwand een interactie aangaan met SLC44A2;
- waarom en wanneer SLC44A2 belangrijk is in de ontwikkeling van veneuze trombose;
- in welke cellen SLC44A2 belangrijk is: de witte bloedcellen of cellen van de bloedvaatwand.

Onverwacht ontstond een goede mogelijkheid om dit onderzoek te doen: onlangs is in de Verenigde Staten een muis ontwikkeld waarin SLC44A2 ontbreekt, de zogenaamde SLC44A2 knock-out muis. Door deze muis te vergelijken met een normale muis kunnen we ontdekken of en hoe SLC44A2 betrokken is bij de ontwikkeling van veneuze trombose.

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

We zullen maximaal 3770 muizen gebruiken.

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

We zullen bij muizen veneuze trombose opwekken op twee manieren. Ten eerste vertragen we de bloedstroom in een bloedvat door een bloedvat tijdens een kleine operatie deels af te sluiten met een hechtdraad om dit vat; trombose treedt dan ter plekke op binnen twee dagen. Ten tweede injecteren we stoffen die productie van enkele stollingsfactoren remmen; ook

dan treedt trombose op binnen twee dagen. Om ongemak voor de muizen te voorkomen zullen we deze handelingen onder verdoving uitvoeren en pijnstilling geven.

Als zich trombose ontwikkelt zullen we de dieren doden, zodat we alle veranderingen die optreden in het lichaam kunnen onderzoeken. We volgen hierbij zeer strikte richtlijnen die beschrijven hoe euthanasie op de meest humane manier toegepast dient te worden.

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

Voor de eerste hoofdvraag verzamelen we bloed en weefsels. We verwachten een gering ongemak voor de dieren vanwege injecties met een narcosemiddel voordat we bloed afnemen en voordat we ze, aan het eind van de proef, doden voor onderzoek.

Voor de tweede hoofdvraag wekken we bovendien trombose op. Hiervan verwachten wij een matig ongemak voor de dieren. De handelingen omvatten een kleine operatie in de buik of injecties met remmers van stollingsfactoren. Na injecties kunnen als gevolg van de trombose die ontstaat zwellingen bij de kop optreden. We zijn bekend met, en voorbereid op, deze symptomen. Om pijn te voorkomen behandelen we de muizen met geschikte pijnstillers. Om het ongemak door de zwellingen zo klein mogelijk te houden zullen we het gemakkelijker voor ze maken om te eten en te drinken.

- 3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?

Na alle experimenten analyseren we weefsels, bloed en eventuele stolsels. Daartoe wordt op alle dieren euthanasie toegepast.

4 Drie V's

4.1 **Vervanging**

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

Veneuze trombose is een zeer complexe ziekte waarbij onder meer bloedplasma, bloedcellen, bloedsomloop, immuunsysteem en lever betrokken zijn. Het proces van bloedstolling is niet buiten het lichaam na te bootsen, dus experimenten met intacte dieren zijn onvermijdelijk.

4.2 **Vermindering**

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

Met statistische berekeningen hebben we bepaald hoeveel dieren nodig zijn om relevante effecten inderdaad te vinden als ze er zijn. Voor deze berekeningen hebben we gegevens gebruikt van andere onderzoekers uit recente internationale wetenschappelijke literatuur en eigen gegevens uit eerdere studies.

4.3 **Verfijning**

Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diermodel(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.

Muizen zijn vergelijkbaar met de mens qua genetica, bloed, bloedsomloop, immuunsysteem en orgaansystemen. Daarnaast zijn muizen beschikbaar waar SLC44A2 in ontbreekt. Voor ons onderzoek zijn muizen dus de meest geschikte proefdieren.

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

Een aantal muizen krijgt alleen een éénmalige onderhuidse injectie met narcosemiddel. Bloed wordt dan onder narcose afgenomen en hierna worden de muizen op humane wijze gedood voor analyse.

De experimenten waarbij we trombose opwekken kunnen tot ongerief leiden. Binnen de protocollen hebben we zorgvuldig momenten gezocht waar pijnstilling nodig is. Bovendien worden de muizen meerdere malen per dag gecontroleerd zodat we eventuele onverwachte veranderingen kunnen registreren en zo nodig direct ingrijpen, bijvoorbeeld met voortijdige euthanasie als al pijnstilling toegepast is.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen



Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 11600
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. [REDACTED]
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|--|
| 3.4.4.1 | Haemostasis characterization of <i>Slc44a2</i> knockout mice |
- Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

Blood and tissue samples from several organs central to the process of haemostasis will be collected from wild type and *Slc44a2* deficient animals, including 1) global knockout 2) cell specific knockout (endothelial or neutrophil) or 3) bone marrow transplanted animals which creates mice lacking SLC44A2 in either the stromal or hematopoietic compartment in addition to mice containing or lacking SLC44A2 in both compartments. This may include, but is not limited, to material such as blood, liver, lungs and venous tissue. Subsequently, these samples can be used to phenotype the *Slc44a2* knockout mouse (either global or cell/compartement specific) from a haemostasis perspective by measuring differences in the capacity of the blood to coagulate and related cells to produce coagulation factors, in addition to measuring changes in the immunological profile. In this way we can begin to answer how SLC44A2 affects both normal and pathological haemostasis. As it is difficult to isolate such material without causing injury to the animals, a total isolation of all tissues upon anesthetization, followed by euthanization, is the most humane procedure.

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

While under general anaesthesia, the abdomen of the mice will be opened and blood will be collected directly from the vena cava into a syringe containing sodium citrate so as to preserve the sample. Blood must be collected directly from the vein in order to avoid contamination with factors that activate coagulation (i.e. tissue factor) as it will be used for testing exactly that at a later time. The amount of blood retrieved will be the maximal amount possible, therefore following collection, the diaphragm of the

mouse will be punctured, euthanizing the mouse in a humane manner. At this point, several tissues will be collected and snap frozen. These can then be used to determine if *Slc44a2* mice exhibit any differences in haemostatic activity both at the mRNA and protein level.

For the mice undergoing bone marrow transplantation, donor mice will be euthanized using standard techniques and bone marrow cells isolated and prepared for injection into the recipient mice. Bone marrow transplant recipients will begin receiving acidified, antibiotic water one week prior to the irradiation procedure. At least six hours before receiving the transplantation, they will be sub lethally irradiated at a dose suitable for their background (C57BL/6 mice). Following radiation, mice will receive a tail vein injection of the donor mouse bone marrow cells and subsequently housed for 21 days until the repopulation of hematopoietic cells is complete.

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

Group size: For the calculation of determining how many animals are necessary per group to establish any meaningful differences, we use the parameter of thrombin generation as it has the largest standard deviation as compared to other readouts of haemostasis, such as gene expression by qPCR. After reviewing the most recent literature, we have determined that a reasonable mean for group 1, the wild type (WT) group in a C57BL/6 background, for endogenous thrombin potential (ETP) is approximately 220 nM*min and for group 2, a knockout mouse that is reasonably healthy as compared to its WT littermates, a value of 290 nM*min. We estimate the heterozygous mice to fall somewhere in between and therefore we use the mean value of 255 nM*min and an average standard deviation of 45. Because the readout will be comparing three groups, we will use a one way ANOVA test which will control for the type I error. Using the G*Power statistical software (<http://www.gpower.hhu.de/>) program to perform a POWER calculation with an alpha of 0.05 and a power of 0.80, we find the effect size f to be 0.63505 which would require a sample size of 30, signifying 10 animals per group.

Sex consideration: As it is unknown whether sex will influence the effect of the *SLC44A2* gene and its role in haemostasis, we will include both for this initial characterization study. If no significant differences are presented between genders, then we will continue only with females for the remainder of the project as there is generally less biological variation such as size/weight between age matched mice. Our rationale for starting with both sexes is due to the well described findings that hormones can play a role in haemostasis (i.e. contraception & thrombotic events), but because no differences in gender were described in the initial GWAS study linking *SLC44A2* to venous thrombosis, we do not expect sex to play a role. However, until we can rule this out we find it prudent to include both groups. In addition, as several studies report sex differences in biological response to murine models of VT (Alvarado et al Thromb Res 2011; Vanlangenvelde et al Comp Med 2005), we cannot justifiably group males and females together, as such bi-distributional readouts may obscure true differences which may be due to the gene alone.

B. The animals

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

The animals used in these studies are *Mus musculus*, from a C57BL/6J background, containing either a deleted region (exon 3-10) of the *Slc44a2* gene (KO) or a wild type (WT) allele. They originate from the lab of [REDACTED] at the University of Michigan but have been bred at the LUMC for many generations. In addition, final studies may also employ mice lacking the *Slc44a2* gene only in specific cell types. These will be generated in two distinct ways. First, we will use bone marrow transplants from WT or *Slc44a2* deficient mice to either WT or *Slc44a2* KO mice to create mice lacking SLC44A2 expression in either the stromal or hematopoietic compartments. Alternatively, we will also cross breed *Slc44a2* floxed mice, containing loxP sites on either side of exons 3-10, with mice expressing Cre-recombinase under the control of either the *Tie-2* or *LysM* promoter, resulting in mice lacking SLC44A2 in endothelial cells or neutrophils, respectively. To control for genetic variation as much as possible, we will make use of matched litter mates, using WT, HET and KO siblings, generated from parents who are heterozygous for the KO allele. The mice will be included between ages of 8-14 weeks, which is the same age that will be used in the experimental disease models described in appendices 3.4.4.3-4. We estimate that the characterization of these knockout animals from a haemostatic perspective will involve approximately 180-290 animals, based on the calculations below:

General characterization of global knockout animals:

3 genotypes (KO, HET, WT) x 10 (group size) x 2 sex (males and females) = approximately 60 animals

General characterization of cell specific knockout animals:

3 genotypes (KO, HET, WT) x 10 (group size) x 1 sex (female) = approximately 30 animals

If sex differences are found in the general characterization of global knockouts then we will also use approximately 30 males.

Training and set up of bone marrow transplantation procedure:

5 WT and 5 KO animals

General characterization of bone marrow transplant animals:

4 systems (WT, WT hemo/KO stromal, KO hemo/WT stromal, KO) x 2 transfer (donor, recipient) x 10 (group size) x 1 sex (female) = approximately 80 animals

If sex differences are found in the general characterization of global knockouts then we will also use approximately 80 males.

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:

Due to the complex nature of haemostasis, which involves several different biological systems including the circulatory, immune and digestive system, in addition to the physical interaction between flowing blood and the vessel wall, it cannot be accurately replicated *in vitro*. Thus an *in vivo* system, which includes interactions between all such factors, is essential in studying this process. In addition, the ability to target deletion in cellular compartments through bone marrow transplantation and cell specific knockout animals and continue to study the interaction between the different biological systems is a very unique tool that cannot be readily reproduced. However, once we have conducted the studies contained in this proposal, it is likely that we will be able to pinpoint the cellular players and signalling pathways that are central to this process, specifically in relation to SLC44A2, and we can then follow up using *in vitro* models with human tissues to confirm and therefore strengthen our conclusions.

Reduction:

In order to reduce the number of animals necessary, we have taken several steps and carefully considered all options. First, we are making use of littermates so as to reduce the chance of genetic variability. Second, we will also save most organs and materials from the mice and not only the tissues that are classically involved in haemostasis. In this way, if the data points to a novel finding and further analysis is needed in secondary organs, we will already have them and the need to include more animals may not be necessary. Lastly, based on power calculations and experience with these types of procedures, we have determined the optimal amount of animals to include in these studies so that a significant difference between experimental conditions can be found (if one exists) and no repetition likely will be needed. We have also contemplated whether another experimental design can be used in order to minimize the requested numbers or the overall distress to the animals. However, as this is a characterization of the novel genetic *Slc44a2* mouse line from a haemostasis perspective, it is not

possible if we do not collect blood and organs related to haemostasis.

Refinement:

Several practices are put in place in order to minimize any pain or discomfort for the animals during the proposed studies. Anaesthesia will be administered prior to the collection of materials, such that no pain will be felt during these procedures and for mice receiving bone marrow transplantation, anaesthesia will be administered prior to the irradiation of recipient mice. These studies will also be conducted by trained researchers with experience performing these specific techniques. We will closely monitor the reactions of the animals at all times and if we observe any discomfort associated with humane endpoints such as changes in behaviour (posture, grooming, activity) or pathophysical reactions (rapid breath, unusual heart rate, weight loss) we will end the experiment immediately. In addition, as the irradiation may weaken the animals, we will provide special housing conditions including longer nipples on the water bottles, which will contain antibiotics, as well as soft food to ease accessibility for eating and drinking.

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

The measures taken to minimize animal suffering, pain and fear in regards to the proposed studies include pre-treatment of the animals with the appropriate anaesthesia before irradiation or the collecting any blood or tissues to be used in the characterization of these knockout animals. There are no adverse effects on the environment resulting from these studies.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

Not applicable.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

All experimental animals will be anaesthetised prior to the collection of blood or tissues which will subsequently be used in the characterization of the global *Slc44a2* knockout mice. In regards to the characterization of animals after bone marrow transplantation, animals will be anaesthetised prior to the irradiation procedure and the collection of blood or tissues which will subsequently be used for characterization of the mice. These procedures are deemed optimal based on experience with such techniques within the department.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

A possible adverse effect that may result from this procedure is the sensation of pain and fear if the administration of the anaesthesia is somehow faulty before the start of the procedure. However, such an event would be very difficult to mistake, as symptoms of an effective administration are readily visible. Since these procedures will be performed by skilled researchers, with years of experience with mouse models, we do not expect that such a mistake would go unobserved and all mice will be determined to be thoroughly sedated before the onset of any technique. Adverse effects that may arise due to the bone marrow transplant procedure are either graft versus host disease or alternatively, host versus graft disease in which T-cells become reactive and attack the tissues of the host or graft, respectively. In addition, the effects of irradiation may also result in anaemia, immunosuppression, diarrhea and damage to the mucosal membranes.

Explain why these effects may emerge.

Such an effect may occur if the compounds that make up the anaesthetic regimen were improperly administered. In regards to adverse effects associated with bone marrow transplantation, this occurs when the MHC molecules are different between the host and donor mice.

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

In order to prevent incomplete anaesthetization of mice before the start of procedure, we will have experienced handlers present who can identify when the mouse is safely ready for blood collection. In order to minimize the chance of rejection of transplantation, we are using litter mates both as donor and recipient in mice that are backcrossed to C57BL/6 background for at least 6 generations. We expect the genetic variability to be very limited between such animals which will reduce the chance of mismatched MHC expression on the tissues. Animals will also be placed in special housing conditions (see section D, refinement) 3 weeks post irradiation in preparation for the adverse effects associated with the procedure.

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.

Criteria for humane endpoints during this part of the study include rapid breathing during the laparotomy of the mouse which may indicate an abnormal response to the anaesthesia. If this occurs, we will not proceed with puncture of the vena cava and euthanize the mouse immediately as opposed to after blood collection. Criteria for humane endpoints for bone marrow transplantation include behavioural changes in posture, grooming or activity levels in addition to pathophysical reactions such as rapid breathing, weight loss greater than 15% or HBV activation following radiation.

Indicate the likely incidence.

We estimate a very low incidence (<5%) for general characterization and approximately 10% for bone marrow transplantations.

K. Classification of severity of procedures

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are

assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe').

The procedures for the general characterization of the knockout animals fall under the category of "non-recovery" as the animals will be euthanized after the procedure, which is performed entirely under general anaesthesia. With respect to bone marrow transplantation, donor animals fall under the category of "non-recovery." Recipient animals may experience mild (90%) to moderate (10%) discomfort. Therefore, the mice will be given the appropriate anaesthesia and analgesia to minimize this as much as possible.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

Animals are killed and used amongst others for full pathological 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



Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 11600
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. [REDACTED]
- | 1.3 List the serial number and type of animal procedure. | Serial number | Type of animal procedure |
|--|---------------|---|
| | 3.4.4.2 | Effect of SLC44A2 antibodies on haemostasis |

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.

Blood and tissue samples from several organs central to the process of haemostasis will be collected from animals injected with SLC44A2 targeting antibodies, originally isolated from human donors. This may include, but is not limited, to material such as blood, liver, lungs and venous tissue. Subsequently, these samples can be used to determine the effect that SLC44A2 antibodies have on haemostasis. Additionally, these studies will help to determine the appropriate amount of antibodies needed to study their contributions to venous thrombosis, as described in appendices 3.4.4.3-4. Using such procedures we will be able to measure differences in the capacity of the blood to coagulate and related cells to produce coagulation factors, in addition to measuring changes in the immunological profile. In this way we can begin to answer how SLC44A2 targeting antibodies affect both normal and pathological haemostasis.

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

Mice will receive an infusion of varying concentrations of anti-SLC44A2 antibodies purified from human serum, in volumes set forth by the directive Diehl et al 2001, to determine a sufficient amount which allows for the presence of antibodies 72 hours post administration, without causing an acute response in the mouse. In order to minimize unwanted side effects, we start with the lowest concentration first and then raise it incrementally until the antibodies can be detected back after 72 hours. We will also compare the efficacy of using two time points versus one, namely at either 72 hours or both 72 and 24 hours before collection for tissue analysis. The goal of this study is twofold: 1) to determine the effect of anti-SLC44A2 antibodies on haemostasis as well as 2) determine the amounts of antibody necessary to

have adequate coverage present at the time of thrombosis induction (appendices 3.4.4.3-4). We base these time points and the initial amounts that will be injected on established studies of a similar nature used to study the role of anti-phospholipid antibodies in venous thrombosis (Pierangeli et al. Thromb. Haemost. 1995).

Following 72 hours of the initial administration, the mice will receive general anaesthesia and the abdomen will be opened and blood will be collected directly from the vena cava into a syringe containing sodium citrate so as to preserve the sample. Blood must be collected directly from the vein in order to avoid contamination with factors that activate coagulation (i.e. tissue factor) as it will be used for testing exactly that at a later time. The amount of blood retrieved will be the maximal amount possible, therefore following collection, the diaphragm of the mouse will be punctured, euthanizing the mouse in a humane manner. After this point, several tissues will be collected and snap frozen. These can then be used to determine if mice exhibit any differences in haemostatic activity both at the mRNA and protein level.

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

Group size: To determine the number of animals necessary per group we based our POWER calculation on previous work carried out to characterize mice treated with autoantibodies in the context of venous thrombosis. To this end, we use the recorded values for tissue factor (TF) activity in which mice treated with a control IgG antibody had a mean value of TF activity of 149.0 pM/mg/ml and mice treated with an autoantibody a mean value of 402.5 pM/mg/ml with a SD of 165.2. Using POWER calculation (<http://biomath.info/power/ttest.htm>) with an alpha of 0.05 and a power 0.80 we determined the appropriate group size to be 8.

Sex consideration: As it is unknown whether sex will influence the effect of the *SLC44A2* targeting antibodies and their role in haemostasis, we will include both for this initial characterization study. If no significant differences are presented between genders then we will continue only with females for the remainder of the project involving antibodies as there is generally less biological variation such as size/weight between age matched mice. Our rationale for starting with both sexes is due to the well described findings that hormones can play a role in haemostasis (i.e. contraception & thrombotic events), but because no differences in gender were described in the initial GWAS study linking *SLC44A2* to venous thrombosis, we do not expect sex to play a role. However, until we can rule this out we find it prudent to include both groups. In addition, as several studies report sex differences in biological response to murine models of VT (Alvarado et al Thromb Res 2011; Vanlangenvelde et al Comp Med 2005), we cannot justifiably group males and females together, as such bi-distributional readouts may obscure true differences which may be due to the antibodies alone.

B. The animals

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

The animals used in these studies are *Mus musculus*, from a C57BL/6J background, containing either a deleted region (exon 3-10) of the *Slc44a2* gene on both alleles (KO), one allele (HET) or both wild type alleles (WT). They originate from the lab of ██████████ at the University of Michigan but have been bred at the LUMC for many generations. To control for genetic variation as much as possible, we will make use of matched litter mates, using both WT, HET and KO siblings, generated from parents who are heterozygous for the KO allele. The mice will be included between ages of 8-14 weeks, which is the same age that will be used in the experimental disease models described in appendices 3.4.4.3-4. We estimate that the characterization of these knockout animals from a haemostatic perspective will involve approximately 64-384 animals, based on the calculation below:

Antibody titration:

1 genotypes (WT, ~~HET~~, ~~KO~~) x 8 (group size) x 1 sex (female) x 2 injection timepoints (72, 72 & 24hr) x 4 concentrations = 64

If we can find a working dosage, then we will continue with multiple genotypes for characterization:

3 genotypes (WT, HET, KO) x 8 (group size) x 2 sex (male,female) x 2 injection timepoints (72, 72 & 24hr) x 4 concentrations = 384

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:

Due to the complex nature of haemostasis, which involves several different biological systems including the circulatory, immune and digestive system, as well as the physical interaction between flowing blood and the vessel wall, it cannot be accurately replicated *in vitro*. In addition, it is still unclear which cell type can be targeted by these SLC44A2 antibodies. Thus an *in vivo* system, which includes interactions between all such factors, is essential in studying this process. However, once we have conducted the studies contained in this proposal, it is likely that we will be able to pinpoint the cellular players and signalling pathways that are central to this process, specifically in relation to SLC44A2 antibodies, and we can then follow up using *in vitro* models with human tissues to confirm and therefore strengthen our conclusions.

Reduction:

In order to reduce the number of animals necessary, we have taken several steps and carefully considered all options. First, we are making use of a pilot study to determine the proper dosing of antibodies before going further in using mice with variable genotypes. Second, we will also save most organs and materials from the mice and not only the tissues that are classically involved in haemostasis. In this way, if the data points to a novel finding and further analysis is needed in secondary organs, we will already have them and the need to include more animals may not be necessary. Lastly, based on power calculations, we have determined the optimal amount of animals to include in these studies so that a significant difference between experimental conditions can be found (if one exists) and no repetition likely will be needed. We have also contemplated whether another experimental design can be used in order to minimize the requested numbers or the overall distress to the animals. However, the models available to study the effect of antibodies in haemostasis and thrombosis are few, and thus we have chosen the most established system in order to cover the aspects that may be involved in these processes.

Refinement:

Several practices are put in place in order to minimize any pain or discomfort for the animals during the proposed studies. To start, we will begin by testing the lower concentrations of antibodies first in order to minimize the possible discomfort. We will also follow the guidelines in regards to injections set forth by Diehl et al 2001. Anaesthesia will also be administered prior to the final collection of tissues, such so that no pain will be felt during these procedures. These studies will also be conducted by trained researchers with experience performing these specific techniques. As there may be some adverse reactions to these treatments, we will closely monitor the response of the animals at several time points and if we observe any discomfort associated with humane endpoints such as changes in behaviour (posture, grooming, activity) or pathophysical reactions (rapid breath, unusual heart rate, weight loss) we will end the experiment immediately.

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

The measures taken to minimize animal suffering, pain and fear in regards to the proposed studies include pre-treatment of the animals with the appropriate anaesthesia before collecting any blood or tissues to be used in the characterization of these animals. There are no adverse effects on the

environment resulting from these studies.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

Not applicable.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

All experimental animals will be anaesthetised prior to the collection of blood or tissues which will subsequently be used for characterization of the mice. The procedures are deemed optimal based on several publications in which a similar approach was used in addition to in house experience with these techniques .

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

There is a chance that the animals may respond negatively to the infusion of SLC44A2 targeting antibodies by having an acute immune response, for example, the activation of neutrophils which may cause vascular damage.

Explain why these effects may emerge.

These effects may emerge if SLC44A2 targeting antibodies have a strong pathological influence on the general haemostasis of mice (unknown).

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

We will start by using the lowest doses of antibody until a sufficient amount in the blood is reached and maintained for 72 hours. We will observe the animals every 2 hours over the first 12 hours and then every 12 hours until 72 hours post injection in order to detect any acute response to the antibodies that results in a distressful effect to the mice (humane endpoints), at which point, we will end the experiments immediately, as this is not the goal of this study. In an effort to avoid any unwanted discomfort for the animals, we will be using titers that have been established in literature and have not been reported to cause severe distress to mice.

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

X Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

Criteria for humane endpoints during this part of the study include behavioural changes in posture, grooming or activity levels in addition to pathophysiological reactions such as rapid breathing or weight loss greater than 15% as determined by weighing the mice before the start of the experiment and following up at 24 and 48 hours post injection.

Indicate the likely incidence.

We estimate a very low 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').

Depending on the response of the animals to SLC44A2 antibodies, levels of discomfort may vary, however we estimate the severity to range from mild (90%) to moderate (10%). Because we cannot say for sure, we will monitor the animals closely every 2 hours over the first 12 hours and then every 12 hours until 72 hours post injection to ensure the minimal amount of distress as determined by the humane endpoints described above.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

Animals are killed and used amongst others for full pathological 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



Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 11600
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. [REDACTED]
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|--|
| 3.4.4.3 | Venous thrombosis through partial ligation of the caval vein |
- 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.

Mice lacking SLC44A2 expression, either whole body, in certain cellular compartments (through bone marrow transplantation), cell type specific (endothelial cells or neutrophils) or in mice that have been transfused with SLC44A2 targeting antibodies, will undergo a partial ligation procedure in order to mimic the process of venous thrombosis (VT) *in vivo* and to dissect out the cell types and signalling pathways which link SLC44A2 to disease pathogenesis. Blood and tissue samples from several organs central to the process of VT will be collected at different time points in order to record changes during key stages of disease progression. This may include, but is not limited to, material such as blood, liver, lungs, thrombus and venous tissue. Subsequently, these samples can be used to determine the contributions of SLC44A2 to VT. Using such procedures we will be able to measure differences in the capacity of the blood to coagulate and related cells to produce coagulation factors, changes in the immunological profile as well as characterize changes in thrombus formation/clearance and fibrin deposition.

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

Following anaesthetization of the mice and the administration of analgesia, a midline laparotomy will be made and the small bowel exteriorized and placed to the left of the animal. The inferior vena cava (IVC or caval vein) is then exposed by careful blunt dissection while sterile saline is applied at regular intervals to the exteriorized bowel to prevent its desiccation. Non-reactive prolene suture is looped around the IVC immediately caudal to the origin of the renal veins, with a space holder included on the outside of the vessel. Next the ligature is closed and the space holder is removed to avoid complete vessel occlusion.

Side branches will not be ligated or manipulated and IVC blood flow will be reduced immediately after the restriction. Lastly, the median laparotomy is sutured and the mice will be placed on a warming mat until anaesthesia wears off. Mice will additionally receive peri-operative analgesia until collection at at the 12, 24, 36 and 48hr designated time points . For the collection of blood and tissues, mice will receive a lethal dose of anaesthesia and subsequently several tissues will be collected, including the vena cava with the newly formed thrombus, and snap frozen. These can then be used to detect differences in expression levels of both mRNA and protein, as well as histological analysis of thrombus formation and fibrin deposition. The mice receiving anti-SLC44A2 antibodies will undergo all procedures described above in addition to receiving an infusion of antibodies prior to the surgery (appendix 3.4.4.2).

For the studies involving bone marrow transplantation, donor mice will be euthanized using standard techniques and bone marrow cells isolated and prepared for injection into the recipient mice. Bone marrow transplant recipients will begin receiving acidified, antibiotic water one week prior to the irradiation procedure. At least six hours before receiving the transplantation, they will be sub lethally irradiated at a dose suitable for their background (C57BL/6 mice). Following radiation, mice will receive a tail vein injection of the donor mouse bone marrow cells and subsequently housed for 21 days until the repopulation of hematopoietic cells is complete. At this point, the mice will then be ready to include in the ligation model described above.

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

Group size: The calculation of the experimental group size is based on the parameter 'thrombosis formation' (and not mRNA analysis) as this is the primary outcome and the parameter with the largest standard deviation. Previously, at 24 hours post thrombosis induction, we observed effects on thrombus size and weight ranging from 75% decrease up to 200% increase in size/weight as compared to control reference groups. Using these observations we can estimate that the control group has an average thrombi weight of 1g and a second group representing the knockout mice would have less thrombi, around .25g and a third group may have increased thrombi, up to double the weight of group 1, being 2g. As the readout will be comparing three groups, we will use a one way ANOVA test which will control for the type I error. Using the G*Power statistical software (<http://www.gpower.hhu.de/>) program to perform a POWER calculation with an alpha of 0.05 and a power of 0.80, we find the effect size f to be 0.55143 which would require a sample size of 36, signifying 12 animals per group. Because we want to rule out endothelial injury as a trigger for venous thrombosis, mice with bleedings or any injury of the IVC during surgery need to be excluded from further analysis. We therefore include an extra of 2 animals per group to compensate for animals displaying bleedings or any injury during the IVC during surgery. These 2 extra animals will only be included when necessary. For now we will use a maximum of 14 animals per experimental group.

Sex consideration: Unless we determine a clear link between the *Slc44a2* gene and sex in the initial characterization described in appendices 3.4.4.1-2, we will only use females for the following procedures. We opt for female over male since there is less biological variability in measures such as size and weight. Female mice can also be housed together even though they are not littermates (males cannot) which also helps to minimize any differences that may arise due to housing conditions. In addition, as several studies report sex differences in biological response to murine models of VT (Alvarado et al Thromb Res 2011; Vanlangenvelde et al Comp Med 2005), we cannot justifiably group males and females together, as such bi-distributional readouts may obscure true differences which may be due to the gene or antibodies alone.

B. The animals

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

The initial studies will include *Mus musculus* from a C57BL/6J background, containing either a deleted region (exon 3-10) of the *Slc44a2* gene on both alleles (KO), one allele (HET) or both wild type alleles (WT), globally in all tissues of the animal. They originate from the lab of ██████████ at the University of Michigan but have been bred at the LUMC for many generations. In addition, the final studies will employ mice lacking the *Slc44a2* gene only in specific cell types. They will be generated by cross breeding *Slc44a2* floxed mice, containing loxP sites on either side of exons 3-10, with mice expressing Cre-recombinase under the control of either the *Tie-2* or *LysM* promoter, resulting in mice lacking SLC44A2 in endothelial cells or neutrophils, respectively. To control for genetic variation as much as

possible, we will make use of matched litter mate siblings, generated from parents who are heterozygous for the KO allele. The mice will be included between ages of 8-14 weeks. We estimate that the maximal number of animals needed to complete all aspects of the studies included in this proposal regarding IVC ligation to be approximately 1008. If the response of mice in appendices 3.4.4.1-2 is determined to be dependent on sex (unlikely), then we will also include 1008 males.

Training and set up of procedure:
10 WT animals

IVC ligation-induced thrombosis with global knockout animals:
3 genotypes (WT, HET, KO) x 14 group size x 1 sex (female) x 4 timepoints (12, 24, 36, 48hr) = 168 animals

IVC ligation-induced thrombosis with anti-SLC44A2 antibodies:
3 genotypes (WT, HET, KO) x 14 group size x 1 sex (female) x 4 timepoints (12, 24, 36, 48hr) = 168 animals

IVC ligation-induced thrombosis with cell specific knockout animals:
2 genotypes (WT or KO) x 2 cell type (endothelial or neutrophil) x 14 group size x 1 sex (female) x 4 timepoints (12, 24, 36, 48hr) = 224 animals

IVC ligation-induced thrombosis with bone marrow transplantation :
4 systems (WT, WT hemo/KO stromal, KO hemo/WT stromal, KO) x 2 (donor, recipient) x 14 group size x 1 sex (female) x 4 timepoints (12, 24, 36, 48hr) = 448 animals

In the case that we receive a request from reviewers to repeat the IVC ligation procedure with a minor addition such as a therapeutic compound, neutralizing antibody or additional stimuli etc., we estimate that we would need approximately 168 additional animals, based on the calculations above. These animals will be used only if specifically requested by an editor/reviewer in order to increase the chances of a successful publication which would ensure the dissemination of these data within the scientific community.

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: Due to the complex nature of VT, which involves several different biological systems including the circulatory, immune and digestive system, as well as the physical interaction between flowing blood and the vessel wall, it cannot be accurately replicated *in vitro*. Thus an *in vivo* system, which includes interactions between all such factors shortly after the induction of injury and thrombi formation, is essential in studying this process. In addition, the ability to isolate the actual thrombi for analysis will provide critical clues as to the mechanism driving pathogenesis. However, once we have conducted the studies contained in this proposal, it is likely that we will be able to pinpoint the cellular players and signalling pathways that are central to this process, specifically in relation to SLC44A2, and we can then follow up using *in vitro* models with human tissues to confirm and therefore strengthen our conclusions.

Reduction:

In order to reduce the number of animals necessary, we have taken several steps and carefully considered all options. First, we are making use of littermates so as to reduce the chance of genetic variability. Second, we will save most organs and materials from the mice and not only the tissues that are classically involved in haemostasis. In this way, if the data points to a novel finding and further analysis is needed in secondary organs, we will already have them and the need to include more animals may not be necessary. Lastly, based on power calculations and experience with these types of procedures, we have determined the optimal amount of animals to include in these studies so that a significant difference between experimental conditions can be found (if one exists) and no repetition will likely be needed. Additionally, we plan to only use females so as to reduce the number of mice included. We have also contemplated as to whether another experimental design can be used in order to minimize the requested numbers or the overall distress to the animals. However, the model proposed in this study is one of the best available in the field to study venous thrombosis and when combined with the secondary model of spontaneous induced thrombosis (appendix 3.4.4.4), we believe it will cover all aspects that may be key in VT pathogenesis.

Refinement:

Several practices are put in place in order to minimize any pain or discomfort for the animals during the proposed studies. Anaesthesia will be administered prior to the surgery as well as before the final collection of tissues, so that no pain will be felt during these procedures and for mice receiving bone marrow transplantation, anaesthesia will be administered prior to the irradiation of recipient mice. In addition, to minimize any post-operative discomfort, analgesia will also be given peri-operatively and up until the time of collection. These studies will also be conducted by trained researchers with experience performing these specific techniques. As there may be complications related to the surgery, we will closely monitor the response of the animals at several time points and if we observe any discomfort associated with humane endpoints such as changes in behaviour (posture, grooming, activity) or pathophysiological reactions (rapid breath, unusual heart rate, weight loss) we will end the experiment immediately. In addition, as the irradiation may weaken the animals, we will provide special housing conditions including longer nipples on the water bottles, which will contain antibiotics, as well as soft food to ease accessibility for eating and drinking.

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

The measures taken to minimize animal suffering, pain and fear in regards to the proposed studies include pre-treatment of the animals with the appropriate anaesthesia before surgery or collection of tissues in addition to peri-operative treatment with analgesia. There are no adverse effects on the environment resulting from these studies.

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

X 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.

All experimental animals will be anaesthetised prior to surgery, irradiation or the collection of blood or tissues which will subsequently be used for characterization of the mice. In addition, mice will receive analgesia peri-operatively up until the time of sacrifice. The procedures are deemed optimal based on in house experience with these techniques.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Possible adverse effects that may occur during these procedures include bleeding during the IVC surgery or infections after the surgery. Adverse effects that may arise due to the bone marrow transplant procedure are either graft versus host disease or alternatively, host versus graft disease in which T-cells become reactive and attack the tissues of the host or graft, respectively. In addition, the effects of irradiation may also result in anaemia, immunosuppression, diarrhea and damage to the mucosal membranes.

Explain why these effects may emerge.

These effects may emerge if there is an accidental puncture of vasculature tissue or the surgical environment is not completely aseptic. In regards to adverse effects associated with bone marrow transplantation, this occurs when the MHC molecules are different between the host and donor mice.

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

In order to minimize surgical errors during, we have included a number of animals in order to refine our techniques before the final studies begin. To minimize the chance of infection, we plan to follow established protocols to ensure the surgery is aseptic as possible. In order to minimize the chance of rejection of transplantation, we are using litter mates both as donor and recipient in mice that are backcrossed to C57BL/6 background several generations. We expect the genetic variability to be very limited between such animals which will reduce the chance of mismatched MHC expression on the tissues. Animals will also be placed in special housing conditions (see section D, refinement) 3 weeks post irradiation in preparation for the adverse effects associated with the procedure.

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.

Criteria for humane endpoints during this part of the study include behavioural changes in posture, grooming or activity levels in addition to pathophysical reactions such as rapid breathing, weight loss greater than 15% or HBV activation following radiation.

Indicate the likely incidence.

We estimate the incidence to be approximately 15% for IVC ligation alone and approximately 10% for bone marrow transplantations.

K. Classification of severity of procedures

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

The levels of discomfort are moderate due to the inclusion of a surgery which involves suturing the abdomen of the mice. In addition, the possibility for a thrombosis formation may also cause discomfort, especially if there is a rapid onset, and is considered to cause moderate discomfort. With respect to bone marrow transplantation, donor animals fall under the category of "non-recovery." Recipient animals will undergo surgery and will therefore experience moderate discomfort. The mice will be given the appropriate anaesthesia and analgesia to minimize this as much as possible.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

Animals are killed and used amongst others for full pathological 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



Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 11600
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. [REDACTED]
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|---|
| 3.4.4.4 | Spontaneous venous thrombosis through siRNA |

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.

Mice lacking SLC44A2 expression, either whole body, in certain cellular compartments (through bone marrow transplantation) or cell type specific (endothelial cells or neutrophils), in addition to mice that have been transfused with SLC44A2 targeting antibodies, will receive an injection of siRNA targeting pro-coagulation proteins (antithrombin and protein C), which will induce formation of spontaneous venous thrombosis (VT). This will help to further determine the role of SLC44A2 in the pathogenesis of VT and overcome the limitations of the partial ligation model (appendix 3.4.4.3), namely the retrograde formation of thrombi and overestimation of the involvement of the immune system, as it is a major surgery. Blood and tissue samples from several organs central to the process of VT will be collected at different time points in order to record changes during key stages of disease progression. This may include, but is not limited to, material such as blood, liver, lungs, thrombus and venous tissue. Subsequently, these samples can be used to determine the contributions of SLC44A2 to VT. Using such procedures we will be able to measure differences in the capacity of the blood to coagulate and related cells to produce coagulation factors, changes in the immunological profile as well as characterize changes in thrombus formation/clearance and fibrin deposition in the liver.

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

The mice will receive an injection of solution containing siRNA lipidoids (based on the volumes set forth by the directive Diehl et al 2001) into the tail vein. After 36 hours, the mice will begin to receive analgesia and will be monitored regularly for signs of discomfort up until the time of sacrifice. Collection of the mice will occur at 24, 48 and 72 hours post injection. These time points are chosen in order to

observe the stages of VT propagation such as onset/initiation and progression. At these stages, mice are anesthetized and a midline laparotomy will be made. For the collection of blood, it will be taken directly from the vena cava into a syringe containing sodium citrate so as to preserve the sample. Blood must be collected directly from the vein in order to avoid contamination with factors that activate coagulation (i.e. tissue factor) as it will be used for testing exactly that at a later time. The amount of blood retrieved will be the maximal amount possible, therefore following collection, the diaphragm of the mouse will be punctured, euthanizing the mouse in a humane manner. After this point, several tissues will be collected and snap frozen, including the head which will contain the newly formed thrombus. These can then be used to detect differences both at the mRNA and protein level in addition to histological analysis which can be used to characterize changes in the thrombi as well as fibrin deposition. For the studies that involve antibody treatment, the mice will undergo the relevant procedures (detailed in appendices 3.4.4.2 or 3.4.4.5) prior to the injection of siRNA.

For the studies involving bone marrow transplantation, donor mice will be euthanized using standard techniques and bone marrow cells isolated and prepared for injection into the recipient mice. Bone marrow transplant recipients will begin receiving acidified, antibiotic water one week prior to the irradiation procedure. At least six hours before receiving the transplantation, they will be sub lethally irradiated at a dose suitable for their background (C57BL/6 mice). Following radiation, mice will receive a tail vein injection of the donor mouse bone marrow cells and subsequently housed for 21 days until the repopulation of hematopoietic cells is complete. At this point, the mice will then be ready to include in the spontaneous siRNA model described above.

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

Group size: For the calculation of experimental group size we will use the parameter 'development of clinical phenotype' (and not a parameters like liver fibrin deposition), as this is the typical hallmark of the spontaneous thrombosis model and almost always coincides with the presence of thrombi in the large veins of the heads. Previously, 48 hours after siRNA injection, we observed effects of onset and incidence of the clinical phenotype ranging from 1. nearly full absence of phenotype as compared to siRNA injected control animals) to 2. accelerated onset for nearly all animals of a given condition as compared to siRNA injected control animals (factor XII inhibition, presence of Factor V Leiden). Typical group size in these experiments was 10 animals per group. Using Fisher's exact based POWER calculations, statistically significant changes are detected when in one group 8 out of 10 animals follow the black and white response which is the display of visible symptoms of the spontaneous thrombotic phenotype, while in the reference group 8 out of 10 do not respond and remain fully normal (resulting in P=0.023 (2-tail)). <http://www.langsrud.com/stat/fisher.htm>. Subsequently, these numbers (n=10) also allow to detect statistically significant changes in liver fibrin deposition (using non-parametric Mann Witney tests) and allow to describe biologically relevant changes in thrombus incidence (Fisher's exact tests), severity, structure and cellular composition.

Sex consideration: Unless we determine a clear link between the *Slc44a2* gene and sex in the initial characterization described in appendices 3.4.4.1-2, we will only use females for the following procedures. We opt for female over male since there is less biological variability in measures such as size and weight. This is particularly relevant for this model as we will inject the same amount of siRNA per mice so they must be as closely weight matched as possible. Female mice can also be housed together even though they are not littermates (males cannot) which also helps to minimize any differences that may arise due to housing conditions. In addition, as several studies report sex differences in biological response to murine models of VT (Alvarado et al Thromb Res 2011; Vanlangenvelde et al Comp Med 2005), we cannot justifiably group males and females together, as such bi-distributional readouts may obscure true differences which may be due to the gene or antibodies alone.

B. The animals

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

The initial studies will include *Mus musculus* from a C57BL/6J background, containing either a deleted region (exon 3-10) of the *Slc44a2* gene on both alleles (KO), one allele (HET) or both wild type alleles (WT), globally in all tissues of the animal. They originate from the lab of ██████████ at the University of Michigan but have been bred at the LUMC for many generations. In addition, the final studies will employ mice lacking the *Slc44a2* gene only in specific cell types. They will be generated by cross breeding *Slc44a2* floxed mice, containing loxP sites on either side of exons 3-10, with mice expressing Cre-recombinase under the control of either the *Tie-2* or *LysM* promoter, resulting in mice lacking

SLC44A2 in endothelial cells or neutrophils, respectively. To control for genetic variation as much as possible, we will make use of matched litter mate siblings, generated from parents who are heterozygous for the KO allele. The mice will be included between ages of 8-14 weeks. We estimate that the maximal number of animals needed to complete all aspects of the studies included in this proposal regarding siRNA spontaneous induced thrombosis to be approximately 540. If the response of mice in appendices 3.4.4.1-2 is determined to be dependent on sex (unlikely), then we will also include 540 males.

Training and set up of procedure:
10 WT animals

siRNA spontaneous induction of thrombosis in global knockout animals:
3 genotypes (WT, HET, KO) x 10 group size x 1 sex (female) x 3 timepoints (24, 48, 72hr) = 90 animals

siRNA spontaneous induction of thrombosis with anti-SLC44A2 antibodies:
3 genotypes (WT, HET, KO) x 10 group size x 1 sex (female) x 3 timepoints (24, 48, 72hr) = 90 animals

siRNA spontaneous induction of thrombosis in cell specific knockout animals:
2 genotypes (WT or KO) x 2 cell type (endothelial or neutrophil) x 10 group size x 1 sex (female) x 3 timepoints (24, 48, 72hr) = 120 animals

Spontaneous model of thrombosis:
4 systems (WT, WT hemo/KO stromal, KO hemo/WT stromal, KO) x 2 (donor, recipient) x 10 group size x 1 sex (female) x 3 timepoints (24, 48, 72hr) = 240 animals

In the case that we receive a request from reviewers to repeat the siRNA spontaneous induction of thrombosis procedure with a minor addition such as a therapeutic compound, neutralizing antibody or additional stimuli etc., we estimate that we would need approximately 90 additional animals, based on the calculations above. These animals will be used only if specifically requested by an editor/reviewer in order to increase the chances of a successful publication which would ensure the dissemination of these data within the scientific community.

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: Due to the complex nature of VT, which involves several different biological systems including the circulatory, immune and digestive system, as well as the physical interaction between flowing blood and the vessel wall, it cannot be accurately replicated *in vitro*. Thus an *in vivo* system, which includes interactions between all such factors, especially with spontaneous formation of thrombi, is essential in studying this process. In addition, the ability to isolate the actual thrombi for analysis will provide critical clues as to the mechanism driving pathogenesis. However, once we have conducted the studies contained in this proposal, it is likely that we will be able to pinpoint the cellular players and signalling pathways that are central to this process, specifically in relation to SLC44A2, and we can then follow up using *in vitro* models with human tissues to confirm and therefore strengthen our conclusions.

Reduction:

In order to reduce the number of animals necessary, we have taken several steps and carefully

considered all options. First, we are making use of littermates so as to reduce the chance of genetic variability. Second, we will save most organs and materials from the mice and not only the tissues that are classically involved in haemostasis. In this way, if the data points to a novel finding and further analysis is needed in secondary organs, we will already have them and the need to include more animals may not be necessary. Lastly, based on power calculations and experience with these types of procedures, we have determined the optimal amount of animals to include in these studies so that a significant difference between experimental conditions can be found (if one exists) and no repetition will likely be needed. Additionally, we plan to only use females so as to reduce the number of mice included. We have also contemplated as to whether another experimental design can be used in order to minimize the requested numbers or the overall distress to the animals. However, we believe that the two models proposed in this study (also appendix 3.4.4.3), used in combination, are the best strategy to research venous thrombosis and cover all aspects that may be key in VT pathogenesis.

Refinement:

Several practices are put in place in order to minimize any pain or discomfort for the animals during the proposed studies. Anaesthesia will be administered prior to the final collection of tissues, so that no pain will be felt during these procedures and for mice receiving bone marrow transplantation, anaesthesia will be administered prior to the irradiation of recipient mice. We also follow the guidelines set forth in the directive Diehl et al 2001 when determining the appropriate injection volumes. In addition, to minimize any discomfort that may arise due to the induction of VT, analgesia will also be given 36 hours post-injection and up until the time of collection, we do not expect full thrombi formation to occur before 36 hours. These studies will also be conducted by trained researchers with experience performing these specific techniques. We also plan to closely monitor the response of the animals at several time points after the injection and if we observe any discomfort associated with humane endpoints such as changes in behaviour (posture, grooming, activity) or pathophysiological reactions (rapid breath, unusual heart rate, weight loss) we will end the experiment immediately. In addition, as the irradiation may weaken the animals, we will provide special housing conditions including longer nipples on the water bottles, which will contain antibiotics, as well as soft food to ease accessibility for eating and drinking.

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

The measures taken to minimize animal suffering, pain and fear in regards to the proposed studies include follow up treatment with analgesia continuously until sacrifice in addition to pre-treatment of the animals with the appropriate anaesthesia before collection of tissues. There are no adverse effects on the environment resulting from these studies.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

Not applicable.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

All experimental animals will be anaesthetised prior to irradiation and the collection of blood or tissues which will subsequently be used for characterization of the mice. Mice will also begin to receive analgesia 36 hours post-injection and continuously up until the point of sacrifice. These procedures are deemed optimal based on experience with such techniques within the department.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

As we do not fully know the extent to which SLC44A2 is contributing to VT, it is possible that it plays a role in anticoagulation, in which case, the onset of the thrombus formation in knockout mice may be accelerated. This would result in visible symptoms including exophthalmos, peri-ocular haemorrhages or edema in the mandibular region or possibly death prior to the planned time points. Adverse effects that may arise due to the bone marrow transplant procedure are either graft versus host disease or alternatively, host versus graft disease in which T-cells become reactive and attack the tissues of the host or graft, respectively. In addition, the effects of irradiation may also result in anaemia, immunosuppression, diarrhea and damage to the mucosal membranes.

Explain why these effects may emerge.

These effects emerge as anticoagulation proteins are lowered and may be accelerated in the case that SLC44A2 plays a role in VT. In regards to adverse effects associated with bone marrow transplantation, this occurs when the MHC molecules are different between the host and donor mice.

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

We are prepared for such an outcome and have planned to minimize the severity of such an event by administering analgesia after the injection of siRNAs in case of discomfort from bleeding, in addition to regular monitoring of the mice for any signs of severe discomfort associated with humane endpoints. In order to minimize the chance of rejection of transplantation, we are using litter mates both as donor and recipient in mice that are backcrossed to C57BL/6 background several generations. We expect the genetic variability to be very limited between such animals which will reduce the chance of mismatched MHC expression on the tissues. Animals will also be placed in special housing conditions (see section D, refinement) 3 weeks post irradiation in preparation for the adverse effects associated with the procedure.

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

X Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

Criteria for humane endpoints during this part of the study include behavioural changes in posture,

grooming or activity levels in addition to pathophysical reactions such as rapid breathing, weight loss greater than 15% compared to starting weight prior to injection, exophthalmos, peri-ocular haemorrhages or edema in the mandibular region indicating a possible venous rupture in the head. Additionally for mice with bone marrow transplant, HBV activation following radiation.

Indicate the likely incidence.

The incidence can range anywhere from 20% to 80% depending on the importance of SLC44A2 in the propagation of thrombosis, which is currently unknown. In the case that SLC44A2 does not play a role in VT we expect to see approximately 80% incidence as this is generally what we expect to observe in the control group. Similarly, if it exacerbates the VT phenotype, we expect to observe similar occurrence (80%), only at an earlier time point which is why we include several observation points after injection. If the loss of SLC44A2 has a protective role then we expect to observe incidence of approximately 20%. At the onset of any sign of exophthalmos, peri-ocular haemorrhages or edema in the mandibular region, the animal will be euthanized immediately.

K. Classification of severity of procedures

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

The injection of siRNAs targeting anticoagulation proteins will result in the formation of large thrombi in large veins of the head of the mouse which may result in intra/periocular haemorrhages. Based on these known outcomes, the procedures are deemed to include moderate discomfort and will thus include the proper analgesia to prevent the discomfort as much as possible. With respect to bone marrow transplantation, donor animals fall under the category of "non-recovery." Recipient animals will undergo the siRNA model and will therefore experience moderate discomfort. The mice will be given the appropriate anaesthesia and analgesia to minimize this as much as possible.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

Animals are killed and used amongst others for full pathological 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

DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: AVD116002016607
2. Titel van het project: The Role of the Solute Carrier Transporter 44A2 (SLC44A2) Gene in the Pathophysiology of Venous Thromboembolism.
3. Titel van de NTS: De Rol van de Erfelijke Factor 'Solute Carrier Transporter 44A2' (SLC44A2) in de Ontwikkeling van de Ziekte Veneuze Trombose.
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
 - wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: DEC Leiden
 - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
 - e-mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: 21-02-2017
 - aanvraag compleet: 21-02-2017
 - in vergadering besproken: 02-03-2017 & 13-04-2017
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van 09-03-2017 t/m 04-04-2017 en 18-04-2017 t/m 21-04-2017
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 04-04-2017 en 21-04-2017
 - advies aan CCD: 25-04-2017
7. De IvD geeft aan dat de aanvrager de aanvraag met de IvD heeft afgestemd en dat deze de instemming heeft van de IvD
8. Eventueel horen van aanvrager
N.v.t.
9. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum: 09-03-2017
 - Strekking van de gestelde vragen:
De DEC heeft bij de aanvrager aanvullende informatie ingewonnen met betrekking tot de gekozen strategie, de go/no-go momenten, het ongerief, de berekening van het aantal dieren, de keuze van het geslacht, de analgesie, de 3 V's en de humane eindpunten.
Naar aanleiding van deze vragen is het projectvoorstel inclusief bijlages en de NTS door de aanvrager aangepast.
 - Datum: 13-04-2017
 - Strekking van de gestelde vragen:
De DEC heeft vragen gesteld over de aantallen en het gebruik van persoonlijke namen.

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

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om over deze projectaanvraag te adviseren. De benodigde expertise op dit wetenschappelijke terrein is aanwezig binnen de DEC.
4. Geen van de DEC leden is betrokken bij het betreffende project.

C. Beoordeling (inhoud)

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

Belangen en waarden

4. Het directe doel van dit project is bepalen hoe SLC44A2 de interactie tussen bloed en de veneuze vaatwand moduleert en daarmee ook het ontstaan en/of de verspreiding van veneuze tromboze. Het uiteindelijke doel is het verkrijgen van nieuwe therapeutische inzichten voor de ontwikkeling van verbeterde VTE behandelingen. Het betreft hier een fundamenteel onderzoek. De DEC is van mening dat er een duidelijke relatie is tussen het directe en uiteindelijk doel. De aanvrager heeft helder gemaakt wat de status is van het onderzoeksveld en wat de bijdrage van dit project aan het onderzoeksveld zal zijn. Ondanks dat er meerdere vorderingen zijn gemaakt met de identificatie van genetische varianten die verband houden met VTE, verklaren ze in veel gevallen slechts een klein percentage van de VTE risico's. Uit de aanvraag blijkt tevens dat de huidige therapeutische strategieën voor VTE gericht zijn op het antagoneren van coagulatiefactoren wat als bijwerking tot levensbedreigende bloedingen kan leiden. Daarom is er een dringende behoefte aan verbeterde en/of

nieuwe therapeutische strategieën voor patiënten met VTE. De DEC is van mening dat het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld.

5. De belangrijkste belanghebbenden in dit project dat gericht is op het analyseren van de functie van SLC44A2, inclusief de interacties met antilichamen, en het ontrafelen van de onderliggende mechanismes tussen SLC44A2 en veneuze trombo-embolie (VTE) zijn de proefdieren, de onderzoekers en de patiënt en diens naasten. Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal worden aangetast, de dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en pijn ondergaan. Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: De onderzoekers zullen kennis verkrijgen. Ook zullen de carrière mogelijkheden van de onderzoekers verbeteren door publicaties. Waarden die voor patiënten bevorderd worden: De gezondheid van patiënten zal verbeterd worden. Hierdoor zal de kwaliteit van leven verbeterd worden van patiënten en hun naasten.
6. Voor zover de DEC kan beoordelen is er geen sprake van substantiële milieueffecten.

Proefopzet en haalbaarheid

7. Naar de overtuiging van de DEC beschikt de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen om de projectdoelstelling met de gekozen strategie binnen de gevraagde termijn te realiseren. De onderzoeksgroep heeft veel expertise op het gebied van dierexperimenteel onderzoek en de beschreven diersmodellen. In de afgelopen jaren zijn volgens vergelijkbare strategieën en aanpak belangrijke wetenschappelijke resultaten behaald.
8. De DEC is er van overtuigd dat het projectvoorstel aansluit bij recente wetenschappelijke inzichten en geen hiaten bevat die de bruikbaarheid van de resultaten in de weg zullen staan. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en helder gekozen en sluiten aan bij de aangegeven doelstellingen en de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen naar de mening van de DEC leiden tot het behalen van de doelstelling binnen de looptijd van het project.

Welzijn dieren

9. Alle dieren worden gefokt bij een geregistreerd fokbedrijf voor het gebruik in dierproeven, er is geen sprake van afwijkende huisvesting en/of hergebruik. Er is geen sprake van bedreigde diersoorten, niet-menselijke primaten, zwerfdieren en/of dieren uit het wild. De toegepaste methoden voor anesthesie, analgesie en euthanasie zijn conform de Richtlijn.
10. De DEC is ervan overtuigd dat de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de richtlijn. Het proefdiercentrum van het LUMC beschikt over uitstekende faciliteiten en uitsluitend bevoegd en competent personeel zal zorg dragen voor de verzorging van de dieren en de uitvoering van de dierproeven.
11. De DEC heeft zich ervan verzekerd dat de aanvrager al het mogelijke heeft gedaan om het eventuele ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen. De DEC schat dat de dieren als gevolg van de chirurgische ingreep en de vorming van trombose cumulatief maximaal matig ongerief zullen ervaren. De donormuizen vallen naar inziens van de DEC in de categorie non-recovery. Deze inschatting is in overeenstemming met het niveau van het cumulatief ongerief ingeschat door de onderzoekers.

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

3V's

14. In het project wordt de keuze voor de diermodellen duidelijk onderbouwd. De betrokken dieren en het gekozen diermodel zijn het meest geschikt voor deze studieopzet. De desbetreffende dierproef berokkent de dieren het minste pijn, lijden, angst of blijvende schade. De DEC is ervan overtuigd dat er geen alternatieven beschikbaar zijn voor het voorgestelde gebruik van intacte dieren om de doelstelling van dit project te realiseren.
15. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereisten van vermindering van dierproeven. De onderzoeksgroep heeft jarenlange ervaring met dit soort experimenten. Bovendien beschikt de onderzoeksgroep over een team van biotechnici die de benodigde ervaring hebben met proefdieronderzoek. De stapsgewijze opbouw zorgt voor een minimaal gebruik van proefdieren. Zo wordt er eerst een pilotexperiment uitgevoerd om de juiste dosering van antilichamen te bepalen voordat wordt verder gegaan in muizen met verschillende genotypes. Door gebruik te maken van nestgenoten wordt de kans op genetische variatie verkleind. Tevens worden organen en weefsels bewaard zodat deze wanneer nodig gebruikt kunnen worden voor verdere analyse. Naar inzien van de DEC zijn de beschreven go/no-go momenten realistisch, helder en eenduidig omschreven, waardoor er geen onnodig onderzoek zal worden uitgevoerd. De DEC is ervan overtuigd dat het onderzoek ethisch verantwoord zal worden uitgevoerd. De DEC acht het maximale aantal te gebruiken dieren realistisch geschat.
16. De uitvoering van het project is in overeenstemming met de vereisten van verfijning van dierproeven en is zo opgezet dat de dierproeven met zo min mogelijk ongerief worden uitgevoerd. Bij de opzet van dit onderzoek wordt rekening gehouden met dierenwelzijn door het gebruik van adequate anesthesie en analgesie waar nodig. Tevens zullen eerst de lage concentraties antilichaam getest worden om de kans op ongerief zo laag mogelijk te houden. Tot slot krijgen de bestraalde dieren antibiotica door het drinkwater in flessen met extra lange drinktuitjes en weekvoer op de bodem van de kooi. De DEC is ervan overtuigd dat de beschreven dierproeven zo humaan mogelijk zullen worden uitgevoerd.
17. Het betreft hier geen wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. De aanvrager zal in het project in eerste instantie gebruik maken van zowel mannelijke als vrouwelijke muizen. Indien uit de resultaten blijkt dat er geen significante verschillen zijn tussen de geslachten zullen alleen vrouwelijke muizen gebruikt worden voor de rest van het project. De onderzoeker heeft dit naar mening van de DEC voldoende onderbouwd in de projectaanvraag.
19. De dieren worden in het kader van het project gedood. Na het doden worden bloed- en weefselmonsters uit verschillende organen die centraal staan bij het proces van VT

op verschillende tijdstippen worden verzameld om veranderingen te kunnen registreren tijdens belangrijke fases van de ziekte. Het doden van de dieren gebeurt volgens een voor de diersoort passende dodingsmethode die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU.

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

NTS

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

D. Ethische afweging

1. Rechtvaardigt het bepalen hoe SLC44A2 de interactie tussen bloed en de veneuze vaatwand moduleert en daarmee ook het ontstaan en/of de verspreiding van veneuze trombose met als uiteindelijk doel het verkrijgen van nieuwe therapeutische inzichten voor de ontwikkeling van verbeterde VTE behandelingen, het ongerief dat de dieren wordt aangedaan?
2. Project gericht op het analyseren van de functie van SLC44A2, inclusief de interacties met antilichamen, en het ontrafelen van de onderliggende mechanismes tussen SLC44A2 en veneuze trombo-embolie (VTE).
Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: matig nadeel.
Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: gering voordeel.
Waarden die voor de doelgroep (incl. de samenleving) bevorderd worden: groot voordeel.
De DEC is van mening dat de belangen van de samenleving in het algemeen en de patiënten in het bijzonder in dit project zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de proefdieren. VTE is de derde voornaamste oorzaak van sterfte als gevolg van hart- en vaatziekte wereldwijd en is verantwoordelijk voor ongeveer een half miljoen sterfgevallen in West-Europa elk jaar. Bovendien zijn de niet lethale gevolgen die in verband worden gebracht met VTE verantwoordelijk voor een duidelijke vermindering van de kwaliteit van leven van miljoenen mensen. Tevens hebben de huidige therapeutische strategieën voor VTE grote bloedingen als bijwerking. De DEC acht het daarom van essentieel belang dat er nieuwe behandelstrategieën ontwikkeld worden zonder deze negatieve bijwerkingen. Het is aannemelijk dat de doelstelling behaald zal worden. Hiertoe zullen dieren worden gebruikt. De onderzoekers doen er echter alles aan om het lijden van de dieren te beperken, waardoor het ongerief van de dieren zo veel mogelijk beperkt blijft.
3. De DEC is overtuigd van het belang van de doelstelling van dit project. De DEC is van mening dat de waarden die voor de doelgroep bevorderd kunnen worden zwaarder wegen dan de waarden die voor de proefdieren in het geding zijn. Het project is goed opgezet. De DEC is bovendien van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstelling en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De DEC is er verder van overtuigd dat de onderzoeksgroep voldoende ervaring heeft met de gekozen onderzoeksstrategie en met de voorgestelde dierproeven om de doelstelling te behalen en dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om zowel het ongerief van de dieren alsmede het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken. De DEC onderschrijft dat de doelstelling niet zonder het gebruik van proefdieren behaald

kunnen worden en acht het gebruik van het aantal dieren en het daarmee samenhangende ongerief bij de dieren gerechtvaardigd.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

✓ **De DEC adviseert de vergunning te verlenen.**

- De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
 - Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.
 - Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist
 - Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...
- De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
 - De vaststelling dat het project niet 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 tijdens de beoordeling van dit projectvoorstel geen echte knelpunten en of duidelijke dilemma's naar voren gekomen.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

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



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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD116002016607
Bijlagen
2

Datum 12 mei 2017
Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte mevrouw Leids Universitair Medisch Centrum,

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 11 mei 2017. Het gaat om uw project "The Role of the Solute Carrier Transporter 44A2 (SLC44A2) Gene in the Pathophysiology of Venous Thromboembolism". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD116002016607. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

Datum:

12 mei 2017

Aanvraagnummer:

AVD116002016607

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
12 mei 2017
Aanvraagnummer:
AVD116002016607

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

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

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Datum:
12 mei 2017
Aanvraagnummer:
AVD116002016607

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: Post Doctoral Researcher
Afdeling: [REDACTED]
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Over uw aanvraag

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

Over uw project

Geplande startdatum: 1 juni 2017
Geplande einddatum: 1 juni 2022
Titel project: The Role of the Solute Carrier Transporter 44A2 (SLC44A2) Gene in the Pathophysiology of Venous Thromboembolism
Titel niet-technische samenvatting: De Rol van de Erfelijke Factor Solute Carrier Transporter 44A2' (SLC44A2) in de Ontwikkeling van de Ziekte Veneuze Trombose
Naam DEC: DEC Leiden
Postadres DEC: [REDACTED], [REDACTED]
E-mailadres DEC: [REDACTED]

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1.684,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

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

Ondertekening

Naam: [REDACTED]
Functie: Gemandateerd vergunninghouder
Plaats: Leiden
Datum: 8 mei 2017

Datum:
12 mei 2017
Aanvraagnummer:
AVD116002016607



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

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



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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD116002016607
Bijlagen
2

Datum 12 mei 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 12 mei 2017
Vervaldatum: 11 juni 2017
Factuurnummer: 170607

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD116002016607	€ 1.684,00

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

Van: [REDACTED]
Verzonden: woensdag 31 mei 2017 12:07
Aan: [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: AVD116002016607: Aanhouden beoordelen.

Geachte [REDACTED],

Op 11 mei 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'The Role of the Solute Carrier Transporter 44A2 (SLC44A2) Gene in the Pathophysiology of Venous Thromboembolism' met aanvraagnummer AVD116002016607. Wij hebben nog een aantal vragen over uw aanvraag. In deze e-mail leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

-Uit uw aanvraag (bijlagen 3.4.4.1, 3.4.4.2 en 3.4.4.4) wordt niet duidelijk hoeveel procent van de dieren matig ongerief ondergaan. U wordt verzocht dit te specificeren. U wordt ook verzocht om aan te geven welke handelingen de donordieren zullen ondergaan (eerst doden en daarna het uitnemen van beenmerg?). Dit in verband met de controle op de inschatting van de ongeriefsclassificatie van deze dieren. In dat geval moet het ongerief namelijk als licht worden geclassificeerd.

-U geeft in uw aanvraag aan een deel van het onderzoek in 1 geslacht te willen uitvoeren. U geeft aan dat het te onderzoeken gen op zich niet onderhevig is aan geslachtsspecifieke verschillen, maar dat wel bekend is dat hormonen een rol spelen in haemostasis en dat er geslachtsspecifieke verschillen zijn beschreven voor muizenmodellen voor veneuze trombose. Dit zijn op zich valide redenen om het onderzoek met 1 geslacht te willen uitvoeren als het gebruik van beide geslachten zou leiden tot een significante toename van het benodigd aantal dieren. Om te zien of er inderdaad geslachtsspecifieke verschillen zijn, en deze verschillen te kunnen onderzoeken, zullen initiële proeven in bijlagen 3.4.4.1. en 3.4.4.2 met beide geslachten worden uitgevoerd. Indien blijkt dat die er niet zijn, kiest u er vervolgens voor het onderzoek met 1 geslacht voort te zetten. Dit is in tegenspraak met het beleid van de CCD dat beide geslachten gebruikt moeten worden indien er geen geslachtsspecifieke verschillen zijn. De door u gebruikte onderbouwing en gekozen strategie is niet geheel duidelijk en lijkt op punten tegenstrijdig. U wordt daarom verzocht uw strategie op dit punt beter toe te lichten. Mocht u uw strategie niet beter kunnen onderbouwen, kan de CCD een voorwaarde voor het evenredig gebruik van beide geslachten aan een eventuele vergunning verbinden.

-U wordt verzocht de NTS in overeenstemming te brengen met de aanvraag wat betreft het aantal dieren en de ongeriefsclassificatie. In de NTS gebruikt u de term 'onverwacht'. Wij willen u er op wijzen dat het gebruik van een dergelijke term tot vragen zou kunnen leiden bij het publiek over de noodzaak van het uitvoeren van het onderzoek. Wij adviseren u daarom die zin in de NTS aan te passen.

Opsturen binnen veertien dagen

De CCD zou uw aanvraag graag in de eerstvolgende vergadering willen bespreken. Wij zouden het daarom op prijs stellen als u de informatie uiterlijk vrijdagochtend 2 juni 2017 kunt aanleveren. Mocht u niet in de gelegenheid zijn zo snel te reageren, is dit geen probleem, u heeft veertien dagen de tijd om de ontbrekende informatie aan te leveren. U kunt dit aanleveren via NetFTP. Wij ontvangen ook graag de aangepaste formulieren.

Wanneer een beslissing

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]
Namens

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag

.....
T: 0900 2800028

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

June 01, 2017

Dear CCD evaluators,

Thank you for your feedback on our project proposal AVD116002016607, entitled “The Role of the Solute Carrier Transporter 44A2 (SLC44A2) Gene in the Pathophysiology of Venous Thromboembolism.” Please find attached the revised documents with the requested changes, highlighted in red throughout the files, as well as a summary of the additions below.

Thank you again for your advice and we hope this adapted version is suitable for approval by the commission.

In response to :

-Uit uw aanvraag (bijlagen 3.4.4.1, 3.4.4.2 en 3.4.4.4) wordt niet duidelijk hoeveel procent van de dieren matig ongerief ondergaan. U wordt verzocht dit te specificeren. U wordt ook verzocht om aan te geven welke handelingen de donordieren zullen ondergaan (eerst doden en daarna het uitnemen van beenmerg?). Dit in verband met de controle op de inschatting van de ongeriefsclassificatie van deze dieren. In dat geval moet het ongerief namelijk als licht worden geclassificeerd.

In all appendices, we have further specified the percentage of animals that will fall under each type of pain classification and included it within section K. With regards to the animals acting as bone marrow donors, we have now included how they will be euthanized (carbon dioxide asphyxiation) and stated that this will be done before the collection of the appropriate tissues (femur, tibia and humerus bones). These changes can be found in sections A, H and K. We consider the severity classification for these donor animals to be “non-recovery” since they will be euthanized before the isolation of bone marrow and will never recover consciousness, which is in line with the definition of “non-recovery” included in Appendix VIII of Directive 2010/63/EU.

-U geeft in uw aanvraag aan een deel van het onderzoek in 1 geslacht te willen uitvoeren. U geeft aan dat het te onderzoeken gen op zich niet onderhevig is aan geslachtsspecifieke verschillen, maar dat wel bekend is dat hormonen een rol spelen in haemostasis en dat er geslachtsspecifieke verschillen zijn beschreven voor muizenmodellen voor veneuze trombose. Dit zijn op zich valide redenen om het onderzoek met 1 geslacht te willen uitvoeren als het gebruik van beide geslachten zou leiden tot een significante toename van het benodigd aantal dieren. Om te zien of er inderdaad geslachtsspecifieke verschillen zijn, en deze verschillen te kunnen onderzoeken, zullen initiële proeven in bijlagen 3.4.4.1. en 3.4.4.2 met beide geslachten worden

uitgevoerd. Indien blijkt dat die er niet zijn, kiest u er vervolgens voor het onderzoek met 1 geslacht voort te zetten. Dit is in tegenspraak met het beleid van de CCD dat beide geslachten gebruikt moeten worden indien er geen geslachtsspecifieke verschillen zijn. De door u gebruikte onderbouwing en gekozen strategie is niet geheel duidelijk en lijkt op punten tegenstrijdig. U wordt daarom verzocht uw strategie op dit punt beter toe te lichten.

Mocht u uw strategie niet beter kunnen onderbouwen, kan de CCD een voorwaarde voor het evenredig gebruik van beide geslachten aan een eventuele vergunning verbinden.

We agree that this point can be further clarified. The use of both sexes during the initial characterization (appendix 3.4.4.1 and 3.4.4.2) is to rule out any gender specific interactions of SLC44A2 in regards to normal hemostasis. As stated previously, we do not expect there to be a link between SLC44A2 and gender. However, even if there is no association between SLC44A2 and gender, this does not mean we can pool together male and female animals in the models of venous thrombosis since it has been well established, both in our hands as well as by various other researchers in the field, that there is a clear bi-distributional sex response to thrombosis in murine models. A few examples of readouts that are significantly different between males and females are thrombus size, cytokine expression and blood cell counts (Alvarado et al Thromb Res 2011; Vanlangenvelde et al Comp Med 2005). If we pool the sexes, then we may miss the effect of the gene itself due to the large variation between mixed animals, which would imply that we would need to further increase the number of mice to find significant differences. We believe this to be counterproductive to the aim of *Reduction* and therefore, if there is no interaction between SLC44A2 and gender in hemostasis, we propose to continue with only one sex so as to decrease the number of animals needed for experimentation while at the same time ensuring that we can draw solid conclusions from the animals that are included. Additional text on this point has been added to all appendices.

-U wordt verzocht de NTS in overeenstemming te brengen met de aanvraag wat betreft het aantal dieren en de ongeriefsclassificatie. In de NTS gebruikt u de term 'onverwacht'. Wij willen u er op wijzen dat het gebruik van een dergelijke term tot vragen zou kunnen leiden bij het publiek over de noodzaak van het uitvoeren van het onderzoek. Wij adviseren u daarom die zin in de NTS aan te passen.

Here we have revised section 3.5 to include both the description of animals receiving bone marrow transplantation as well as the percentage of animals in each category of severity classification. Additionally, we've adjusted the number of animals to be used in section 3.3 to more accurately reflect the range that is possible in this proposal. Lastly, the word 'onverwacht' has been removed from sections 3.2 and 4.3.



Form Project proposal

- This form should be used to write the project proposal for animal procedures.
- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed.
- For more information on the project proposal, see our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 Provide the title of the project.

2 Categories

- 2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.
- Basic research
- Translational or applied research
- Regulatory use or routine production
- Research into environmental protection in the interest of human or
- Research aimed at preserving the species subjected to procedures
- Higher education or training
- Forensic enquiries
- Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

3 General description of the project

3.1 Background

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

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

Venous thromboembolism (VTE) is the third leading cause of cardiovascular mortality worldwide and is responsible for approximately half a million associated deaths in Western Europe each year (Cohen et al

Thromb Haemost 2007). In addition, adverse events linked to VTE, i.e. deep vein thrombosis (DVT) and pulmonary embolism (PE), are major contributing factors to the growing number of years lived with a disability and results in a marked reduction in the quality of life for millions of people every year. VTE is a complex thrombotic disorder influenced both by environmental aspects as well as in particular by genetic predisposition. As part of [REDACTED], within the Leiden University Medical Center (LUMC), our research mainly focuses on the underlying mechanisms associated with VTE and places a strong emphasis on the role of genetics in this process. This has led to seminal contributions in the VTE field including the discovery of the factor V Leiden mutation in the mid-nineties and subsequently several other genetic variations which can predetermine thrombotic risk. Although there have been several advances in the field with the identification of many genetic variants linked to VTE, they still only explain a minor percentage of VTE risk in many cases.

Recently, as part of the international INVENT consortium, we undertook a meta-analysis of genome-wide association studies (GWAS) to identify additional VTE susceptibility genes (Germain et al. 2015 Am. J. Human Genetics). Twelve GWAS totalling 7,507 VTE cases and 52,632 controls formed our discovery stage where 6,751,884 single nucleotide polymorphisms (SNPs) were tested for association with VTE. Nine loci reached the genome-wide significance level including 6 already known to associate with VTE (ABO, F2, F5, F11, FGG and PROC1R) and 3 unsuspected genes. SNPs mapping to the latter genes were selected for replication in 3 independent case-control studies totalling 3,009 VTE patients and 2,586 controls. This strategy led to the identification of *SLC44A2* as a new risk locus (p value = 2.75×10^{-15}). The lead SNP at the *SLC44A2* SNP locus is the non-synonymous rs2288904 previously shown to associate with transfusion related acute lung injury (TRALI). Importantly, a second independent GWAS study found that a locus also located within the *SLC44A2* gene is a genetic risk factor for both stroke and cardiovascular disease, further substantiating a possible role for *SLC44A2* in VTE pathogenesis (Hinds et al. 2016 Hum Mol Genet.) *SLC44A2* has not been described to associate with known haemostatic markers, thus interestingly, *SLC44A2* does not belong to conventional pathways for thrombosis, nor has it been associated with other cardiovascular diseases or related quantitative biomarkers.

The VTE lead SNP, *SLC44A2* rs2288904 (A or G), coincides with an amino acid substitution in the extracellular domain of the Solute Carrier 44 A2 protein (*SLC44A2* R154 or Q154, respectively) and is known to trigger antibody formation in carriers of the minor A allele, both during pregnancy and upon exposure to the major G allele variant. Upon transfusion, these antibodies induce neutrophil activation, sequestration, and finally, endothelial barrier damage which can result in possibly fatal transfusion related acute lung injury (TRALI). *SLC44A2* is expressed on neutrophils, which is the postulated target cell for the anti-*SLC44A2* antibodies in TRALI, although *SLC44A2* is also expressed on vascular endothelial cells. Our collaborators at Giessen University, Germany, demonstrated *in vivo* that the anti-*SLC44A2* antibodies induce loss of endothelial barrier integrity. In this model, neutrophils aggravated the destructive effects of anti-*SLC44A2*. Furthermore, they demonstrated *in vitro* that *SLC44A2* can act as a receptor for von Willebrand Factor (vWF), a factor expressed on the endothelium and a key molecule important for normal haemostasis. In addition, it has become evident that two isoforms of *SLC44A2* exist (i.e P1 and P2) with endothelial cells and neutrophils showing variable expression (P1 and P2 vs P1 only) possibly affecting *SLC44A2* functionality.

Initial work characterizing the *SLC44A2* global knockout mouse from a haemostasis perspective was performed in the laboratory of our collaborators at the University of Michigan in Ann Arbor, Michigan, USA. Preliminary testing found increased transcript levels of tissue plasminogen activator (tPA) in the lung of *SLC44A2* knock out mice indicating that these mice may have a better capacity for clearing blood clots. Furthermore, upon laser induced injury of the cremaster muscle, *SLC44A2* knockouts exhibited a reduction in fibrin formation, again suggesting that the mice have a faster clearance of clotting factors. These data point to a possible role for *SLC44A2* in the process of haemostasis, which has not been previously described, however, the mechanisms behind these observations remain unclear.

Also of particular interest is the recent identification of autoantibodies against *SLC44A2* in patients with autoimmune hearing loss (Kommareddi et al. 2009 Laryngoscope). The binding of these antibodies to *SLC44A2* expressing cells in the inner ear leads to a detrimental effect on hair cell survival and hearing, again demonstrating that anti-*SLC44A2* antibodies can have a disruptive effect on normal cellular

function. Several autoantibodies against haemostatic proteins such as prothrombin and thrombomodulin, in addition to antibodies targeting phospholipids, have been identified and linked to VTE, showing that autoantibodies can also contribute to the pathophysiology of VTE. We believe it is possible, as an alternative hypothesis, that a similar mechanism may also be occurring in the context of SLC44A2 and preliminary work by collaborators has even identified potential SLC44A2 autoantibodies in patients with VTE.

Altogether SLC44A2 appears to be relevant in both TRALI and VTE, two diseases where endothelial cells, neutrophils and their interactions are considered key to vascular pathophysiology. Importantly, antibodies can also play a destructive role in both of these conditions. Based on this knowledge, the current project proposal aims to further analyse the function of SLC44A2, including the interactions with autoantibodies, and unravel the mechanism underlying the association between SLC44A2 and VTE. We will focus in particular on the role of SLC44A2 in endothelial cells, neutrophils as well as with autoantibodies. We expect that the proposed project will provide novel therapeutic insight for the development of improved VTE treatments. Since all the current therapeutic strategies for VTE are directed at targeting coagulation factors and consequently have major bleeding as an unwanted side-effect and SLC44A2 has not been linked to traditional haemostasis, further understanding into its function may lead to the discovery of a unique treatment strategy without the adverse side effects of the current therapeutics.

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?

SLC44A2 has been identified as a new VTE-associated locus, one with a strongly significant association with the disease ($p=2.75 \times 10^{-15}$). However, at present, it is not understood how SLC44A2 and the allelic variation at amino acid 154 play a role in VTE pathophysiology. To further elucidate how SLC44A2 contributes to VTE pathogenesis, we formulated the following research questions: 1. What is the role of SLC44A2 during haemostasis? 2. How do autoantibodies targeting SLC44A2 affect haemostasis? 3. How does SLC44A2 contribute to VTE pathophysiology? 4. Do SLC44A2 targeting antibodies exacerbate the effects of VTE? 5. Are the contributions of SLC44A2 to VTE cell specific? Finding the answer to these questions will help us achieve our main objective which is to determine how SLC44A2 modulates the interactions between the blood and venous vessel wall, and thereby the initiation and/or propagation of venous thrombotic disease.

The current proposal is the result of a unique collaboration between [REDACTED], [REDACTED], LUMC, The Netherlands and [REDACTED], Giessen, Germany. Thus, expertise from both institutes will join at the pre-clinical and basic science level to clarify the function of SLC44A2 and the relevance of SLC44A2 and of SLC44A2 antibodies in VTE. Recently, mice with a conditional floxed *Slc44a2* allele (with loxP sites flanking *Slc44a2* exon 3-10) were generated by a research group at [REDACTED] at the University of Michigan in Ann Arbor, Michigan, USA. We have established a collaboration with this group, and in March 2016 we received embryos of these conditional *Slc44a2* mice that will be used for the present project. Cryorecovery of the embryos was performed in April 2016 and the first offspring carrying the conditional allele became available in Leiden as of May 2016. As all parties involved have extensive experience with the experimental disease models included in this proposal, the principles of replacement, reduction and refinement will be wholly implemented in an effort to prevent as many negative consequences for the involved animals as possible.

Upon completion of this project, we expect to have a coherent answer to all of the above mentioned research questions and thus a much better understanding of the role of SLC44A2 not only in normal haemostasis, but in the pathological condition of VTE as well. With this knowledge, we can then begin to translate our observations into those from a clinical perspective with an aim to design better therapeutics

with less detrimental side effects for patients and ultimately improve the quality of life for those living with the symptoms associated with VTE.

3.3 Relevance

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

SLC44A2 is a novel susceptibility gene for VTE, however, very little is known about the protein and thus, at this juncture, it does not belong to any conventional pathways for VTE or have a role in haemostasis pathways. Therefore, the proposed objectives create an opportunity to elucidate the function of SLC44A2 in the context of physiological and pathological haemostasis. In regards to the impact this may have on the field as a whole, these studies may discover previously unknown mechanisms involved in the pathogenesis of VTE as well as establish a unique biomarker for the disease. Moreover, these findings may further prove significant in the clinical setting as targeting SLC44A2 might provide a more effective treatment strategy in VTE, as it is not linked to traditional haemostasis and would reduce the chance of adverse side effects such as bleeding, which accompanies all of the current therapeutics available.

3.4 Research strategy

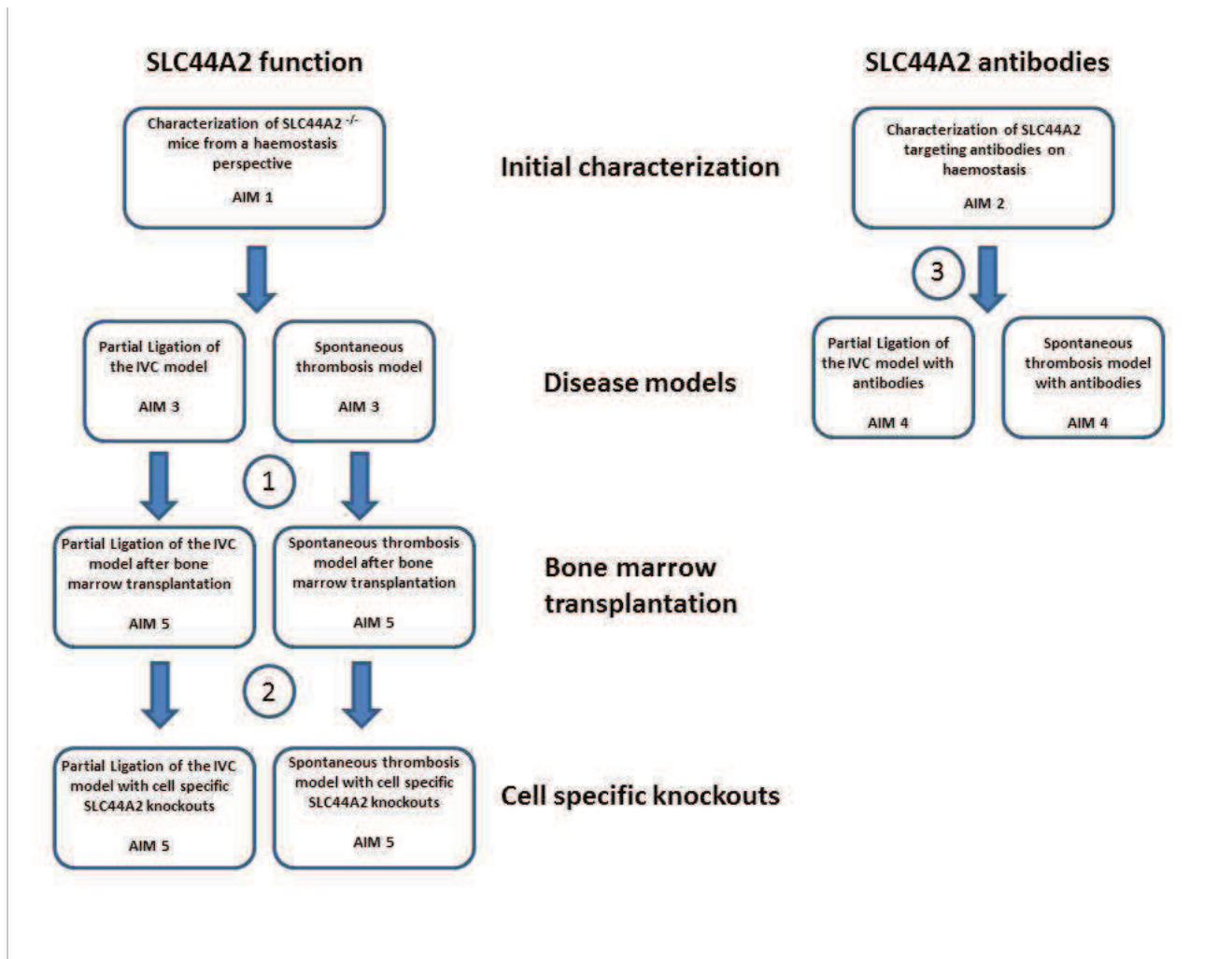
3.4.1 Provide an overview of the overall design of the project (strategy).

Haemostasis and subsequently VTE, are complex processes which involve various cell types and cell products from different biological systems including endothelial cells (circulatory), neutrophils (immune) and the production of coagulation factors by hepatocytes (digestive). There is also the added element of continuous blood flow, a physical factor that is difficult to replicate precisely *in vitro*, in addition to the possible changes in the immune profile. Therefore, it is only possible to truly define key interactions central to these processes using a model organism. In order to investigate the role of SLC44A2 in the pathogenesis of VTE we will make use of the recently generated *Slc44a2* exon 3-10 deficient knock out mice which allow for conditional deletions using the Cre-Lox recombination system. Our collaborator demonstrated that the *EIIa* Cre-mediated germ line inactivation of *Slc44a2* results in mice globally lacking *Slc44a2* (full knockouts) that appear viable and healthy with no spontaneous discomfort other than hearing loss upon a hearing challenge. This phenotype is only observed in the FVB genetic background and not the C57Black/6J background which we intend to use.

Using the mice in this manner we can then achieve the following aims:

1. Establish the role of SLC44A2 (if any) during traditional haemostasis
2. Determine if autoantibodies targeting SLC44A2 affect traditional haemostasis
3. Detect mechanisms which connect SLC44A2 to VTE pathophysiology
4. Test if SLC44A2 targeting antibodies exacerbate the effects of VTE
5. Dissect out the cell specific (i.e. endothelial cells or neutrophils) contributions of SLC44A2 to VTE

The following aims are summarized in the design overview below:



3.4.2 Provide a basic outline of the different components of the project and the type(s) of animal procedures that will be performed.

In order to determine the importance of SLC44A2 function during normal haemostasis we will begin by characterizing the global *Slc44a2* knockout mice from a haemostasis perspective, focusing on the organs that are central to this process such as blood, liver and immune cells (AIM 1). It is at this point we will also determine whether or not it is necessary to include both male and female mice in the subsequent studies, as the response is well described to be bi-distributional and therefore the two genders cannot be combined. As obvious differences may not be detected in these mice under normal homeostatic conditions, regardless of the findings from this characterization, upon completion, we will move forward to the disease models (AIM 3). In this respect, we will employ two different models of venous thrombosis (VT), namely the partial ligation model and the spontaneous induced thrombosis model. With these two systems, we will cover all relevant aspects which are crucial to the induction of VT and overcome the limitations that each model presents such as retrograde thrombus formation in the ligation model and the lack of influence by neutrophils in the spontaneous model. The results from AIM 3 will then determine our first go/no go moment (arrow 1). If the disease models point to a clear effect of SLC44A2 in VT pathophysiology, we will then proceed to first part of AIM 5, which is the use of bone marrow transplantation in order to identify the cellular compartment expressing SLC44A2 that is contributing to the induction of VT, i.e. the stromal or hematopoietic compartment. The outcomes from these studies will then comprise our second go/no go moment (arrow 2). If the loss of SLC44A2 in either the stromal or hematopoietic compartment does not elicit differences in the propagation of VT, then we will conclude that ubiquitous expression of SLC44A2 is important in VT pathogenesis and no further study will be needed. However, if the findings point to a certain compartment as being the main contributor in the disease, then we will continue to pinpoint the specific cell type that is central to this process. To achieve this final objective of AIM 5, we will generate either endothelial cell (stromal) or neutrophil (hematopoietic) specific SLC44A2 knockout mice and then induce disease using the models described in

AIM 3.

In parallel to the above studies, we will also explore the contributions of SLC44A2 targeting antibodies in haemostasis and possibly VT. In order to do this, we must first find a working concentration of SLC44A2 antibody that can be tolerated by the mice without being cleared from the blood within a 72 hour time frame, specifically the duration of the disease model. In addition to titrating the amount of antibody that is suitable for later models, we will also determine the effect that these molecules have on haemostasis. These are the two main goals of AIM 2. The outcome of these studies will then form a go/no go moment for this portion of the project (arrow 3). If we can find an amount of SLC44A2 antibody that circulates freely within in the mouse without causing an acute reaction, we will proceed to use disease models in combination with autoantibodies (AIM4). However, if the mice have a severe response to the antibodies (which we do not expect) or if the antibodies do not remain in circulation long enough, then we will conclude this half of the project.

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.

Altogether the different components of this project culminate to form an explanation as to how SLC44A2 contributes to VTE. The initial study proposed in aim 1 will determine if SLC44A2 is involved in traditional haemostasis pathways through characterization of the *Slc44a2* global knockout mouse from a haemostasis perspective. We will evaluate whether the loss of SLC44A2 has any effect on the production of coagulation factors and subsequently blood clotting, which is the source of clinically manifested events associated with VTE. **As the effects of the loss of SLC44A2 may not be evident under normal homeostatic conditions and only upon vascular injury, regardless of the outcome of this aim, we will proceed to the disease models described in aims 3-5** Additionally, in aim 2, we will also investigate the effect that SLC44A2 targeting antibodies have on haemostasis as these corresponding antibodies have already been implicated in vascular disease such as transfusion related acute lung injury (TRALI). Together these findings will form the first milestone of the project as such a detailed examination has yet to be described and is crucial before studying further aspects of SLC44A2 involvement in VTE. These results may also help us to hone our focus on certain mechanisms that may be amplified at later stages in the disease models included in aims 3-5. Moreover, the initial trials studying SLC44A2 targeting antibodies are of particular importance as these will establish the appropriate concentration of antibodies as well as administration schedule that will be used in aim 4. Upon completion of this initial characterization, we will move forward with aim 3 and determine the importance of SLC44A2 in the propagation of VTE using two independent disease models of thrombosis, namely the partial ligation and spontaneous model. It is vital to utilize both models of VTE as each has its disadvantages such as extensive surgical handling and retrograde thrombi formation in the ligation model and no role for neutrophils in the spontaneous model. Thus, using these systems in combination is essential and will ensure that we fully cover all aspects that are key to VTE pathophysiology. These data will then mark the second milestone of the project as it will become clear as to whether SLC44A2 is a central contributor in the induction of thrombosis. If mice lacking SLC44A2 are protected or exhibit a less severe thrombotic phenotype, we will conclude that this is directly linked to the loss of SLC44A2. However, if we do not observe such an effect, we will conclude that SLC44A2 does not play a role in VTE and will not proceed with experiments associated with aim 5. In addition, as detailed in aim 4, in order to distinguish the importance of SLC44A2 targeting antibodies in VTE pathogenesis we will include such antibodies, as defined by aim 2, in addition to the two thrombosis models and measure the additive effect that antibodies may have on vessel injury. The outcome from these studies will constitute another major milestone of the project as it would establish whether autoantibodies against SLC44A2 in particular can exacerbate the symptoms associated with VTE. This has yet to be described and may have strong implications for the clinical setting. Lastly, when the evidence from aim 3 supports further study of SLC44A2, we will continue to dissect out its importance by defining the cellular players that are contributing to disease induction, as described in aim 5. We will first utilize bone marrow isolated from WT and *Slc44a2* global knockout mice which is then transferred back to either WT or mice lacking *Slc44a* before the challenge of thrombosis. In this way we can begin to identify the cellular compartments (stromal or hematopoietic) that support the propagation of VTE as it relates to SLC44A2. Concurrently, we will also breed *Slc44a2* floxed mice with *Tie-2* Cre and *LysM* Cre in order to generate cell specific knockout mice, lacking SLC44A2 in either endothelial cells or neutrophils, respectively. Thrombosis will then be promoted in these mice and based on these results, we will be able to identify which of these cell types is driving the pathogenesis of VTE. This will be the final milestone of

the project as not only will we have determined the importance of SLC44A2 in VTE, but identified the principal cell types that are essential in SLC44A2 associated VTE pathogenesis.

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	Haemostasis characterization of <i>Slc44a2</i> knockout mice
2	Effect of SLC44A2 targeting antibodies on haemostasis
3	Venous thrombosis through partial ligation of the caval vein
4	Spontaneous venous thrombosis through RNAi
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 11600
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. [REDACTED]
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|--|
| 3.4.4.1 | Haemostasis characterization of <i>Slc44a2</i> knockout mice |
- Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

Blood and tissue samples from several organs central to the process of haemostasis will be collected from wild type and *Slc44a2* deficient animals, including 1) global knockout 2) cell specific knockout (endothelial or neutrophil) or 3) bone marrow transplanted animals which creates mice lacking SLC44A2 in either the stromal or hematopoietic compartment in addition to mice containing or lacking SLC44A2 in both compartments. This may include, but is not limited, to material such as blood, liver, lungs and venous tissue. Subsequently, these samples can be used to phenotype the *Slc44a2* knockout mouse (either global or cell/compartement specific) from a haemostasis perspective by measuring differences in the capacity of the blood to coagulate and related cells to produce coagulation factors, in addition to measuring changes in the immunological profile. In this way we can begin to answer how SLC44A2 affects both normal and pathological haemostasis. As it is difficult to isolate such material without causing injury to the animals, a total isolation of all tissues upon anesthetization, followed by euthanization, is the most humane procedure.

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

While under general anaesthesia, the abdomen of the mice will be opened and blood will be collected directly from the vena cava into a syringe containing sodium citrate so as to preserve the sample. Blood must be collected directly from the vein in order to avoid contamination with factors that activate coagulation (i.e. tissue factor) as it will be used for testing exactly that at a later time. The amount of blood retrieved will be the maximal amount possible, therefore following collection, the diaphragm of the

mouse will be punctured, euthanizing the mouse in a humane manner. At this point, several tissues will be collected and snap frozen. These can then be used to determine if *Slc44a2* mice exhibit any differences in haemostatic activity both at the mRNA and protein level.

For the mice undergoing bone marrow transplantation, donor mice will be euthanized using carbon dioxide asphyxiation and bone marrow cells from femur, tibias and humerus bones will be isolated and prepared for injection into the recipient mice. Bone marrow transplant recipients will begin receiving acidified, antibiotic water one week prior to the irradiation procedure. At least six hours before receiving the transplantation, they will be sub lethally irradiated at a dose suitable for their background (C57BL/6 mice). Following radiation, mice will receive a tail vein injection of the donor mouse bone marrow cells and subsequently housed for 21 days until the repopulation of hematopoietic cells is complete.

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

Group size: For the calculation of determining how many animals are necessary per group to establish any meaningful differences, we use the parameter of thrombin generation as it has the largest standard deviation as compared to other readouts of haemostasis, such as gene expression by qPCR. After reviewing the most recent literature, we have determined that a reasonable mean for group 1, the wild type (WT) group in a C57BL/6 background, for endogenous thrombin potential (ETP) is approximately 220 nM*min and for group 2, a knockout mouse that is reasonably healthy as compared to its WT littermates, a value of 290 nM*min. We estimate the heterozygous mice to fall somewhere in between and therefore we use the mean value of 255 nM*min and an average standard deviation of 45. Because the readout will be comparing three groups, we will use a one way ANOVA test which will control for the type I error. Using the G*Power statistical software (<http://www.gpower.hhu.de/>) program to perform a POWER calculation with an alpha of 0.05 and a power of 0.80, we find the effect size f to be 0.63505 which would require a sample size of 30, signifying 10 animals per group.

Sex consideration: As it is unknown whether sex will influence the effect of the *SLC44A2* gene and its role in haemostasis, we will include both for this initial characterization study. If no significant interactions between gender and *SLC44A2* in aspects of hemostasis (thrombin generation, coagulation gene transcripts, etc.) are found, then we will continue only with females for the remainder of the project as there is generally less biological variation such as size/weight between age matched mice. Our rationale for starting with both sexes is due to the well described findings that hormones can play a role in haemostasis (i.e. contraception & thrombotic events), but because no differences in gender were described in the initial GWAS study linking *SLC44A2* to venous thrombosis, we do not expect sex to play a role in VT in the context of *SLC44A2* genotype status. However, until we can rule this out we find it prudent to include both groups. Furthermore, the reason we choose to continue with only one sex (female) and not pooled sexes is that it is well established (Alvarado et al *Thromb Res* 2011; Vanlangenvelde et al *Comp Med* 2005) that the biological response of males vs. females in murine models of VT is significantly different as demonstrated by several key factors including thrombus size, cytokine expression, blood cell counts, etc. Therefore, regardless of the characterization of *SLC44A2* in hemostasis between the sexes, we cannot justifiably group males and females together in the subsequent VT models, as the bi-distributional readouts may obscure true differences which may be due to the gene alone.

B. The animals

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

The animals used in these studies are *Mus musculus*, from a C57BL/6J background, containing either a deleted region (exon 3-10) of the *Slc44a2* gene (KO) or a wild type (WT) allele. They originate from the lab of [REDACTED] at the University of Michigan but have been bred at the LUMC for many generations. In addition, final studies may also employ mice lacking the *Slc44a2* gene only in specific cell types. These will be generated in two distinct ways. First, we will use bone marrow transplants from WT or *Slc44a2* deficient mice to either WT or *Slc44a2* KO mice to create mice lacking *SLC44A2* expression in either the stromal or hematopoietic compartments. Alternatively, we will also cross breed *Slc44a2* floxed mice, containing loxP sites on either side of exons 3-10, with mice expressing Cre-recombinase under the control of either the *Tie-2* or *LysM* promoter, resulting in mice lacking *SLC44A2* in endothelial cells or neutrophils, respectively. To control for genetic variation as much as possible, we will make use of matched litter mates, using WT, HET and KO siblings, generated from parents who are heterozygous for the KO allele. The mice will be included between ages of 8-14 weeks, which is the same age that will be

used in the experimental disease models described in appendices 3.4.4.3-4. We estimate that the characterization of these knockout animals from a haemostatic perspective will involve approximately 180-290 animals, based on the calculations below:

General characterization of global knockout animals:

3 genotypes (KO, HET, WT) x 10 (group size) x 2 sex (males and females) = approximately 60 animals

General characterization of cell specific knockout animals:

3 genotypes (KO, HET, WT) x 10 (group size) x 1 sex (female) = approximately 30 animals

If sex differences are found in the general characterization of global knockouts then we will also use approximately 30 males.

Training and set up of bone marrow transplantation procedure:

5 WT and 5 KO animals

General characterization of bone marrow transplant animals:

4 systems (WT, WT hemo/KO stromal, KO hemo/WT stromal, KO) x 2 transfer (donor, recipient) x 10 (group size) x 1 sex (female) = approximately 80 animals

If sex differences are found in the general characterization of global knockouts then we will also use approximately 80 males.

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:

Due to the complex nature of haemostasis, which involves several different biological systems including the circulatory, immune and digestive system, in addition to the physical interaction between flowing blood and the vessel wall, it cannot be accurately replicated *in vitro*. Thus an *in vivo* system, which includes interactions between all such factors, is essential in studying this process. In addition, the ability to target deletion in cellular compartments through bone marrow transplantation and cell specific knockout animals and continue to study the interaction between the different biological systems is a very unique tool that cannot be readily reproduced. However, once we have conducted the studies contained in this proposal, it is likely that we will be able to pinpoint the cellular players and signalling pathways that are central to this process, specifically in relation to SLC44A2, and we can then follow up using *in vitro* models with human tissues to confirm and therefore strengthen our conclusions.

Reduction:

In order to reduce the number of animals necessary, we have taken several steps and carefully considered all options. First, we are making use of littermates so as to reduce the chance of genetic variability. Second, we will also save most organs and materials from the mice and not only the tissues that are classically involved in haemostasis. In this way, if the data points to a novel finding and further analysis is needed in secondary organs, we will already have them and the need to include more animals may not be necessary. Lastly, based on power calculations and experience with these types of procedures, we have determined the optimal amount of animals to include in these studies so that a

significant difference between experimental conditions can be found (if one exists) and no repetition likely will be needed. We have also contemplated whether another experimental design can be used in order to minimize the requested numbers or the overall distress to the animals. However, as this is a characterization of the novel genetic *Slc44a2* mouse line from a haemostasis perspective, it is not possible if we do not collect blood and organs related to haemostasis.

Refinement:

Several practices are put in place in order to minimize any pain or discomfort for the animals during the proposed studies. Anaesthesia will be administered prior to the collection of materials, such that no pain will be felt during these procedures and for mice receiving bone marrow transplantation, anaesthesia will be administered prior to the irradiation of recipient mice . These studies will also be conducted by trained researchers with experience performing these specific techniques. We will closely monitor the reactions of the animals at all times and if we observe any discomfort associated with humane endpoints such as changes in behaviour (posture, grooming, activity) or pathophysical reactions (rapid breath, unusual heart rate, weight loss) we will end the experiment immediately. In addition, as the irradiation may weaken the animals, we will provide special housing conditions including longer nipples on the water bottles, which will contain antibiotics, as well as soft food to ease accessibility for eating and drinking.

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

The measures taken to minimize animal suffering, pain and fear in regards to the proposed studies include pre-treatment of the animals with the appropriate anaesthesia before irradiation or the collecting any blood or tissues to be used in the characterization of these knockout animals. There are no adverse effects on the environment resulting from these studies.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

Not applicable.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

All experimental animals will be anaesthetised prior to the collection of blood or tissues which will subsequently be used in the characterization of the global *Slc44a2* knockout mice. In regards to the characterization of animals after bone marrow transplantation, animals will be anaesthetised prior to the irradiation procedure and the collection of blood or tissues which will subsequently be used for characterization of the mice. Donor animals will be euthanized using carbon dioxide asphyxiation before the collection of bone marrow. These procedures are deemed optimal based on experience with such techniques within the department.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

A possible adverse effect that may result from this procedure is the sensation of pain and fear if the administration of the anaesthesia is somehow faulty before the start of the procedure. However, such an event would be very difficult to mistake, as symptoms of an effective administration are readily visible. Since these procedures will be performed by skilled researchers, with years of experience with mouse models, we do not expect that such a mistake would go unobserved and all mice will be determined to be thoroughly sedated before the onset of any technique. Adverse effects that may arise due to the bone marrow transplant procedure are either graft versus host disease or alternatively, host versus graft disease in which T-cells become reactive and attack the tissues of the host or graft, respectively. In addition, the effects of irradiation may also result in anaemia, immunosuppression, diarrhea and damage to the mucosal membranes.

Explain why these effects may emerge.

Such an effect may occur if the compounds that make up the anaesthetic regimen were improperly administered. In regards to adverse effects associated with bone marrow transplantation, this occurs when the MHC molecules are different between the host and donor mice.

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

In order to prevent incomplete anaesthetization of mice before the start of procedure, we will have experienced handlers present who can identify when the mouse is safely ready for blood collection. In order to minimize the chance of rejection of transplantation, we are using litter mates both as donor and recipient in mice that are backcrossed to C57BL/6 background for at least 6 generations. We expect the genetic variability to be very limited between such animals which will reduce the chance of mismatched MHC expression on the tissues. Animals will also be placed in special housing conditions (see section D, refinement) 3 weeks post irradiation in preparation for the adverse effects associated with the procedure.

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.

Criteria for humane endpoints during this part of the study include rapid breathing during the laparotomy of the mouse which may indicate an abnormal response to the anaesthesia. If this occurs, we will not proceed with puncture of the vena cava and euthanize the mouse immediately as opposed to after blood collection. Criteria for humane endpoints for bone marrow transplantation include behavioural changes in posture, grooming or activity levels in addition to pathophysiological reactions such as rapid breathing, weight loss greater than 15% or HBV activation following radiation.

Indicate the likely incidence.

We estimate a very low incidence (<5%) for general characterization and approximately 10% for bone marrow transplantations.

K. Classification of severity of procedures

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

The procedures for the general characterization of the knockout animals fall under the category of "non-recovery" as 100% of the animals will be euthanized after the procedure, which is performed entirely under general anaesthesia. With respect to bone marrow transplantation, 100% of the donor animals fall under the category of "non-recovery" since they will be euthanized before the bone marrow is isolated. Recipient animals may experience mild (90%) to moderate (10%) discomfort. Therefore, the mice will be given the appropriate anaesthesia and analgesia to minimize this as much as possible.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

Animals are killed and used amongst others for full pathological 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



Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 11600
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. [REDACTED]
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|---|
| 3.4.4.2 | Effect of SLC44A2 antibodies on haemostasis |

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.

Blood and tissue samples from several organs central to the process of haemostasis will be collected from animals injected with SLC44A2 targeting antibodies, originally isolated from human donors. This may include, but is not limited, to material such as blood, liver, lungs and venous tissue. Subsequently, these samples can be used to determine the effect that SLC44A2 antibodies have on haemostasis. Additionally, these studies will help to determine the appropriate amount of antibodies needed to study their contributions to venous thrombosis, as described in appendices 3.4.4.3-4. Using such procedures we will be able to measure differences in the capacity of the blood to coagulate and related cells to produce coagulation factors, in addition to measuring changes in the immunological profile. In this way we can begin to answer how SLC44A2 targeting antibodies affect both normal and pathological haemostasis.

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

Mice will receive an infusion of varying concentrations of anti-SLC44A2 antibodies purified from human serum, in volumes set forth by the directive Diehl et al 2001, to determine a sufficient amount which allows for the presence of antibodies 72 hours post administration, without causing an acute response in the mouse. In order to minimize unwanted side effects, we start with the lowest concentration first and then raise it incrementally until the antibodies can be detected back after 72 hours. We will also compare the efficacy of using two time points versus one, namely at either 72 hours or both 72 and 24 hours before collection for tissue analysis. The goal of this study is twofold: 1) to determine the effect of anti-SLC44A2 antibodies on haemostasis as well as 2) determine the amounts of antibody necessary to

have adequate coverage present at the time of thrombosis induction (appendices 3.4.4.3-4). We base these time points and the initial amounts that will be injected on established studies of a similar nature used to study the role of anti-phospholipid antibodies in venous thrombosis (Pierangeli et al. *Thromb. Haemost.* 1995).

Following 72 hours of the initial administration, the mice will receive general anaesthesia and the abdomen will be opened and blood will be collected directly from the vena cava into a syringe containing sodium citrate so as to preserve the sample. Blood must be collected directly from the vein in order to avoid contamination with factors that activate coagulation (i.e. tissue factor) as it will be used for testing exactly that at a later time. The amount of blood retrieved will be the maximal amount possible, therefore following collection, the diaphragm of the mouse will be punctured, euthanizing the mouse in a humane manner. After this point, several tissues will be collected and snap frozen. These can then be used to determine if mice exhibit any differences in haemostatic activity both at the mRNA and protein level.

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

Group size: To determine the number of animals necessary per group we based our POWER calculation on previous work carried out to characterize mice treated with autoantibodies in the context of venous thrombosis. To this end, we use the recorded values for tissue factor (TF) activity in which mice treated with a control IgG antibody had a mean value of TF activity of 149.0 pM/mg/ml and mice treated with an autoantibody a mean value of 402.5 pM/mg/ml with a SD of 165.2. Using POWER calculation (<http://biomath.info/power/ttest.htm>) with an alpha of 0.05 and a power 0.80 we determined the appropriate group size to be 8.

Sex consideration: As it is unknown whether sex will influence the effect of the *SLC44A2* targeting antibodies and their role in haemostasis, we will include both for this initial characterization study. If no significant interactions between gender and *SLC44A2* in aspects of hemostasis (thrombin generation, coagulation gene transcripts, etc.) are found then we will continue only with females for the remainder of the project involving antibodies as there is generally less biological variation such as size/weight between age matched mice. Our rationale for starting with both sexes is due to the well described findings that hormones can play a role in haemostasis (i.e. contraception & thrombotic events), but because no differences in gender were described in the initial GWAS study linking *SLC44A2* to venous thrombosis, we do not expect sex to play a role in VT in the context of *SLC44A2* genotype status. However, until we can rule this out we find it prudent to include both groups. Furthermore, the reason we choose to continue with only one sex (female) and not pooled sexes is that it is well established (Alvarado et al *Thromb Res* 2011; Vanlangenvelde et al *Comp Med* 2005) that the biological response of males vs. females in murine models of VT is significantly different as demonstrated by several key factors including thrombus size, cytokine expression, blood cell counts, etc. Therefore, regardless of the characterization of *SLC44A2* in hemostasis between the sexes, we cannot justifiably group males and females together in the subsequent VT models, as the bi-distributional readouts may obscure true differences which may be due to the antibodies alone.

B. The animals

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

The animals used in these studies are *Mus musculus*, from a C57BL/6J background, containing either a deleted region (exon 3-10) of the *Slc44a2* gene on both alleles (KO), one allele (HET) or both wild type alleles (WT). They originate from the lab of [REDACTED] at the University of Michigan but have been bred at the LUMC for many generations. To control for genetic variation as much as possible, we will make use of matched litter mates, using both WT, HET and KO siblings, generated from parents who are heterozygous for the KO allele. The mice will be included between ages of 8-14 weeks, which is the same age that will be used in the experimental disease models described in appendices 3.4.4.3-4. We estimate that the characterization of these knockout animals from a haemostatic perspective will involve approximately 64-384 animals, based on the calculation below:

Antibody titration:

1 genotype (WT) x 8 (group size) x 1 sex (female) x 2 injection timepoints (72, 72 & 24hr) x 4 concentrations = 64

If we can find a working dosage, then we will continue with multiple genotypes for characterization:

3 genotypes (WT, HET, KO) x 8 (group size) x 2 sex (male,female) x 2 injection timepoints (72, 72 & 24hr) x 4 concentrations = 384

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:

Due to the complex nature of haemostasis, which involves several different biological systems including the circulatory, immune and digestive system, as well as the physical interaction between flowing blood and the vessel wall, it cannot be accurately replicated *in vitro*. In addition, it is still unclear which cell type can be targeted by these SLC44A2 antibodies. Thus an *in vivo* system, which includes interactions between all such factors, is essential in studying this process. However, once we have conducted the studies contained in this proposal, it is likely that we will be able to pinpoint the cellular players and signalling pathways that are central to this process, specifically in relation to SLC44A2 antibodies, and we can then follow up using *in vitro* models with human tissues to confirm and therefore strengthen our conclusions.

Reduction:

In order to reduce the number of animals necessary, we have taken several steps and carefully considered all options. First, we are making use of a pilot study to determine the proper dosing of antibodies before going further in using mice with variable genotypes. Second, we will also save most organs and materials from the mice and not only the tissues that are classically involved in haemostasis. In this way, if the data points to a novel finding and further analysis is needed in secondary organs, we will already have them and the need to include more animals may not be necessary. Lastly, based on power calculations, we have determined the optimal amount of animals to include in these studies so that a significant difference between experimental conditions can be found (if one exists) and no repetition likely will be needed. We have also contemplated whether another experimental design can be used in order to minimize the requested numbers or the overall distress to the animals. However, the models available to study the effect of antibodies in haemostasis and thrombosis are few, and thus we have chosen the most established system in order to cover the aspects that may be involved in these processes.

Refinement:

Several practices are put in place in order to minimize any pain or discomfort for the animals during the proposed studies. To start, we will begin by testing the lower concentrations of antibodies first in order to minimize the possible discomfort. We will also follow the guidelines in regards to injections set forth by Diehl et al 2001. Anaesthesia will also be administered prior to the final collection of tissues, such so that no pain will be felt during these procedures. These studies will also be conducted by trained researchers with experience performing these specific techniques. As there may be some adverse reactions to these treatments, we will closely monitor the response of the animals at several time points and if we observe any discomfort associated with humane endpoints such as changes in behaviour (posture, grooming, activity) or pathophysical reactions (rapid breath, unusual heart rate, weight loss) we will end the experiment immediately.

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

on the environment.

The measures taken to minimize animal suffering, pain and fear in regards to the proposed studies include pre-treatment of the animals with the appropriate anaesthesia before collecting any blood or tissues to be used in the characterization of these animals. There are no adverse effects on the environment resulting from these studies.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

Not applicable.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

All experimental animals will be anaesthetised prior to the collection of blood or tissues which will subsequently be used for characterization of the mice. The procedures are deemed optimal based on several publications in which a similar approach was used in addition to in house experience with these techniques .

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

There is a chance that the animals may respond negatively to the infusion of SLC44A2 targeting antibodies by having an acute immune response, for example, the activation of neutrophils which may

cause vascular damage.

Explain why these effects may emerge.

These effects may emerge if SLC44A2 targeting antibodies have a strong pathological influence on the general haemostasis of mice (unknown).

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

We will start by using the lowest doses of antibody until a sufficient amount in the blood is reached and maintained for 72 hours. We will observe the animals every 2 hours over the first 12 hours and then every 12 hours until 72 hours post injection in order to detect any acute response to the antibodies that results in a distressful effect to the mice (humane endpoints), at which point, we will end the experiments immediately, as this is not the goal of this study. In an effort to avoid any unwanted discomfort for the animals, we will be using titers that have been established in literature and have not been reported to cause severe distress to mice.

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

X Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

Criteria for humane endpoints during this part of the study include behavioural changes in posture, grooming or activity levels in addition to pathophysical reactions such as rapid breathing or weight loss greater than 15% as determined by weighing the mice before the start of the experiment and following up at 24 and 48 hours post injection.

Indicate the likely incidence.

We estimate a very low 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').

Depending on the response of the animals to SLC44A2 antibodies, levels of discomfort may vary, however we estimate the severity to range from mild (90%) to moderate (10%). Because we cannot say for sure, we will monitor the animals closely every 2 hours over the first 12 hours and then every 12 hours until 72 hours post injection to ensure the minimal amount of distress as determined by the humane endpoints described above.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

Animals are killed and used amongst others for full pathological 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



Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	11600	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	[REDACTED]	
1.3 List the serial number and type of animal procedure. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number	Type of animal procedure
	3.4.4.3	Venous thrombosis through partial ligation of the caval vein

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.

Mice lacking SLC44A2 expression, either whole body, in certain cellular compartments (through bone marrow transplantation), cell type specific (endothelial cells or neutrophils) or in mice that have been transfused with SLC44A2 targeting antibodies, will undergo a partial ligation procedure in order to mimic the process of venous thrombosis (VT) *in vivo* and to dissect out the cell types and signalling pathways which link SLC44A2 to disease pathogenesis. Blood and tissue samples from several organs central to the process of VT will be collected at different time points in order to record changes during key stages of disease progression. This may include, but is not limited to, material such as blood, liver, lungs, thrombus and venous tissue. Subsequently, these samples can be used to determine the contributions of SLC44A2 to VT. Using such procedures we will be able to measure differences in the capacity of the blood to coagulate and related cells to produce coagulation factors, changes in the immunological profile as well as characterize changes in thrombus formation/clearance and fibrin deposition.

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

Following anaesthetization of the mice and the administration of analgesia, a midline laparotomy will be made and the small bowel exteriorized and placed to the left of the animal. The inferior vena cava (IVC or caval vein) is then exposed by careful blunt dissection while sterile saline is applied at regular intervals to the exteriorized bowel to prevent its desiccation. Non-reactive prolene suture is looped around the IVC immediately caudal to the origin of the renal veins, with a space holder included on the outside of the vessel. Next the ligature is closed and the space holder is removed to avoid complete vessel occlusion.

Side branches will not be ligated or manipulated and IVC blood flow will be reduced immediately after the restriction. Lastly, the median laparotomy is sutured and the mice will be placed on a warming mat until anaesthesia wears off. Mice will additionally receive peri-operative analgesia until collection at the 12, 24, 36 and 48hr designated time points. For the collection of blood and tissues, mice will receive a lethal dose of anaesthesia and subsequently several tissues will be collected, including the vena cava with the newly formed thrombus, and snap frozen. These can then be used to detect differences in expression levels of both mRNA and protein, as well as histological analysis of thrombus formation and fibrin deposition. The mice receiving anti-SLC44A2 antibodies will undergo all procedures described above in addition to receiving an infusion of antibodies prior to the surgery (appendix 3.4.4.2).

For the studies involving bone marrow transplantation, donor mice will be euthanized using standard techniques and bone marrow cells isolated and prepared for injection into the recipient mice. Bone marrow transplant recipients will begin receiving acidified, antibiotic water one week prior to the irradiation procedure. At least six hours before receiving the transplantation, they will be sub lethally irradiated at a dose suitable for their background (C57BL/6 mice). Following radiation, mice will receive a tail vein injection of the donor mouse bone marrow cells and subsequently housed for 21 days until the repopulation of hematopoietic cells is complete. At this point, the mice will then be ready to include in the ligation model described above.

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

Group size: The calculation of the experimental group size is based on the parameter 'thrombosis formation' (and not mRNA analysis) as this is the primary outcome and the parameter with the largest standard deviation. Previously, at 24 hours post thrombosis induction, we observed effects on thrombus size and weight ranging from 75% decrease up to 200% increase in size/weight as compared to control reference groups. Using these observations we can estimate that the control group has an average thrombi weight of 1g and a second group representing the knockout mice would have less thrombi, around .25g and a third group may have increased thrombi, up to double the weight of group 1, being 2g. As the readout will be comparing three groups, we will use a one way ANOVA test which will control for the type I error. Using the G*Power statistical software (<http://www.gpower.hhu.de/>) program to perform a POWER calculation with an alpha of 0.05 and a power of 0.80, we find the effect size f to be 0.55143 which would require a sample size of 36, signifying 12 animals per group. Because we want to rule out endothelial injury as a trigger for venous thrombosis, mice with bleedings or any injury of the IVC during surgery need to be excluded from further analysis. We therefore include an extra of 2 animals per group to compensate for animals displaying bleedings or any injury during the IVC during surgery. These 2 extra animals will only be included when necessary. For now we will use a maximum of 14 animals per experimental group.

Sex consideration: Unless we determine a clear link between the *Slc44a2* gene and sex in the initial characterization described in appendices 3.4.4.1-2, we will only use females for the following procedures. We opt for female over male since there is less biological variability in measures such as size and weight. Female mice can also be housed together even though they are not littermates (males cannot) which also helps to minimize any differences that may arise due to housing conditions. **Furthermore, the reason we choose to continue with only one sex (female) and not pooled sexes is that it is well established (Alvarado et al Thromb Res 2011; Vanlangenvelde et al Comp Med 2005) that the biological response of males vs. females in murine models of VT is significantly different as demonstrated by several key factors including thrombus size, cytokine expression, blood cell counts, etc. Therefore, regardless of the characterization of SLC44A2 in hemostasis between the sexes, we cannot justifiably group males and females together in the subsequent VT models, as the bi-distributional readouts may obscure true differences which may be due to the gene or antibodies alone.**

B. The animals

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

The initial studies will include *Mus musculus* from a C57BL/6J background, containing either a deleted region (exon 3-10) of the *Slc44a2* gene on both alleles (KO), one allele (HET) or both wild type alleles (WT), globally in all tissues of the animal. They originate from the lab of ██████████ at the University of Michigan but have been bred at the LUMC for many generations. In addition, the final studies will employ mice lacking the *Slc44a2* gene only in specific cell types. They will be generated by cross

breeding *Slc44a2* floxed mice, containing loxP sites on either side of exons 3-10, with mice expressing Cre-recombinase under the control of either the *Tie-2* or *LysM* promoter, resulting in mice lacking SLC44A2 in endothelial cells or neutrophils, respectively. To control for genetic variation as much as possible, we will make use of matched litter mate siblings, generated from parents who are heterozygous for the KO allele. The mice will be included between ages of 8-14 weeks. We estimate that the maximal number of animals needed to complete all aspects of the studies included in this proposal regarding IVC ligation to be approximately 1008. If the response of mice in appendices 3.4.4.1-2 is determined to be dependent on sex (unlikely), then we will also include 1008 males.

Training and set up of procedure:
10 WT animals

IVC ligation-induced thrombosis with global knockout animals:
3 genotypes (WT, HET, KO) x 14 group size x 1 sex (female) x 4 timepoints (12, 24, 36, 48hr) = 168 animals

IVC ligation-induced thrombosis with anti-SLC44A2 antibodies:
3 genotypes (WT, HET, KO) x 14 group size x 1 sex (female) x 4 timepoints (12, 24, 36, 48hr) = 168 animals

IVC ligation-induced thrombosis with cell specific knockout animals:
2 genotypes (WT or KO) x 2 cell type (endothelial or neutrophil) x 14 group size x 1 sex (female) x 4 timepoints (12, 24, 36, 48hr) = 224 animals

IVC ligation-induced thrombosis with bone marrow transplantation :
4 systems (WT, WT hemo/KO stromal, KO hemo/WT stromal, KO) x 2 (donor, recipient) x 14 group size x 1 sex (female) x 4 timepoints (12, 24, 36, 48hr) = 448 animals

In the case that we receive a request from reviewers to repeat the IVC ligation procedure with a minor addition such as a therapeutic compound, neutralizing antibody or additional stimuli etc., we estimate that we would need approximately 168 additional animals, based on the calculations above. These animals will be used only if specifically requested by an editor/reviewer in order to increase the chances of a successful publication which would ensure the dissemination of these data within the scientific community.

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: Due to the complex nature of VT, which involves several different biological systems including the circulatory, immune and digestive system, as well as the physical interaction between flowing blood and the vessel wall, it cannot be accurately replicated *in vitro*. Thus an *in vivo* system, which includes interactions between all such factors shortly after the induction of injury and thrombi formation, is essential in studying this process. In addition, the ability to isolate the actual thrombi for analysis will provide critical clues as to the mechanism driving pathogenesis. However, once we have conducted the studies contained in this proposal, it is likely that we will be able to pinpoint the cellular players and signalling pathways that are central to this process, specifically in relation to SLC44A2, and

we can then follow up using *in vitro* models with human tissues to confirm and therefore strengthen our conclusions.

Reduction:

In order to reduce the number of animals necessary, we have taken several steps and carefully considered all options. First, we are making use of littermates so as to reduce the chance of genetic variability. Second, we will save most organs and materials from the mice and not only the tissues that are classically involved in haemostasis. In this way, if the data points to a novel finding and further analysis is needed in secondary organs, we will already have them and the need to include more animals may not be necessary. Lastly, based on power calculations and experience with these types of procedures, we have determined the optimal amount of animals to include in these studies so that a significant difference between experimental conditions can be found (if one exists) and no repetition will likely be needed. Additionally, we plan to only use females so as to reduce the number of mice included. We have also contemplated as to whether another experimental design can be used in order to minimize the requested numbers or the overall distress to the animals. However, the model proposed in this study is one of the best available in the field to study venous thrombosis and when combined with the secondary model of spontaneous induced thrombosis (appendix 3.4.4.4), we believe it will cover all aspects that may be key in VT pathogenesis.

Refinement:

Several practices are put in place in order to minimize any pain or discomfort for the animals during the proposed studies. Anaesthesia will be administered prior to the surgery as well as before the final collection of tissues, so that no pain will be felt during these procedures and for mice receiving bone marrow transplantation, anaesthesia will be administered prior to the irradiation of recipient mice. In addition, to minimize any post-operative discomfort, analgesia will also be given peri-operatively and up until the time of collection. These studies will also be conducted by trained researchers with experience performing these specific techniques. As there may be complications related to the surgery, we will closely monitor the response of the animals at several time points and if we observe any discomfort associated with humane endpoints such as changes in behaviour (posture, grooming, activity) or pathophysical reactions (rapid breath, unusual heart rate, weight loss) we will end the experiment immediately. In addition, as the irradiation may weaken the animals, we will provide special housing conditions including longer nipples on the water bottles, which will contain antibiotics, as well as soft food to ease accessibility for eating and drinking.

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

The measures taken to minimize animal suffering, pain and fear in regards to the proposed studies include pre-treatment of the animals with the appropriate anaesthesia before surgery or collection of tissues in addition to peri-operative treatment with analgesia. There are no adverse effects on the environment resulting from these studies.

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

X 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.

All experimental animals will be anaesthetised prior to surgery, irradiation or the collection of blood or tissues which will subsequently be used for characterization of the mice. **Donor animals will be euthanized using carbon dioxide asphyxiation before the collection of bone marrow.** In addition, mice will receive analgesia peri-operatively up until the time of sacrifice. The procedures are deemed optimal based on in house experience with these techniques.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Possible adverse effects that may occur during these procedures include bleeding during the IVC surgery or infections after the surgery. Adverse effects that may arise due to the bone marrow transplant procedure are either graft versus host disease or alternatively, host versus graft disease in which T-cells become reactive and attack the tissues of the host or graft, respectively. In addition, the effects of irradiation may also result in anaemia, immunosuppression, diarrhea and damage to the mucosal membranes.

Explain why these effects may emerge.

These effects may emerge if there is an accidental puncture of vasculature tissue or the surgical environment is not completely aseptic. In regards to adverse effects associated with bone marrow transplantation, this occurs when the MHC molecules are different between the host and donor mice.

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

In order to minimize surgical errors during, we have included a number of animals in order to refine our techniques before the final studies begin. To minimize the chance of infection, we plan to follow established protocols to ensure the surgery is aseptic as possible. In order to minimize the chance of rejection of transplantation, we are using litter mates both as donor and recipient in mice that are backcrossed to C57BL/6 background several generations. We expect the genetic variability to be very limited between such animals which will reduce the chance of mismatched MHC expression on the tissues. Animals will also be placed in special housing conditions (see section D, refinement) 3 weeks post irradiation in preparation for the adverse effects associated with the procedure.

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

X Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

Criteria for humane endpoints during this part of the study include behavioural changes in posture, grooming or activity levels in addition to pathophysical reactions such as rapid breathing, weight loss greater than 15% or HBV activation following radiation.

Indicate the likely incidence.

We estimate the incidence to be approximately 15% for IVC ligation alone and approximately 10% for bone marrow transplantations.

K. Classification of severity of procedures

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

The levels of discomfort are moderate **for all animals (100%)** due to the inclusion of a surgery which involves suturing the abdomen of the mice. In addition, the possibility for a thrombosis formation may also cause discomfort, especially if there is a rapid onset, and is considered to cause moderate discomfort. With respect to bone marrow transplantation, **100% of donor animals fall under the category of "non-recovery" since they will be euthanized before the bone marrow is isolated.** Recipient animals will undergo surgery and will therefore experience moderate discomfort **(100%)**. The mice will be given the appropriate anaesthesia and analgesia to minimize this as much as possible.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

Animals are killed and used amongst others for full pathological 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



Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 11600
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. [REDACTED]
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|---|
| 3.4.4.4 | Spontaneous venous thrombosis through siRNA |

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.

Mice lacking SLC44A2 expression, either whole body, in certain cellular compartments (through bone marrow transplantation) or cell type specific (endothelial cells or neutrophils), in addition to mice that have been transfused with SLC44A2 targeting antibodies, will receive an injection of siRNA targeting pro-coagulation proteins (antithrombin and protein C), which will induce formation of spontaneous venous thrombosis (VT). This will help to further determine the role of SLC44A2 in the pathogenesis of VT and overcome the limitations of the partial ligation model (appendix 3.4.4.3), namely the retrograde formation of thrombi and overestimation of the involvement of the immune system, as it is a major surgery. Blood and tissue samples from several organs central to the process of VT will be collected at different time points in order to record changes during key stages of disease progression. This may include, but is not limited to, material such as blood, liver, lungs, thrombus and venous tissue. Subsequently, these samples can be used to determine the contributions of SLC44A2 to VT. Using such procedures we will be able to measure differences in the capacity of the blood to coagulate and related cells to produce coagulation factors, changes in the immunological profile as well as characterize changes in thrombus formation/clearance and fibrin deposition in the liver.

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

The mice will receive an injection of solution containing siRNA lipidoids (based on the volumes set forth by the directive Diehl et al 2001) into the tail vein. After 36 hours, the mice will begin to receive analgesia and will be monitored regularly for signs of discomfort up until the time of sacrifice. Collection of the mice will occur at 24, 48 and 72 hours post injection. These time points are chosen in order to

observe the stages of VT propagation such as onset/initiation and progression. At these stages, mice are anesthetized and a midline laparotomy will be made. For the collection of blood, it will be taken directly from the vena cava into a syringe containing sodium citrate so as to preserve the sample. Blood must be collected directly from the vein in order to avoid contamination with factors that activate coagulation (i.e. tissue factor) as it will be used for testing exactly that at a later time. The amount of blood retrieved will be the maximal amount possible, therefore following collection, the diaphragm of the mouse will be punctured, euthanizing the mouse in a humane manner. After this point, several tissues will be collected and snap frozen, including the head which will contain the newly formed thrombus. These can then be used to detect differences both at the mRNA and protein level in addition to histological analysis which can be used to characterize changes in the thrombi as well as fibrin deposition. For the studies that involve antibody treatment, the mice will undergo the relevant procedures (detailed in appendices 3.4.4.2 or 3.4.4.5) prior to the injection of siRNA.

For the studies involving bone marrow transplantation, donor mice will be euthanized using carbon dioxide asphyxiation and bone marrow cells from femur, tibias and humerus bones will be isolated and prepared for injection into the recipient mice. Bone marrow transplant recipients will begin receiving acidified, antibiotic water one week prior to the irradiation procedure. At least six hours before receiving the transplantation, they will be sub lethally irradiated at a dose suitable for their background (C57BL/6 mice). Following radiation, mice will receive a tail vein injection of the donor mouse bone marrow cells and subsequently housed for 21 days until the repopulation of hematopoietic cells is complete. At this point, the mice will then be ready to include in the spontaneous siRNA model described above.

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

Group size: For the calculation of experimental group size we will use the parameter 'development of clinical phenotype' (and not a parameters like liver fibrin deposition), as this is the typical hallmark of the spontaneous thrombosis model and almost always coincides with the presence of thrombi in the large veins of the heads. Previously, 48 hours after siRNA injection, we observed effects of onset and incidence of the clinical phenotype ranging from 1. nearly full absence of phenotype as compared to siRNA injected control animals) to 2. accelerated onset for nearly all animals of a given condition as compared to siRNA injected control animals (factor XII inhibition, presence of Factor V Leiden). Typical group size in these experiments was 10 animals per group. Using Fisher's exact based POWER calculations, statistically significant changes are detected when in one group 8 out of 10 animals follow the black and white response which is the display of visible symptoms of the spontaneous thrombotic phenotype, while in the reference group 8 out of 10 do not respond and remain fully normal (resulting in $P=0.023$ (2-tail)). <http://www.langsrud.com/stat/fisher.htm>. Subsequently, these numbers ($n=10$) also allow to detect statistically significant changes in liver fibrin deposition (using non-parametric Mann Witney tests) and allow to describe biologically relevant changes in thrombus incidence (Fisher's exact tests), severity, structure and cellular composition.

Sex consideration: Unless we determine a clear link between the *Slc44a2* gene and sex in the initial characterization described in appendices 3.4.4.1-2, we will only use females for the following procedures. We opt for female over male since there is less biological variability in measures such as size and weight. This is particularly relevant for this model as we will inject the same amount of siRNA per mice so they must be as closely weight matched as possible. Female mice can also be housed together even though they are not littermates (males cannot) which also helps to minimize any differences that may arise due to housing conditions. Furthermore, the reason we choose to continue with only one sex (female) and not pooled sexes is that it is well established (Alvarado et al Thromb Res 2011; Vanlangenvelde et al Comp Med 2005) that the biological response of males vs. females in murine models of VT is significantly different as demonstrated by several key factors including thrombus size, cytokine expression, blood cell counts, etc. Therefore, regardless of the characterization of SLC44A2 in hemostasis between the sexes, we cannot justifiably group males and females together in the subsequent VT models, as the bi-distributional readouts may obscure true differences which may be due to the gene alone.

B. The animals

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

The initial studies will include *Mus musculus* from a C57BL/6J background, containing either a deleted region (exon 3-10) of the *Slc44a2* gene on both alleles (KO), one allele (HET) or both wild type alleles (WT), globally in all tissues of the animal. They originate from the lab of [REDACTED] at the University of Michigan but have been bred at the LUMC for many generations. In addition, the final studies will

employ mice lacking the *Slc44a2* gene only in specific cell types. They will be generated by cross breeding *Slc44a2* floxed mice, containing loxP sites on either side of exons 3-10, with mice expressing Cre-recombinase under the control of either the *Tie-2* or *LysM* promoter, resulting in mice lacking SLC44A2 in endothelial cells or neutrophils, respectively. To control for genetic variation as much as possible, we will make use of matched litter mate siblings, generated from parents who are heterozygous for the KO allele. The mice will be included between ages of 8-14 weeks. We estimate that the maximal number of animals needed to complete all aspects of the studies included in this proposal regarding siRNA spontaneous induced thrombosis to be approximately 540. If the response of mice in appendices 3.4.4.1-2 is determined to be dependent on sex (unlikely), then we will also include 540 males.

Training and set up of procedure:

10 WT animals

siRNA spontaneous induction of thrombosis in global knockout animals:

3 genotypes (WT, HET, KO) x 10 group size x 1 sex (female) x 3 timepoints (24, 48, 72hr) = 90 animals

siRNA spontaneous induction of thrombosis with anti-SLC44A2 antibodies:

3 genotypes (WT, HET, KO) x 10 group size x 1 sex (female) x 3 timepoints (24, 48, 72hr) = 90 animals

siRNA spontaneous induction of thrombosis in cell specific knockout animals:

2 genotypes (WT or KO) x 2 cell type (endothelial or neutrophil) x 10 group size x 1 sex (female) x 3 timepoints (24, 48, 72hr) = 120 animals

siRNA spontaneous induction of thrombosis in bone marrow transplantation animals:

4 systems (WT, WT hemo/KO stromal, KO hemo/WT stromal, KO) x 2 (donor, recipient) x 10 group size x 1 sex (female) x 3 timepoints (24, 48, 72hr) = 240 animals

In the case that we receive a request from reviewers to repeat the siRNA spontaneous induction of thrombosis procedure with a minor addition such as a therapeutic compound, neutralizing antibody or additional stimuli etc., we estimate that we would need approximately 90 additional animals, based on the calculations above. These animals will be used only if specifically requested by an editor/reviewer in order to increase the chances of a successful publication which would ensure the dissemination of these data within the scientific community.

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: Due to the complex nature of VT, which involves several different biological systems including the circulatory, immune and digestive system, as well as the physical interaction between flowing blood and the vessel wall, it cannot be accurately replicated *in vitro*. Thus an *in vivo* system, which includes interactions between all such factors, especially with spontaneous formation of thrombi, is essential in studying this process. In addition, the ability to isolate the actual thrombi for analysis will provide critical clues as to the mechanism driving pathogenesis. However, once we have conducted the studies contained in this proposal, it is likely that we will be able to pinpoint the cellular players and signalling pathways that are central to this process, specifically in relation to SLC44A2, and we can then follow up using *in vitro* models with human tissues to confirm and therefore strengthen our conclusions.

Reduction:

In order to reduce the number of animals necessary, we have taken several steps and carefully considered all options. First, we are making use of littermates so as to reduce the chance of genetic variability. Second, we will save most organs and materials from the mice and not only the tissues that are classically involved in haemostasis. In this way, if the data points to a novel finding and further analysis is needed in secondary organs, we will already have them and the need to include more animals may not be necessary. Lastly, based on power calculations and experience with these types of procedures, we have determined the optimal amount of animals to include in these studies so that a significant difference between experimental conditions can be found (if one exists) and no repetition will likely be needed. Additionally, we plan to only use females so as to reduce the number of mice included. We have also contemplated as to whether another experimental design can be used in order to minimize the requested numbers or the overall distress to the animals. However, we believe that the two models proposed in this study (also appendix 3.4.4.3), used in combination, are the best strategy to research venous thrombosis and cover all aspects that may be key in VT pathogenesis.

Refinement:

Several practices are put in place in order to minimize any pain or discomfort for the animals during the proposed studies. Anaesthesia will be administered prior to the final collection of tissues, so that no pain will be felt during these procedures and for mice receiving bone marrow transplantation, anaesthesia will be administered prior to the irradiation of recipient mice. We also follow the guidelines set forth in the directive Diehl et al 2001 when determining the appropriate injection volumes. In addition, to minimize any discomfort that may arise due to the induction of VT, analgesia will also be given 36 hours post-injection and up until the time of collection, we do not expect full thrombi formation to occur before 36 hours. These studies will also be conducted by trained researchers with experience performing these specific techniques. We also plan to closely monitor the response of the animals at several time points after the injection and if we observe any discomfort associated with humane endpoints such as changes in behaviour (posture, grooming, activity) or pathophysiological reactions (rapid breath, unusual heart rate, weight loss) we will end the experiment immediately. In addition, as the irradiation may weaken the animals, we will provide special housing conditions including longer nipples on the water bottles, which will contain antibiotics, as well as soft food to ease accessibility for eating and drinking.

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

The measures taken to minimize animal suffering, pain and fear in regards to the proposed studies include follow up treatment with analgesia continuously until sacrifice in addition to pre-treatment of the animals with the appropriate anaesthesia before collection of tissues. There are no adverse effects on the environment resulting from these studies.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

Not applicable.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

All experimental animals will be anaesthetised prior to irradiation and the collection of blood or tissues which will subsequently be used for characterization of the mice. **Donor animals will be euthanized using carbon dioxide asphyxiation before the collection of bone marrow.** Mice will also begin to receive analgesia 36 hours post-injection and continuously up until the point of sacrifice. These procedures are deemed optimal based on experience with such techniques within the department.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

As we do not fully know the extent to which SLC44A2 is contributing to VT, it is possible that it plays a role in anticoagulation, in which case, the onset of the thrombus formation in knockout mice may be accelerated. This would result in visible symptoms including exophthalmos, peri-ocular haemorrhages or edema in the mandibular region or possibly death prior to the planned time points. Adverse effects that may arise due to the bone marrow transplant procedure are either graft versus host disease or alternatively, host versus graft disease in which T-cells become reactive and attack the tissues of the host or graft, respectively. In addition, the effects of irradiation may also result in anaemia, immunosuppression, diarrhea and damage to the mucosal membranes.

Explain why these effects may emerge.

These effects emerge as anticoagulation proteins are lowered and may be accelerated in the case that SLC44A2 plays a role in VT. In regards to adverse effects associated with bone marrow transplantation, this occurs when the MHC molecules are different between the host and donor mice.

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

We are prepared for such an outcome and have planned to minimize the severity of such an event by administering analgesia after the injection of siRNAs in case of discomfort from bleeding, in addition to regular monitoring of the mice for any signs of severe discomfort associated with humane endpoints. In order to minimize the chance of rejection of transplantation, we are using litter mates both as donor and recipient in mice that are backcrossed to C57BL/6 background several generations. We expect the genetic variability to be very limited between such animals which will reduce the chance of mismatched MHC expression on the tissues. Animals will also be placed in special housing conditions (see section D, refinement) 3 weeks post irradiation in preparation for the adverse effects associated with the procedure.

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane

endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

X Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

Criteria for humane endpoints during this part of the study include behavioural changes in posture, grooming or activity levels in addition to pathophysical reactions such as rapid breathing, weight loss greater than 15% compared to starting weight prior to injection, exophthalmos, peri-ocular haemorrhages or edema in the mandibular region indicating a possible venous rupture in the head. Additionally for mice with bone marrow transplant, HBV activation following radiation.

Indicate the likely incidence.

The incidence can range anywhere from 20% to 80% depending on the importance of SLC44A2 in the propagation of thrombosis, which is currently unknown. In the case that SLC44A2 does not play a role in VT we expect to see approximately 80% incidence as this is generally what we expect to observe in the control group. Similarly, if it exacerbates the VT phenotype, we expect to observe similar occurrence (80%), only at an earlier time point which is why we include several observation points after injection. If the loss of SLC44A2 has a protective role then we expect to observe incidence of approximately 20%. At the onset of any sign of exophthalmos, peri-ocular haemorrhages or edema in the mandibular region, the animal will be euthanized immediately.

K. Classification of severity of procedures

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

The injection of siRNAs targeting anticoagulation proteins will result in the formation of large thrombi in large veins of the head of the mouse which may result in intra/periocular haemorrhages. Based on these known outcomes, the procedures are deemed to include moderate discomfort **for 100% of the animals** and will thus include the proper analgesia to prevent the discomfort as much as possible. With respect to bone marrow transplantation, **100% of the donor animals** fall under the category of "non-recovery" **since they will be euthanized before the bone marrow is isolated**. Recipient animals will undergo the siRNA model and will therefore experience moderate discomfort (**100%**). The mice will be given the appropriate anaesthesia and analgesia to minimize this as much as possible.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

Animals are killed and used amongst others for full pathological 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

Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 11600
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. [REDACTED]
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|--|
| 3.4.4.3 | Venous thrombosis through partial ligation of the caval vein |
- 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.

Mice lacking SLC44A2 expression, either whole body, in certain cellular compartments (through bone marrow transplantation), cell type specific (endothelial cells or neutrophils) or in mice that have been transfused with SLC44A2 targeting antibodies, will undergo a partial ligation procedure in order to mimic the process of venous thrombosis (VT) *in vivo* and to dissect out the cell types and signalling pathways which link SLC44A2 to disease pathogenesis. Blood and tissue samples from several organs central to the process of VT will be collected at different time points in order to record changes during key stages of disease progression. This may include, but is not limited to, material such as blood, liver, lungs, thrombus and venous tissue. Subsequently, these samples can be used to determine the contributions of SLC44A2 to VT. Using such procedures we will be able to measure differences in the capacity of the blood to coagulate and related cells to produce coagulation factors, changes in the immunological profile as well as characterize changes in thrombus formation/clearance and fibrin deposition.

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

Following anaesthetization of the mice and the administration of analgesia, a midline laparotomy will be made and the small bowel exteriorized and placed to the left of the animal. The inferior vena cava (IVC or caval vein) is then exposed by careful blunt dissection while sterile saline is applied at regular intervals to the exteriorized bowel to prevent its desiccation. Non-reactive prolene suture is looped around the IVC immediately caudal to the origin of the renal veins, with a space holder included on the outside of the vessel. Next the ligature is closed and the space holder is removed to avoid complete vessel occlusion.

Side branches will not be ligated or manipulated and IVC blood flow will be reduced immediately after the restriction. Lastly, the median laparotomy is sutured and the mice will be placed on a warming mat until anaesthesia wears off. Mice will additionally receive peri-operative analgesia until collection at the 12, 24, 36 and 48hr designated time points. For the collection of blood and tissues, mice will receive a lethal dose of anaesthesia and subsequently several tissues will be collected, including the vena cava with the newly formed thrombus, and snap frozen. These can then be used to detect differences in expression levels of both mRNA and protein, as well as histological analysis of thrombus formation and fibrin deposition. The mice receiving anti-SLC44A2 antibodies will undergo all procedures described above in addition to receiving an infusion of antibodies prior to the surgery (appendix 3.4.4.2).

For the studies involving bone marrow transplantation, donor mice will be euthanized using standard techniques and bone marrow cells isolated and prepared for injection into the recipient mice. Bone marrow transplant recipients will begin receiving acidified, antibiotic water one week prior to the irradiation procedure. At least six hours before receiving the transplantation, they will be sub lethally irradiated at a dose suitable for their background (C57BL/6 mice). Following radiation, mice will receive a tail vein injection of the donor mouse bone marrow cells and subsequently housed for 21 days until the repopulation of hematopoietic cells is complete. At this point, the mice will then be ready to include in the ligation model described above.

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

Group size: The calculation of the experimental group size is based on the parameter 'thrombosis formation' (and not mRNA analysis) as this is the primary outcome and the parameter with the largest standard deviation. Previously, at 24 hours post thrombosis induction, we observed effects on thrombus size and weight ranging from 75% decrease up to 200% increase in size/weight as compared to control reference groups. Using these observations we can estimate that the control group has an average thrombi weight of 1g and a second group representing the knockout mice would have less thrombi, around .25g and a third group may have increased thrombi, up to double the weight of group 1, being 2g. As the readout will be comparing three groups, we will use a one way ANOVA test which will control for the type I error. Using the G*Power statistical software (<http://www.gpower.hhu.de/>) program to perform a POWER calculation with an alpha of 0.05 and a power of 0.80, we find the effect size f to be 0.55143 which would require a sample size of 36, signifying 12 animals per group. Because we want to rule out endothelial injury as a trigger for venous thrombosis, mice with bleedings or any injury of the IVC during surgery need to be excluded from further analysis. We therefore include an extra of 2 animals per group to compensate for animals displaying bleedings or any injury during the IVC during surgery. These 2 extra animals will only be included when necessary. For now we will use a maximum of 14 animals per experimental group.

Sex consideration: Unless we determine a clear link between the *Slc44a2* gene and sex in the initial characterization described in appendices 3.4.4.1-2, we will only use females for the following procedures. We opt for female over male since there is less biological variability in measures such as size and weight. Female mice can also be housed together even though they are not littermates (males cannot) which also helps to minimize any differences that may arise due to housing conditions. Furthermore, the reason we choose to continue with only one sex (female) and not pooled sexes is that it is well established (Alvarado et al Thromb Res 2011; Vanlangenvelde et al Comp Med 2005) that the biological response of males vs. females in murine models of VT is significantly different as demonstrated by several key factors including thrombus size, cytokine expression, blood cell counts, etc. Therefore, regardless of the characterization of SLC44A2 in hemostasis between the sexes, we cannot justifiably group males and females together in the subsequent VT models, as the bi-distributional readouts may obscure true differences which may be due to the gene or antibodies alone.

B. The animals

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

The initial studies will include *Mus musculus* from a C57BL/6J background, containing either a deleted region (exon 3-10) of the *Slc44a2* gene on both alleles (KO), one allele (HET) or both wild type alleles (WT), globally in all tissues of the animal. They originate from the lab of ██████████ at the University of Michigan but have been bred at the LUMC for many generations. In addition, the final studies will employ mice lacking the *Slc44a2* gene only in specific cell types. They will be generated by cross

breeding *Slc44a2* floxed mice, containing loxP sites on either side of exons 3-10, with mice expressing Cre-recombinase under the control of either the *Tie-2* or *LysM* promoter, resulting in mice lacking SLC44A2 in endothelial cells or neutrophils, respectively. To control for genetic variation as much as possible, we will make use of matched litter mate siblings, generated from parents who are heterozygous for the KO allele. The mice will be included between ages of 8-14 weeks. We estimate that the number of animals needed to complete all aspects of the studies included in this proposal regarding IVC ligation to be approximately 1008 (no sex response in appendices 3.4.4.1-2) to 2016 (yes sex response in appendices 3.4.4.1-2).

Training and set up of procedure:
10 WT animals

IVC ligation-induced thrombosis with global knockout animals:
3 genotypes (WT, HET, KO) x 14 group size x 1 sex (female) x 4 timepoints (12, 24, 36, 48hr) = 168 animals

IVC ligation-induced thrombosis with anti-SLC44A2 antibodies:
3 genotypes (WT, HET, KO) x 14 group size x 1 sex (female) x 4 timepoints (12, 24, 36, 48hr) = 168 animals

IVC ligation-induced thrombosis with cell specific knockout animals:
2 genotypes (WT or KO) x 2 cell type (endothelial or neutrophil) x 14 group size x 1 sex (female) x 4 timepoints (12, 24, 36, 48hr) = 224 animals

IVC ligation-induced thrombosis with bone marrow transplantation :
4 systems (WT, WT hemo/KO stromal, KO hemo/WT stromal, KO) x 2 (donor, recipient) x 14 group size x 1 sex (female) x 4 timepoints (12, 24, 36, 48hr) = 448 animals

In the case that we receive a request from reviewers to repeat the IVC ligation procedure with a minor addition such as a therapeutic compound, neutralizing antibody or additional stimuli etc., we estimate that we would need approximately 168 additional animals, based on the calculations above. These animals will be used only if specifically requested by an editor/reviewer in order to increase the chances of a successful publication which would ensure the dissemination of these data within the scientific community.

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: Due to the complex nature of VT, which involves several different biological systems including the circulatory, immune and digestive system, as well as the physical interaction between flowing blood and the vessel wall, it cannot be accurately replicated *in vitro*. Thus an *in vivo* system, which includes interactions between all such factors shortly after the induction of injury and thrombi formation, is essential in studying this process. In addition, the ability to isolate the actual thrombi for analysis will provide critical clues as to the mechanism driving pathogenesis. However, once we have conducted the studies contained in this proposal, it is likely that we will be able to pinpoint the cellular players and signalling pathways that are central to this process, specifically in relation to SLC44A2, and

we can then follow up using *in vitro* models with human tissues to confirm and therefore strengthen our conclusions.

Reduction:

In order to reduce the number of animals necessary, we have taken several steps and carefully considered all options. First, we are making use of littermates so as to reduce the chance of genetic variability. Second, we will save most organs and materials from the mice and not only the tissues that are classically involved in haemostasis. In this way, if the data points to a novel finding and further analysis is needed in secondary organs, we will already have them and the need to include more animals may not be necessary. Lastly, based on power calculations and experience with these types of procedures, we have determined the optimal amount of animals to include in these studies so that a significant difference between experimental conditions can be found (if one exists) and no repetition will likely be needed. Additionally, we plan to only use females so as to reduce the number of mice included. We have also contemplated as to whether another experimental design can be used in order to minimize the requested numbers or the overall distress to the animals. However, the model proposed in this study is one of the best available in the field to study venous thrombosis and when combined with the secondary model of spontaneous induced thrombosis (appendix 3.4.4.4), we believe it will cover all aspects that may be key in VT pathogenesis.

Refinement:

Several practices are put in place in order to minimize any pain or discomfort for the animals during the proposed studies. Anaesthesia will be administered prior to the surgery as well as before the final collection of tissues, so that no pain will be felt during these procedures and for mice receiving bone marrow transplantation, anaesthesia will be administered prior to the irradiation of recipient mice. In addition, to minimize any post-operative discomfort, analgesia will also be given peri-operatively and up until the time of collection. These studies will also be conducted by trained researchers with experience performing these specific techniques. As there may be complications related to the surgery, we will closely monitor the response of the animals at several time points and if we observe any discomfort associated with humane endpoints such as changes in behaviour (posture, grooming, activity) or pathophysiological reactions (rapid breath, unusual heart rate, weight loss) we will end the experiment immediately. In addition, as the irradiation may weaken the animals, we will provide special housing conditions including longer nipples on the water bottles, which will contain antibiotics, as well as soft food to ease accessibility for eating and drinking.

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

The measures taken to minimize animal suffering, pain and fear in regards to the proposed studies include pre-treatment of the animals with the appropriate anaesthesia before surgery or collection of tissues in addition to peri-operative treatment with analgesia. There are no adverse effects on the environment resulting from these studies.

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

X 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.

All experimental animals will be anaesthetised prior to surgery, irradiation or the collection of blood or tissues which will subsequently be used for characterization of the mice. Donor animals will be euthanized using carbon dioxide asphyxiation before the collection of bone marrow. In addition, mice will receive analgesia peri-operatively up until the time of sacrifice. The procedures are deemed optimal based on in house experience with these techniques.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Possible adverse effects that may occur during these procedures include bleeding during the IVC surgery or infections after the surgery. Adverse effects that may arise due to the bone marrow transplant procedure are either graft versus host disease or alternatively, host versus graft disease in which T-cells become reactive and attack the tissues of the host or graft, respectively. In addition, the effects of irradiation may also result in anaemia, immunosuppression, diarrhea and damage to the mucosal membranes.

Explain why these effects may emerge.

These effects may emerge if there is an accidental puncture of vasculature tissue or the surgical environment is not completely aseptic. In regards to adverse effects associated with bone marrow transplantation, this occurs when the MHC molecules are different between the host and donor mice.

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

In order to minimize surgical errors during, we have included a number of animals in order to refine our techniques before the final studies begin. To minimize the chance of infection, we plan to follow established protocols to ensure the surgery is aseptic as possible. In order to minimize the chance of rejection of transplantation, we are using litter mates both as donor and recipient in mice that are backcrossed to C57BL/6 background several generations. We expect the genetic variability to be very limited between such animals which will reduce the chance of mismatched MHC expression on the tissues. Animals will also be placed in special housing conditions (see section D, refinement) 3 weeks post irradiation in preparation for the adverse effects associated with the procedure.

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

X Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

Criteria for humane endpoints during this part of the study include behavioural changes in posture, grooming or activity levels in addition to pathophysical reactions such as rapid breathing, weight loss greater than 15% or HBV activation following radiation.

Indicate the likely incidence.

We estimate the incidence to be approximately 15% for IVC ligation alone and approximately 10% for bone marrow transplantations.

K. Classification of severity of procedures

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

The levels of discomfort are moderate for all animals (100%) due to the inclusion of a surgery which involves suturing the abdomen of the mice. In addition, the possibility for a thrombosis formation may also cause discomfort, especially if there is a rapid onset, and is considered to cause moderate discomfort. With respect to bone marrow transplantation, 100% of donor animals fall under the category of "non-recovery" since they will be euthanized before the bone marrow is isolated. Recipient animals will undergo surgery and will therefore experience moderate discomfort (100%). The mice will be given the appropriate anaesthesia and analgesia to minimize this as much as possible.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

Animals are killed and used amongst others for full pathological 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



Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	11600	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	[REDACTED]	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
	3.4.4.4	Spontaneous venous thrombosis through siRNA

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.

Mice lacking SLC44A2 expression, either whole body, in certain cellular compartments (through bone marrow transplantation) or cell type specific (endothelial cells or neutrophils), in addition to mice that have been transfused with SLC44A2 targeting antibodies, will receive an injection of siRNA targeting pro-coagulation proteins (antithrombin and protein C), which will induce formation of spontaneous venous thrombosis (VT). This will help to further determine the role of SLC44A2 in the pathogenesis of VT and overcome the limitations of the partial ligation model (appendix 3.4.4.3), namely the retrograde formation of thrombi and overestimation of the involvement of the immune system, as it is a major surgery. Blood and tissue samples from several organs central to the process of VT will be collected at different time points in order to record changes during key stages of disease progression. This may include, but is not limited to, material such as blood, liver, lungs, thrombus and venous tissue. Subsequently, these samples can be used to determine the contributions of SLC44A2 to VT. Using such procedures we will be able to measure differences in the capacity of the blood to coagulate and related cells to produce coagulation factors, changes in the immunological profile as well as characterize changes in thrombus formation/clearance and fibrin deposition in the liver.

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

The mice will receive an injection of solution containing siRNA lipidoids (based on the volumes set forth by the directive Diehl et al 2001) into the tail vein. After 36 hours, the mice will begin to receive analgesia and will be monitored regularly for signs of discomfort up until the time of sacrifice. Collection of the mice will occur at 24, 48 and 72 hours post injection. These time points are chosen in order to

observe the stages of VT propagation such as onset/initiation and progression. At these stages, mice are anesthetized and a midline laparotomy will be made. For the collection of blood, it will be taken directly from the vena cava into a syringe containing sodium citrate so as to preserve the sample. Blood must be collected directly from the vein in order to avoid contamination with factors that activate coagulation (i.e. tissue factor) as it will be used for testing exactly that at a later time. The amount of blood retrieved will be the maximal amount possible, therefore following collection, the diaphragm of the mouse will be punctured, euthanizing the mouse in a humane manner. After this point, several tissues will be collected and snap frozen, including the head which will contain the newly formed thrombus. These can then be used to detect differences both at the mRNA and protein level in addition to histological analysis which can be used to characterize changes in the thrombi as well as fibrin deposition. For the studies that involve antibody treatment, the mice will undergo the relevant procedures (detailed in appendices 3.4.4.2) prior to the injection of siRNA.

For the studies involving bone marrow transplantation, donor mice will be euthanized using carbon dioxide asphyxiation and bone marrow cells from femur, tibiae and humerus bones will be isolated and prepared for injection into the recipient mice. Bone marrow transplant recipients will begin receiving acidified, antibiotic water one week prior to the irradiation procedure. At least six hours before receiving the transplantation, they will be sub lethally irradiated at a dose suitable for their background (C57BL/6 mice). Following radiation, mice will receive a tail vein injection of the donor mouse bone marrow cells and subsequently housed for 21 days until the repopulation of hematopoietic cells is complete. At this point, the mice will then be ready to include in the spontaneous siRNA model described above.

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

Group size: For the calculation of experimental group size we will use the parameter 'development of clinical phenotype' (and not a parameters like liver fibrin deposition), as this is the typical hallmark of the spontaneous thrombosis model and almost always coincides with the presence of thrombi in the large veins of the heads. Previously, 48 hours after siRNA injection, we observed effects of onset and incidence of the clinical phenotype ranging from 1. nearly full absence of phenotype as compared to siRNA injected control animals) to 2. accelerated onset for nearly all animals of a given condition as compared to siRNA injected control animals (factor XII inhibition, presence of Factor V Leiden). Typical group size in these experiments was 10 animals per group. Using Fisher's exact based POWER calculations, statistically significant changes are detected when in one group 8 out of 10 animals follow the black and white response which is the display of visible symptoms of the spontaneous thrombotic phenotype, while in the reference group 8 out of 10 do not respond and remain fully normal (resulting in $P=0.023$ (2-tail)). <http://www.langsrud.com/stat/fisher.htm>. Subsequently, these numbers ($n=10$) also allow to detect statistically significant changes in liver fibrin deposition (using non-parametric Mann Witney tests) and allow to describe biologically relevant changes in thrombus incidence (Fisher's exact tests), severity, structure and cellular composition.

Sex consideration: Unless we determine a clear link between the *Slc44a2* gene and sex in the initial characterization described in appendices 3.4.4.1-2, we will only use females for the following procedures. We opt for female over male since there is less biological variability in measures such as size and weight. This is particularly relevant for this model as we will inject the same amount of siRNA per mice so they must be as closely weight matched as possible. Female mice can also be housed together even though they are not littermates (males cannot) which also helps to minimize any differences that may arise due to housing conditions. Furthermore, the reason we choose to continue with only one sex (female) and not pooled sexes is that it is well established (Alvarado et al Thromb Res 2011; Vanlangenvelde et al Comp Med 2005) that the biological response of males vs. females in murine models of VT is significantly different as demonstrated by several key factors including thrombus size, cytokine expression, blood cell counts, etc. Therefore, regardless of the characterization of SLC44A2 in hemostasis between the sexes, we cannot justifiably group males and females together in the subsequent VT models, as the bi-distributional readouts may obscure true differences which may be due to the gene alone.

B. The animals

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

The initial studies will include *Mus musculus* from a C57BL/6J background, containing either a deleted region (exon 3-10) of the *Slc44a2* gene on both alleles (KO), one allele (HET) or both wild type alleles (WT), globally in all tissues of the animal. They originate from the lab of ██████████ at the University of Michigan but have been bred at the LUMC for many generations. In addition, the final studies will

employ mice lacking the *Slc44a2* gene only in specific cell types. They will be generated by cross breeding *Slc44a2* floxed mice, containing loxP sites on either side of exons 3-10, with mice expressing Cre-recombinase under the control of either the *Tie-2* or *LysM* promoter, resulting in mice lacking SLC44A2 in endothelial cells or neutrophils, respectively. To control for genetic variation as much as possible, we will make use of matched litter mate siblings, generated from parents who are heterozygous for the KO allele. The mice will be included between ages of 8-14 weeks. We estimate that the number of animals needed to complete all aspects of the studies included in this proposal regarding siRNA spontaneous induced thrombosis to be approximately 540 (no sex response in appendices 3.4.4.1-2) to 1080 (yes sex response in appendices 3.4.4.1-2).

Training and set up of procedure:
10 WT animals

siRNA spontaneous induction of thrombosis in global knockout animals:
3 genotypes (WT, HET, KO) x 10 group size x 1 sex (female) x 3 timepoints (24, 48, 72hr) = 90 animals

siRNA spontaneous induction of thrombosis with anti-SLC44A2 antibodies:
3 genotypes (WT, HET, KO) x 10 group size x 1 sex (female) x 3 timepoints (24, 48, 72hr) = 90 animals

siRNA spontaneous induction of thrombosis in cell specific knockout animals:
2 genotypes (WT or KO) x 2 cell type (endothelial or neutrophil) x 10 group size x 1 sex (female) x 3 timepoints (24, 48, 72hr) = 120 animals

siRNA spontaneous induction of thrombosis in bone marrow transplantation animals:
4 systems (WT, WT hemo/KO stromal, KO hemo/WT stromal, KO) x 2 (donor, recipient) x 10 group size x 1 sex (female) x 3 timepoints (24, 48, 72hr) = 240 animals

In the case that we receive a request from reviewers to repeat the siRNA spontaneous induction of thrombosis procedure with a minor addition such as a therapeutic compound, neutralizing antibody or additional stimuli etc., we estimate that we would need approximately 90 additional animals, based on the calculations above. These animals will be used only if specifically requested by an editor/reviewer in order to increase the chances of a successful publication which would ensure the dissemination of these data within the scientific community.

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: Due to the complex nature of VT, which involves several different biological systems including the circulatory, immune and digestive system, as well as the physical interaction between flowing blood and the vessel wall, it cannot be accurately replicated *in vitro*. Thus an *in vivo* system, which includes interactions between all such factors, especially with spontaneous formation of thrombi, is essential in studying this process. In addition, the ability to isolate the actual thrombi for analysis will provide critical clues as to the mechanism driving pathogenesis. However, once we have conducted the studies contained in this proposal, it is likely that we will be able to pinpoint the cellular players and signalling pathways that are central to this process, specifically in relation to SLC44A2, and we can then follow up using *in vitro* models with human tissues to confirm and therefore strengthen our conclusions.

Reduction:

In order to reduce the number of animals necessary, we have taken several steps and carefully considered all options. First, we are making use of littermates so as to reduce the chance of genetic variability. Second, we will save most organs and materials from the mice and not only the tissues that are classically involved in haemostasis. In this way, if the data points to a novel finding and further analysis is needed in secondary organs, we will already have them and the need to include more animals may not be necessary. Lastly, based on power calculations and experience with these types of procedures, we have determined the optimal amount of animals to include in these studies so that a significant difference between experimental conditions can be found (if one exists) and no repetition will likely be needed. Additionally, we plan to only use females so as to reduce the number of mice included. We have also contemplated as to whether another experimental design can be used in order to minimize the requested numbers or the overall distress to the animals. However, we believe that the two models proposed in this study (also appendix 3.4.4.3), used in combination, are the best strategy to research venous thrombosis and cover all aspects that may be key in VT pathogenesis.

Refinement:

Several practices are put in place in order to minimize any pain or discomfort for the animals during the proposed studies. Anaesthesia will be administered prior to the final collection of tissues, so that no pain will be felt during these procedures and for mice receiving bone marrow transplantation, anaesthesia will be administered prior to the irradiation of recipient mice. We also follow the guidelines set forth in the directive Diehl et al 2001 when determining the appropriate injection volumes. In addition, to minimize any discomfort that may arise due to the induction of VT, analgesia will also be given 36 hours post-injection and up until the time of collection, we do not expect full thrombi formation to occur before 36 hours . These studies will also be conducted by trained researchers with experience performing these specific techniques. We also plan to closely monitor the response of the animals at several time points after the injection and if we observe any discomfort associated with humane endpoints such as changes in behaviour (posture, grooming, activity) or pathophysical reactions (rapid breath, unusual heart rate, weight loss) we will end the experiment immediately. In addition, as the irradiation may weaken the animals, we will provide special housing conditions including longer nipples on the water bottles, which will contain antibiotics, as well as soft food to ease accessibility for eating and drinking.

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

The measures taken to minimize animal suffering, pain and fear in regards to the proposed studies include follow up treatment with analgesia continuously until sacrifice in addition to pre-treatment of the animals with the appropriate anaesthesia before collection of tissues. There are no adverse effects on the environment resulting from these studies.

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

X 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.

All experimental animals will be anaesthetised prior to irradiation and the collection of blood or tissues which will subsequently be used for characterization of the mice. Donor animals will be euthanized using carbon dioxide asphyxiation before the collection of bone marrow. Mice will also begin to receive analgesia 36 hours post-injection and continuously up until the point of sacrifice. These procedures are deemed optimal based on experience with such techniques within the department.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

As we do not fully know the extent to which SLC44A2 is contributing to VT, it is possible that it plays a role in anticoagulation, in which case, the onset of the thrombus formation in knockout mice may be accelerated. This would result in visible symptoms including exophthalmos, peri-ocular haemorrhages or edema in the mandibular region or possibly death prior to the planned time points. Adverse effects that may arise due to the bone marrow transplant procedure are either graft versus host disease or alternatively, host versus graft disease in which T-cells become reactive and attack the tissues of the host or graft, respectively. In addition, the effects of irradiation may also result in anaemia, immunosuppression, diarrhea and damage to the mucosal membranes.

Explain why these effects may emerge.

These effects emerge as anticoagulation proteins are lowered and may be accelerated in the case that SLC44A2 plays a role in VT. In regards to adverse effects associated with bone marrow transplantation, this occurs when the MHC molecules are different between the host and donor mice.

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

We are prepared for such an outcome and have planned to minimize the severity of such an event by administering analgesia after the injection of siRNAs in case of discomfort from bleeding, in addition to regular monitoring of the mice for any signs of severe discomfort associated with humane endpoints. In order to minimize the chance of rejection of transplantation, we are using litter mates both as donor and recipient in mice that are backcrossed to C57BL/6 background several generations. We expect the genetic variability to be very limited between such animals which will reduce the chance of mismatched MHC expression on the tissues. Animals will also be placed in special housing conditions (see section D, refinement) 3 weeks post irradiation in preparation for the adverse effects associated with the procedure.

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane

endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

X Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

Criteria for humane endpoints during this part of the study include behavioural changes in posture, grooming or activity levels in addition to pathophysiological reactions such as rapid breathing, weight loss greater than 15% compared to starting weight prior to injection, exophthalmos, peri-ocular haemorrhages or edema in the mandibular region indicating a possible venous rupture in the head. Additionally for mice with bone marrow transplant, HBV activation following radiation.

Indicate the likely incidence.

The incidence can range anywhere from 20% to 80% depending on the importance of SLC44A2 in the propagation of thrombosis, which is currently unknown. In the case that SLC44A2 does not play a role in VT we expect to see approximately 80% incidence as this is generally what we expect to observe in the control group. Similarly, if it exacerbates the VT phenotype, we expect to observe similar occurrence (80%), only at an earlier time point which is why we include several observation points after injection. If the loss of SLC44A2 has a protective role then we expect to observe incidence of approximately 20%. At the onset of any sign of exophthalmos, peri-ocular haemorrhages or edema in the mandibular region, the animal will be euthanized immediately.

K. Classification of severity of procedures

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

The injection of siRNAs targeting anticoagulation proteins will result in the formation of large thrombi in large veins of the head of the mouse which may result in intra/periocular haemorrhages. Based on these known outcomes, the procedures are deemed to include moderate discomfort for 100% of the animals and will thus include the proper analgesia to prevent the discomfort as much as possible. With respect to bone marrow transplantation, 100% of the donor animals fall under the category of "non-recovery" since they will be euthanized before the bone marrow is isolated. Recipient animals will undergo the siRNA model and will therefore experience moderate discomfort (100%). The mice will be given the appropriate anaesthesia and analgesia to minimize this as much as possible.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

Animals are killed and used amongst others for full pathological 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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academisch Ziekenhuis Leiden

Postbus 9600

2300 RC LEIDEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

centralecommissiedierproeven.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD116002016607

Bijlagen

1

Datum 12 juni 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 11 mei 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "The Role of the Solute Carrier Transporter 44A2 (SLC44A2) Gene in the Pathophysiology of Venous Thromboembolism" met aanvraagnummer AVD116002016607. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 02 juni 2017 en 09 juni 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Op 31 mei 2017 hebben wij u vragen gesteld over het ongerief dat de dieren ondergaan, uw onderbouwing voor het gebruik van 1 geslacht en de NTS. Op 08 juni 2017 hebben wij u een vraag gesteld over het aantal dieren. Wij kunnen ons vinden in uw toelichting.

Beslissing

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

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

U kunt met uw project "The Role of the Solute Carrier Transporter 44A2 (SLC44A2) Gene in the Pathophysiology of Venous Thromboembolism" starten. De vergunning wordt afgegeven van 12 juni 2017 tot en met 1 juni 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Leiden gevoegd. Dit advies is opgesteld op 25 april 2017. Bij de beoordeling

van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

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

Datum:

12 juni 2017

Aanvraagnummer:

AVD116002016607

Bezwaar

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen.

Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

Bij het indienen van een bezwaarschrift vragen we u in ieder geval de datum van de beslissing waartegen u bezwaar maakt en het aanvraagnummer te vermelden. U vindt deze nummers in de rechter kantlijn in deze brief.

Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige voorziening vragen bij de Voorzieningenrechter van de rechtbank in de woonplaats van de aanvrager. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisend belang.

Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op

<http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

Meer informatie

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

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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

Datum:
12 juni 2017
Aanvraagnummer:
AVD116002016607



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Academisch Ziekenhuis Leiden

Adres: Postbus 9600

Postcode en plaats: 2300 RC LEIDEN

Deelnemersnummer: 11600

deze projectvergunning voor het tijdvak 12 juni 2017 tot en met 1 juni 2022, voor het project "The Role of the Solute Carrier Transporter 44A2 (SLC44A2) Gene in the Pathophysiology of Venous Thromboembolism" met aanvraagnummer AVD116002016607, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Leiden.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Associate Professor.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 11 mei 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 2 juni 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 2 juni 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 25 april 2017, ontvangen op 11 mei 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 02 juni 2017 en 09 juni 2017

Aanvraagnummer:
AVD116002016607

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst
3.4.4.1. Haemostasis characterization of Slc44a2 knockout mice			
	Muizen (Mus musculus) /	290	Beenmerg donoren: 100% Terminaal Ontvanger dieren: 10% Matig 90% Licht Karakterisatie knockout dieren: 100% Matig
3.4.4.2. Effect of SLC44A2 antibodies on haemostasis			
	Muizen (Mus musculus) /	384	10% Matig 90% Licht
3.4.4.3. Venous thrombosis through partial ligation of the caval vein			
	Muizen (Mus musculus) /	2016	Beenmerg donoren: 100% Terminaal Overige dieren: 100% Matig
3.4.4.4. Spontaneous venous thrombosis through siRNA			
	Muizen (Mus musculus) /	1080	Beenmerg donoren: 100% Terminaal Overige dieren: 100% Matig%

Aanvraagnummer:
AVD116002016607

Voorwaarden

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

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

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



Aanvraagnummer:

AVD116002016607

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

Volgens artikel 10c van de Wet op de Dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g. Uit artikel 10b volgt dat de dierproeven zijn ingedeeld in de categorieën terminaal, licht, matig of ernstig. Als er wijzigingen in een dierproef plaatsvinden, moeten deze gemeld worden aan de Centrale Commissie Dierproeven. Hebben de wijzigingen negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn, dan moet volgens artikel 10a5 de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.

Artikel 10b schrijft voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister een ontheffing is verleend.

Verzorging

De fokker, leverancier en gebruiker moeten volgens artikel 13f van de wet over voldoende personeel beschikken en ervoor zorgen dat de dieren behoorlijk worden verzorgd, behandeld en gehuisvest. Er moeten ook personen zijn die toezicht houden op het welzijn en de verzorging van de dieren in de inrichting, personeel dat met de dieren omgaat moet toegang hebben tot informatie over de in de inrichting gehuisveste soorten en personeel moet voldoende geschoold en bekwaam zijn. Ook moeten er personen zijn die een eind kunnen maken aan onnodige pijn, lijden, angst of blijvende schade die tijdens een dierproef bij een dier wordt veroorzaakt. Daarnaast zijn er personen die zorgen dat een project volgens deze vergunning wordt uitgevoerd en als dat niet mogelijk is zorgen dat er passende maatregelen worden getroffen.

In artikel 9 staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn. In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.

Voordat een dierproef die onderdeel uitmaakt van dit project start, moet volgens artikel 10a3 van de wet de uitvoering afgestemd worden met de instantie voor dierenwelzijn.

Pijnbestrijding en verdoving

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdoving wordt uitgevoerd tenzij dat niet mogelijk is, dan wel bij het verrichten van een dierproef worden pijnstillers toegediend of andere goede methoden gebruikt die de pijn, het lijden, de angst of de blijvende schade bij het dier tot een minimum beperken. Een dierproef die bij het dier gepaard gaat met zwaar letsel dat hevige pijn kan veroorzaken, wordt niet zonder verdoving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdoving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdoving onvereenigbaar is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn

Aanvraagnummer:
AVD116002016607

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 W17-11										
			wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document NTS 2016634	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1	
1	Origineel aanvraagformulier				x		x			
2	NTS	x								
3	Projectvoorstel				x	x	x	x		
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1				x	x				
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2				x	x				
6	DEC-advies				x		x			
7	Ontvangstbevestiging				x		x			
8	Verzoek om DEC-advies				x		x			
9	Brief aanhouden beoordeling				x		x			
10	Adviesnota CCD		x						x	
11	Beschikking en vergunning				x		x			

AVD401002016 634

Aanvraag
Projectvergunning Dierproeven
Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in	40100
		<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	Stichting Wageningen Research
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	
		KvK-nummer	
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	Akkermaalsbos 12
		Postbus	59
		Postcode en plaats	6700AW Wageningen
		Iban	NL10RABO0397066465
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Wageningen UR
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker	(Titel) naam en voorletters	
		Functie	
		Afdeling	
		Telefoonnummer	
		Email adres	

1.5 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) naam en voorletters	
Functie	
Afdeling	
Telefoonnummer	
Email adres	

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	
Email adres	

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

Wijziging op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het Dierenwelzijn

Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3

2.3 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 Startdatum
1-5-2017

3.2 Wat is de geplande einddatum van het project?
1-5-2020

3.3 Wat is de titel van het project?
Biomerkers voor darmgezondheid en immunocompetentie in varkens

3.4 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
Naam DEC
DEC Wageningen UR

Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
Postadres
Droevendaalsesteeg 4, 6708 PB Wageningen

E-mailadres
dec@wur.nl

4 Betaalgegevens

4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
 Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1287,-

4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD
 Wijziging €
 Via een eenmalige incasso
 Na ontvangst van de factuur

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.

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:

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

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

Centrale Commissie
Dierproeven Postbus 20401
2500 EK Den Haag

- 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	Wageningen
Datum	3-4-2017
Handtekening	[REDACTED]

Form Project proposal

- This form should be used to write the project proposal of animal procedures.
- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed
- For more information on the project proposal, see our website(www.zbo-ccd.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

- | | | |
|-----|--|--|
| 1.1 | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. | 40100 |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment. | Stichting Wageningen Research |
| 1.3 | Provide the title of the project. | Biomerkers voor darmgezondheid en immuuncompetentie in varkens |

2 Categories

- | | | |
|-----|---|---|
| 2.1 | Please tick each of the following boxes that applies to your project. | <input type="checkbox"/> Basic Research
<input checked="" type="checkbox"/> Translational or applied research
<input type="checkbox"/> Regulatory use of routine production
<input type="checkbox"/> Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare dier
<input type="checkbox"/> Research aimed at preserving the species subjected to procedures |
|-----|---|---|

Higher education or training

Forensic enquiries

Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

3 General description of the project

3.1 Background

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

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

3.1 Achtergrond

Aanleiding

Gezondheid is van groot belang voor het welzijn en de productiviteit van landbouwhuisdieren. De darm is een belangrijk immuun-orgaan. De darm speelt daarom een heel belangrijke rol in algemene diergezondheid. Verder is darmgezondheid cruciaal voor voederbenutting en groei.

Darmgezondheid is afhankelijk van verschillende factoren en hun onderlinge interacties: Management en voeding, genetica, en (darm)microbiota.

Daarom is het overkoepelende [REDACTED] gericht op de invloed van voeding, (darm)microbiota, en genetica op de immuun-status van dieren in de praktijk.

In de varkenshouderij worden interventies in management en voeding geadviseerd en aangewend om (bij) te sturen op diergezondheid en bedrijfsgezondheid. Hierbij wordt uitgegaan van bestaande algemene kennis of aannames over de relatie van bepaalde gezondheidsproblemen met het management- of voederinterventies, bijvoorbeeld t.a.v. bepaalde nutriënten of toevoegingen zoals pro- en pre-biotica. Om dierspecifiek, problematiek-specifiek en 'evidence-based' te kunnen bijsturen is het nodig om relevante dierspecifieke informatie te verkrijgen op een bedrijf. In het project van het huidige projectvoorstel zullen dierexperimenten worden gedaan gericht op het vinden van biomerkers die op een laag-invasieve wijze kunnen worden gewonnen, waarmee dierspecifieke informatie kan worden verkregen over gezondheid en potentiële (voedings)interventies.

Achtergrond en Context

Het project in het hier voorliggende projectvoorstel is een onderdeel van het overkoepelende [REDACTED]. [REDACTED] richt zich op verbetering van resource efficiency in de veehouderij en op preventieve diergezondheid. Het samenspel tussen genetische achtergrond (genotype) van dieren, diervoedersamenstelling en de microbiota in het maagdarmkanaal staan centraal in het onderzoek.

heeft de ambitie om duurzame en gezonde veehouderij in Nederland verder te ontwikkelen. Daarbij zijn doorbraken noodzakelijk om de invloed van verschillende factoren op de dierlijke productie beter op elkaar af te stemmen. Hierbij gaat het om de genetische achtergrond (genotype) van dieren, om de samenstelling van de gebruikte diervoeders en om de samenstelling en diversiteit van de bacteriële flora (microbiota) in het maagdarmkanaal. Er zijn namelijk veel aanwijzingen dat genotype, diervoeding en microbiota nauw met elkaar samenhangen en invloed uitoefenen op zowel productie als gezondheid. Desalniettemin worden hun effecten nog nauwelijks in samenhang met elkaar bestudeerd. ontstaan nieuwe en betere verbindingen tussen belangrijke spelers in de dierlijke sector. Bovendien ontstaan er nieuwe kansen voor de betrokken bedrijven en kennisinstellingen. zullen bijdragen aan robuustere dieren met een verbeterd dierenwelzijn, een verantwoord gebruik van grondstoffen, meer toegevoegde waarde voor consumenten, verbeterde voedselveiligheid en een vermindering van emissies in de dierhouderij waardoor haar ecologische voetafdruk verminderd wordt.

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?

3.2 Doel

Algemene doelstelling

De algemene doelstelling van het project is om op varkenshouderijbedrijven dierspecifiek, problematiek-specifiek en 'evidence-based' te kunnen bijsturen op gezondheid van varkens door middel van voeder- en andere managementinterventies. Hierbij gaat het om interventies die de kans op het krijgen van een ziekte kunnen verlagen, of de snelheid van herstel van een ziekte kunnen verbeteren.

Het specifieke doel van dit project is daarom om biomerkers voor varkens te vinden, die op een laag-invasieve wijze kunnen worden gewonnen, en waarmee dierspecifieke informatie kan worden verkregen over ziekteverstand en mogelijke (voedings)interventies. Gekeken wordt naar metabolieten in bloed en mestmonsters, en naar de microbiota in de mest, in dieren die op dat moment gezond zijn. Vervolgens wordt gekeken gedurende het verdere leven van de varkens hoe vaak en hoe lang de dieren last hadden van ziektes, en bij slacht wordt gekeken naar groeisnelheid en naar (rest)laesies in verschillende organen. Metabolieten in bloed of mest die gecorreleerd zijn met de latere gezondheidsstatus van het dier gedurende het verdere leven zijn potentiële biomerkers die iets zeggen over het vermogen van dieren om niet ziek te worden (aspecifieke en/of specifieke weerstand), of om snel te herstellen van een ziekte (veerkracht).

Als deze correlaties worden gevonden zal vervolgens worden gekeken naar de relatie van deze mogelijke biomerkers met kenmerken van het darm-microbioom en van weefselmonsters van biggen die worden geëuthanaseerd op respectievelijk 15 dagen en 8 weken leeftijd. Het doel hiervan is om aanwijzingen te krijgen van de onderliggende mechanismen van de gevonden correlaties, om voorspellingen te kunnen doen hoe deze kenmerken door (voer) interventies kunnen worden beïnvloed.

Haalbaarheid

De doelstellingen en uitvoering van dit project is haalbaar.

Het is bekend dat er variatie is tussen varkens in hun vatbaarheid voor- of weerstand tegen ziektes. Deels is de variatie veroorzaakt door genetische invloeden, maar deels ook door management en voeding. In dit onderzoek zullen wij kijken naar associaties tussen metabolieten en microbiota in gezonde biggen op jonge leeftijd, met de gezondheid van de dieren gedurende hun verdere leven. Darmgezondheid speelt een belangrijke rol in algehele diergezondheid. De darm is het grootste immuunorgaan. Het darm-microbioom beïnvloedt het immuunsysteem en speelt een belangrijke rol in de opbouw van de immuuncompetentie in het jonge dier [redacted]. Eén en ander is bekend op basis van onderzoek met gnotobionten, dieren die geen- of alleen specifieke bacteriën in het darm-microbioom hebben, en aan de hand van studies met gerichte kolonisatie met bacteriën, en door beïnvloeding van het darm-microbioom met pro- en prebiotica, of met antibiotica. Naast pathoogengemedieerde ziektes zijn er duidelijk aangetoonde verbanden met allergieën en astma, en obesitas en diabetes. [redacted] in het varken aangetoond dat beïnvloeding van het darm-microbioom mogelijk is met voerinterventies met o.a. pro- en prebiotica, of door antibiotica [redacted]. Daarbij [redacted] effecten hiervan op het immuunsysteem, en het transcriptoom en de histologie van de darm-mucosa. [redacted] in de kip werden vergelijkbare observaties en conclusies bereikt [redacted]). Uit humaan onderzoek is bekend dat het microbiom de absorptie, opslag, en energiewinning van voedingsstoffen moduleert en een sterk effect heeft op - c.q. herkenbaar is in - het profiel van metabolieten in bloedplasma, gal, lever, urine, en in de darm zelf [redacted]. De metabolieten werden gemeten met kern-spin resonantie (H1-NMR), en diverse massa- spectroscopische technieken, zoals ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry en gas chromatografie (GC-FID). Vergelijkbare technieken hebben wij ook in [redacted] metabolomics onderzoek in o.a. [redacted].

In het hier beschreven projectvoorstel zullen wij metabolieten bepalen ('metabolic profiling') in bloedplasma en extract van de mest met H1-NMR (gehele spectrum) en LC-MS triple quad (~100 gedefinieerde metabolieten). NMR-metingen zullen worden uitgevoerd in niet-gefractioneerd én in gefractioneerd bloed. Niet- gefractioneerd bloed wordt geanalyseerd voor lipoproteïnen en gefractioneerd bloed (<10 kD) voor andere metabolieten. Daarnaast worden gefractioneerde bloedmonsters ook geanalyseerd door middel van LC-MS triple quad methode om primaire metabolieten aan te vullen. Op deze manier worden data verkregen van rond de 100 metabolieten. Daarnaast wordt het microbiom geanalyseerd door middel van sequencing technologie (16S; microbiota).

Zoals hierboven is uitgelegd verwachten we dat er metabolieten of microbiom parameters gevonden worden die iets zeggen over het vermogen van dieren om niet ziek te worden (aspecifieke en/of specifieke weerstand), of om snel te herstellen van een ziekte (veerkracht). Het is waarschijnlijk dat deze gevonden parameters ook iets zeggen over waarom een varken verminderde weerstand heeft, en ook hoe dat door een voederinterventie kan worden verbeterd.

De toepassing in de praktijk van de gevonden biomerkers is haalbaar. Bij de toepassing zullen mestmonsters, of eventueel bloedmonsters, van biggen moeten worden genomen. Dit brengt ongerief met zich mee. Dit ongerief is acceptabel als de dieren door middel van de geadviseerde voeder- of managementinterventie minder ziektes gaan krijgen. De [redacted]

[redacted] verwachten dat de bepalingen van de biomerkers voldoende betaalbaar zullen zijn en dat zij ze zullen gaan toepassen.

1. Schokker D, Zhang J, Zhang L, Vastenhouw SA, Heilig HGHJ, Smidt H, Rebel JMJ, Smits MA (2014) Early-life environmental variation

[redacted]

3.3 Relevance

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

3.3. Belang

Wetenschappelijk belang

Dit project draagt bij aan het begrijpen, voorspellen en sturen van immunologische en fysiologische processen die van belang zijn voor (darm)gezondheid en immuuncompetentie van varkens. Dit project draagt bij aan de ontwikkeling van biomerkers als maat voor immuuncompetentie, ziekteveerkracht en veerkracht, gerelateerd aan bedrijfsomstandigheden en voeding. Hiermee draagt het project ook bij aan kennis ten aanzien van nieuwe technologieën in de dierhouderijketen en op veehouderijniveau.

Maatschappelijk belang

De samenleving, de overheid, en het bedrijfsleven hechten veel waarde aan verbeteringen in de varkenshouderij ten aanzien van duurzaamheid, resource-efficiency, gezondheid en welzijn. Met oog op humane gezondheid [REDACTED] is er aandacht voor antibioticumresistentie en zoönosen. Verhoging van weerstand en veerkracht van landbouwhuisdieren helpt in het terugdringen van antibioticumgebruik in de veehouderij en draagt bij aan diergezondheid en daarmee ook aan dierenwelzijn. De darm is een belangrijk immuunorgaan. De darm speelt daarom een heel belangrijke rol in algemene diergezondheid. Verder is darmgezondheid cruciaal voor voederbenutting en groei. Het ontwikkelen en toepasbaar maken van biomerkers voor varkens die op een laag-invasieve wijze kunnen worden gewonnen, en waarmee dierspecifieke informatie kan worden verkregen over gezondheid en potentiële (voedings)interventies kunnen een waardevol instrument zijn voor voederbedrijven om evidence-based advies te geven aan veehouders. Het kan hiermee een bijdrage leveren aan het verbeteren van diergezondheid en resource-efficiency, en het terugdringen van antibioticumgebruik in de varkenshouderij.

3.4 Research Strategy

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

3.4.1 Onderzoeksstrategie

Het onderzoek omvat de volgende fasen:

1. Vinden van potentiële biomerkers in mest en bloedmonster
2. Valideren van de gevonden biomerkers

Fase 1

Het doel van fase 1 is om biomerkers te vinden in mest (feces) of bloed van biggen op dag 15, die correleren met het vermogen van dieren om niet ziek te worden (aspecifieke en/of specifieke weerstand), of om snel te herstellen van een ziekte (veerkracht). Specifiek wordt gekeken naar metabolieten (in bloed en mest) die correleren met gedurende het verdere leven en bij slacht gebleken gezondheidsstatus van het dier, dat wil zeggen de ziekte/gezondheids-geschiedenis van het dier, de groeisnelheid, en de bij slacht gevonden (rest)laesies in verschillende weefsels. Daarnaast is het doel om dit te relateren aan de samenstelling van het microbioom en verschillende darmsegmenten op drie verschillende voor de

varkenshouderij kenmerkende tijdstippen: 1) op 15 dagen leeftijd, terwijl de biggen nog in de kraamstal bij de zeug zijn; 2) Op leeftijd 8 weken, 4 weken na het spenen, wanneer de (darm)microbiota weer enigszins stabiel is; en 3) bij het bereiken van het slachtgewicht.

Biggen worden gehouden in reguliere gesloten varkensbedrijven. Om voldoende spreiding te kunnen waarborgen tussen en binnen de bedrijven is er gekozen om een aantal criteria vast te stellen met experts van verschillende mengvoerbedrijven, denk hierbij aan gezondheids- en aan performance gerelateerde kenmerken. Er is actief gezocht naar bedrijven die uiteenlopend scoren op deze kenmerken om zo voldoende spreiding te krijgen voor ons onderzoek. De proef omvat maximaal drie groepen van biggen (50% mannetjes, 50% vrouwtjes) met 120 biggen per groep. Groep 1 biggen worden bemonsterd (bloed en mest) op dag 15, week 8, en bij het bereiken van het slachtgewicht, en vervolgens geëuthanaseerd. De bloed- en mestmonsters worden geanalyseerd met methoden beschreven in hoofdstuk 3.2. *Doel, Haalbaarheid*. In groep 1 wordt gekeken naar correlaties tussen metabolieten in mest en bloed met de gezondheidsstatus, en met de samenstelling van het microbioom in de darm na slachten. Gezondheidsparameters zijn de ziekte/gezondheids-geschiedenis van het dier, de groeisnelheid, en de bij slacht gevonden (rest)laesies in verschillende weefsels.

Indien correlaties in deze groep 1 worden gevonden worden ook proefdiergroepen 2 en 3 gebruikt: Groep 2 biggen worden bemonsterd (bloed en mest) op dag 15 en vervolgens geëuthanaseerd. Groep 3 wordt bemonsterd (bloed en mest) op dag 15 en op week 8, en vervolgens geëuthanaseerd. In groepen 2 en 3 wordt gekeken naar de relatie tussen de in groep 1 gevonden potentiële biomerkers (metabolieten van bloed en mest) met de samenstelling van het microbioom op respectievelijk 15 dagen en 8 weken. Van de geëuthanaseerde dieren worden tevens weefselmonsters van de volgende organen genomen: jejunum, ileum, colon, lever, en long. Deze monsters zullen worden gebruikt voor onderzoek naar de onderliggende mechanismen van de gevonden correlaties tussen metabolieten in bloed en mest en de (latere)gezondheidsstatus van de dieren. Bijvoorbeeld door genexpressie te bepalen in het darmweefsel, wat inzicht kan geven in de immunocompetentie van de gastheer en de gastheer 'respons' op zijn omgeving.

Fase 2

Doel van Fase 2 is om op een groot aantal verschillende bedrijven in een totaal groot aantal biggen te valideren of de in Fase 1 gevonden metabolieten, de potentiële biomerkers, in mest- en bloedmonsters van dag 15, een voorspeller zijn voor de gedurende het verdere leven en bij slacht gebleken gezondheidsstatus van het dier, dat wil zeggen de ziekte/gezondheids-geschiedenis van het dier, de groeisnelheid, en de bij slacht gevonden (rest)laesies in verschillende weefsels. In honderd praktijkbedrijven zullen van vier biggen per bedrijf (twee mannelijk, twee vrouwelijk) bloed- en mestmonsters worden genomen op dag 15. De biggen worden verder regulier gehouden en na het bereiken van geslachtgewicht regulier geslacht.

Opslag biologisch materiaal en data.

Al het biologische materiaal zal worden opgeslagen in tweevoud bij -80°C in onze opslagruimtes. Het biologische materiaal zal op verzoek, in overleg beschikbaar worden gesteld aan andere onderzoekers.

De data die in dit project worden gegenereerd worden beheerd volgens het data beheer plan van [REDACTED]. De primaire data worden voor de gehele wetenschappelijke gemeenschap beschikbaar gehouden in publieke databases (The Sequence Read Archive (SRA) van NCBI/ENSEMBL) volgens de voorwaarden van de Toronto statement en de Fort Lauderdale principles. Voor dat de data in de publieke databases zijn ingevoerd zal de primaire data worden opgeslagen in ons High-performance computer opslag systeem, dat een automatisch data

back-up systeem heeft. Hier worden ook de bewerkte secundaire data opgeslagen. Informatie over bewerkte data en analytische pipelines zal beschikbaar zijn via Github. Data handling voor publicaties wordt vastgelegd in logboeken die voor minimaal 5 jaar na publicatie worden bewaard.

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.

3.4.2 Overzicht

Fase 1

360 biggen worden op reguliere wijze gehouden op gesloten praktijkbedrijven. Van 120 dieren worden bloed- en mestmonsters genomen op dag 15, op week 8, en op 1 dag voor de slacht, waarna de biggen worden geëuthanaseerd. Van de geëuthanaseerd dieren worden weefselmonsters van de volgende organen genomen: jejunum, ileum, colon, lever, en long. Van 120 biggen wordt op dag 15 bloed en mestmonsters genomen, waarna de biggen worden geëuthanaseerd. Van 120 dieren worden bloed- en mestmonsters genomen op dag 15 en op week 8, waarna de biggen worden geëuthanaseerd.

Fase 2

400 biggen worden op reguliere wijze gehouden op gesloten praktijkbedrijven. Van deze biggen worden alleen maar bloed- en fecesmonsters genomen op dag 15. De dieren blijven verder regulier gehuisvest op dezelfde bedrijven en worden na het bereiken van het slachtgewicht regulier geslacht.

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

3.4.3 Samenhang

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

Fase 1 en Fase 2 zijn zeer duidelijk gekoppeld. Waarbij we in fase 1 de biomarkers voor de gezondheidsstatus willen identificeren (mijlpaal 1) en vervolgens een gedetailleerd onderzoek willen doen naar de onderliggende mechanismen (mijlpaal 2). Verder zal hierbij ook een keuzemoment van toepassing zijn. Mocht er onverhoopt geen enkele metaboliet zijn in mest- of bloedmonsters die correleert met gebleken gezondheidsstatus van het dier, dan zal fase 2 niet worden uitgevoerd.

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	Monstername van bloed- en mestmonsters van biggen, en euthanaseren
2	Monstername van bloed- en mestmonsters van biggen

Appendix
Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	40100	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	WR	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 1	Type of animal procedure Monstername van bloed- en mestmonsters van biggen, en euthanaseren

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.

1. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Dit type dierproef wordt gebruikt in het eerste van de twee voorziene dierexperimenten van het projectvoorstel. Het doel van dit eerste dierexperiment is het vinden van potentiële biomerkers in mest-of bloedmonsters van biggen, die gecorreleerd zijn met het vermogen van dieren om niet ziek te worden (aspecifieke en/of specifieke weerstand), of om snel te herstellen van een ziekte (veerkracht), en tevens om meer inzicht te krijgen in de samenhang van die biomerkers met de onderliggende mechanismen van de verschillen in weerstand, en hoe dat door een voederinterventie kan worden verbeterd.

Het doel van het hier beschreven type dierproef is daarom tweeledig: 1) Bloed- en mestmonsters verkrijgen van biggen op drie verschillende leeftijden: 15 dagen, 8 weken, en op slachtgewicht, en de gezondheidsstatus volgen gedurende het leven van de biggen tot aan de slacht. De gezondheidsstatus van de dieren wordt bepaald aan de hand van de (klinische) ziekteverschijnselen die gedurende hun leven worden genoteerd, en een serie van kenmerken van het dier en zijn organen die bij slacht worden bepaald, waaronder groeisnelheid, en het voorkomen van (rest)laesies in diverse organen. In de bloed- en mestmonsters worden stoffen en microbiota gemeten en dan wordt naar correlaties gezocht tussen bloed- en mestparameters en gezondheidsstatus. 2) Microbiota in de (dunne en dikke) darm en organen verkrijgen van biggen van de drie hierboven genoemde leeftijden met als doel om de aanwezigheid van gemeten parameters in de bloed- en mestmonsters te relateren aan het darm-microbioom en kenmerken van de organen op de drie respectievelijke leeftijden. Voor de eerste doelstelling hoeven de biggen alleen bemonsterd (bloed en mest) te worden. Voor de tweede doelstelling worden de dieren op de respectievelijke leeftijden geëuthanaseerd.

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

Dierhandelingen

1. Monsternamen van bloed- en mestmonsters. Afhankelijk van de proefgroep worden de biggen 1, 2, of 3 maal bemonsterd gedurende hun leven. Hiervoor worden de biggen tijdelijke vastgehouden, geprikt voor bloedafname, en mestmonsters worden gewonnen uit het rectum.

2. Euthanaseren

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

3. Statistische methoden

Uit eerder onderzoek binnen onze groep kan wel een schatting worden verkregen van de variatie in metabolietconcentraties tussen dieren, maar niet in relatie tot individuele diergezondheid of ziekte weerstand. Omdat de in dit onderzoek beoogde correlaties niet vooraf bekend zijn kan het benodigde aantal dieren niet met zekerheid worden bepaald. Wel kunnen wij gebruik maken van eerder onderzoek naar biomerkers voor continue grootheden uit ons eigen onderzoek en uit de literatuur. Op basis daarvan is gekozen voor het in het huidige projectvoorstel genoemde aantal dieren. Het aantal dieren dat nodig is zal daarbij worden beperkt door gebruik te maken van tussentijdse beslismomenten (zie onder D; Vermindering). Om voldoende spreiding te kunnen waarborgen tussen en binnen de bedrijven is er gekozen om een aantal criteria vast te stellen met experts van [REDACTED], denk hierbij aan gezondheids- en aan performance gerelateerde kenmerken. Er is actief gezocht naar bedrijven die uiteenlopend scoren op deze kenmerken om zo voldoende spreiding te krijgen voor ons onderzoek.

B. The animals

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

Keuze voor het varken: Doel is om potentiële biomerkers in mest-of bloedmonsters te vinden in biggen, die iets zeggen over weerstand en veerkracht van varkens en die kunnen aangeven hoe deze door een (voeder)interventie mogelijk kunnen worden verbeterd. Daarom kan dit onderzoek niet in een andere diersoort worden gedaan.

Herkomst: We maken gebruik van dieren in gesloten bedrijven in de reguliere commerciële varkenshouderij.

Geschatte aantal: 360. Drie groepen van 120 biggen per groep. Groep 1 biggen worden bemonsterd (bloed en mest) op dag 15 en vervolgens geëuthanaseerd. Groep 2 wordt bemonsterd (bloed en mest) op dag 15 en op week 8, en vervolgens geëuthanaseerd. Groep 3 wordt bemonsterd (bloed en mest) op dag 15, week 8 en bij het bereiken van het slachtgewicht, en vervolgens geëuthanaseerd.

Geschatte aantal: 360 (50% mannetjes, 50% vrouwtjes). Drie groepen van 120 biggen per groep. Groep 1 biggen worden bemonsterd (bloed en mest) op dag 15, week 8, en bij het bereiken van het slachtgewicht, en vervolgens geëuthanaseerd. Groep 2 biggen worden bemonsterd (bloed en mest) op dag 15 en vervolgens geëuthanaseerd. Groep 3 wordt bemonsterd (bloed en mest) op dag 15 en op week 8, en vervolgens geëuthanaseerd. Voor dat groepen 2 en 3 worden ingezet is er een go/no-go beslissing na het onderzoek aan groep 1.

Keuze voor de drie tijdstippen: Gekozen is voor drie verschillende voor de varkenshouderij kenmerkende en voor de gezondheid van varkens belangrijke tijdstippen (levensfasen): 1) op 15 dagen leeftijd, terwijl de biggen nog in de kraamstal bij de zeug zijn; 2) Op leeftijd 8 weken, 4 weken na het spenen, wanneer de (darm)microbiota weer enigszins stabiel is; en 3) bij het bereiken van het slachtgewicht.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Varken	Licht	360	

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.

Vervanging: Doel is om potentiële biomerkers in mest-of bloedmonsters te vinden in biggen, die iets zeggen over weerstand en veerkracht van varkens en die kunnen aangeven hoe deze door een (voeder)interventie mogelijk kunnen worden verbeterd. Daarom kan dit onderzoek niet in een andere diersoort of in een ex vivo of in vitro model worden gedaan. Daarbij is de darm een complex en dynamisch orgaan met verschillende celtypen en de microbiota. Het gedrag van het gehele (darm)systeem, in samenwerking met andere organen, zorgt voor de metabolietprofielen in bloed en mest. Vermindering: Het aantal benodigde dieren is geschat met als uitgangspunt om zo weinig mogelijk dieren te gebruiken maar nog wel zinvolle

conclusies te kunnen trekken (anders moet het werk opnieuw worden gedaan en dan kost het uiteindelijk meer dieren). De statistische overwegingen om het benodigde aantal dieren te bepalen is hierboven reeds vermeld. Het aantal dieren dat nodig is zal daarbij worden beperkt door gebruik te maken van tussentijdse beslismomenten als volgt: Groep 1 (biggen bemonsterd op drie tijdpunten) wordt als eerste uitgevoerd. Blijken er dan geheel geen potentieel bruikbare correlaties tussen bloed- en mest-parameters en gezondheidsstatus, dan zijn groepen 2 en 3 niet nodig. Blijken er alleen correlaties met bloed- of mestparameters van dag 15, dan is na groep 1 alleen groep 2 nodig. Zijn er alleen correlaties met bloed- of mestparameters van week 8, dan is na groep 1 alleen groep 3 nodig. Verfijning: De dieren die geëuthanaseerd zullen worden ondervinden gering ongerief. Hetzelfde geldt voor de bloed/mest bemonstering. Er is geen verdere verfijning mogelijk.

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

De dieren die geëuthanaseerd zullen worden ondervinden gering ongerief. Hetzelfde geldt voor de bloed/mest bemonstering. Bij eventueel benodigde rectale stimulatie voor het verkrijgen van een rectaal mestmonster zal de stimulatie voorzichtig worden uitgevoerd. Ook zullen de dieren zo rustig mogelijk worden benaderd voor monsternemen, om zo stress en angst minimaal te houden.

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.

Naar aanleiding van vragen van [REDACTED] over mogelijkheden om de gezondheidsstatus van het dier te voorspellen hebben wij allereerst een literatuur search gedaan. Uit deze search bleek dat er geen (potentiële) biomerkers in biggen bekend zijn die een voorspelling geven van hun weerstand en veerkracht in het verdere leven. In de gevonden relevante literatuur wordt juist geconcludeerd dat er wel behoefte is aan dergelijke biomerkers, maar dat die nog niet bestaan. Zie bijvoorbeeld Niewold, TA (2015) Intestinal health biomarkers in vivo. (http://dx.doi.org/10.3920/978-90-8686-792-9_).

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?

F. Accommodation and care

No

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

We maken gebruik van dieren in gesloten bedrijven in de reguliere commerciële varkenshouderij. Er zullen dierhandelingen worden uitgevoerd die niet vallen onder de reguliere dierhouderij: Het nemen van bloed- en mestmonsters, en het euthanaseren van de varkens om orgaanmateriaal te kunnen bemonsteren zijn dierhandelingen die vallen onder de wet op de dierproeven.

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.

De varkens worden gehouden op commerciële varkenshouderijbedrijven. Het betreft bedrijven die intensief samenwerken met [REDACTED].

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

Gekozen is voor onderzoek op praktijkbedrijven omdat we willen dat de te vinden biomerkers bruikbaar zijn op praktijkbedrijven. Huisvesting en verzorging zal in principe plaatsvinden volgens de geldende bedrijfsvoering op dat bedrijf. Het nemen van de bloed- en mestmonsters en het euthanaseren van de varkens om orgaanmateriaal te kunnen bemonsteren zal op het bedrijf worden uitgevoerd door erkende biotechnici van het project-researchteam.

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?

H. Pain and pain relief

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

Het betreft bloedprikken. De pijn wordt veroorzaakt door de naald. De pijn wordt dermate gering geacht dat (bij mens en dier) nooit een pijnstillend (bijvoorbeeld lidocaïne zalf) wordt toegepast op de te prikken plek.

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Angst en stress tijdens het nemen van de bloed- en mestmonsters en het euthanaseren

Explain why these effects may emerge.

Voor het nemen van de bloed- en mestmonsters, en voor de euthanasie moeten de biggen kort worden vastgehouden. Dit kan angst en stress veroorzaken. Bij het nemen van de mestmonsters zullen de dieren indien nodig voorzichtig rectaal gestimuleerd worden. Dit kan pijn, angst, en stress veroorzaken.

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

Bij eventueel benodigde rectale stimulatie voor het verkrijgen van een rectaal mestmonster zal de stimulatie voorzichtig worden uitgevoerd. Ook zullen de dieren zo rustig mogelijk worden benaderd voor monsternemen, om zo stress en angst minimaal te houden.

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).

Licht

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

In groepen 1, 2, en 3 (elk 120 dieren) worden dieren geëuthanaseerd op een leeftijd van respectievelijk 15 dagen, 8 weken, en bij slachtgewicht. Dit is nodig voor het nemen van monsters uit het lumen van de darm (jejunum, ileum, en colon) en van weefsels uit de organen jejunum, ileum, colon, lever, en long, met oog op de hierboven reeds beschreven doelen.

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

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

Yes

Appendix
Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	40100				
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	WR				
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	<table border="1"> <thead> <tr> <th data-bbox="622 880 815 904">Serial number</th> <th data-bbox="1355 880 1697 904">Type of animal procedure</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="622 912 640 936">2</td> <td data-bbox="1355 912 1989 968">Monstername van bloed- en mestmonsters van biggen</td> </tr> </tbody> </table>	Serial number	Type of animal procedure	2	Monstername van bloed- en mestmonsters van biggen
Serial number	Type of animal procedure					
2	Monstername van bloed- en mestmonsters van biggen					

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.

Dit type dierproef wordt gebruikt in het tweede van de twee voorziene dierexperimenten van het projectvoorstel. Het doel van dit tweede dierexperiment is het valideren van potentiële biomerkers (die in het eerste dierexperiment binnen hetzelfde project zijn gevonden). De potentiële biomerkers zijn metaboliëten of microbiota in mest-of bloedmonsters van biggen die in het eerste dierexperiment gecorreleerd bleken met het vermogen van dieren om niet ziek te worden (aspecifieke en/of specifieke weerstand), of om snel te herstellen van een ziekte (veerkracht). Gekeken wordt of de gevonden correlaties in een nieuwe onafhankelijke groep dieren opnieuw gevonden wordt. Hierbij wordt op basis van de gegevens van de eerste dierproef een selectie gemaakt van het beste tijdstip (dierleeftijd 15 dagen of 8 weken) om de monsters te verzamelen.

Het doel van het hier beschreven type dierproef is daarom om bloed- en mestmonsters verkrijgen van biggen op één leeftijd: 15 dagen of 8 weken, en de gezondheidsstatus volgen gedurende het leven van de biggen tot aan de slacht. De gezondheidsstatus van de dieren wordt bepaald aan de hand van de (klinische) ziekteverschijnselen die gedurende hun leven worden genoteerd, en een serie van kenmerken van het dier en zijn organen die bij slacht worden bepaald, waaronder groeisnelheid, en het voorkomen van (rest)laesies in diverse organen. Met de verkregen data worden de in het eerste dierexperiment gevonden correlaties gevalideerd.

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

Monsternamen van bloed- en mestmonsters. De biggen worden 1 maal bemonsterd gedurende hun leven.

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

Doel is om correlaties gevonden in het eerste dierexperiment binnen hetzelfde project te valideren. Omdat de in dit onderzoek beoogde correlaties niet vooraf bekend zijn kan het benodigde aantal dieren niet met zekerheid worden bepaald. Wel kunnen wij gebruik maken van eerder onderzoek naar biomerkers voor continue grootheden uit ons eigen onderzoek en uit de literatuur. Op basis daarvan is gekozen voor het in het huidige projectvoorstel genoemde aantal dieren. Het aantal dieren dat nodig is zal daarbij worden beperkt door gebruik te maken van tussentijdse beslismomenten (zie onder D; Vermindering).

B. The animals

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

Diersoort Varken

Het varken is het doeldier. Doel is om potentiële biomerkers in mest-of bloedmonsters te vinden in biggen, die iets zeggen over weerstand en veerkracht van varkens en die kunnen aangeven hoe deze door een (voeder)interventie mogelijk kunnen worden verbeterd. Daarom kan dit onderzoek niet in een andere diersoort worden gedaan.

Herkomst: We maken gebruik van dieren in gesloten bedrijven in de reguliere commerciële varkenshouderij.

Geschatte aantal: 400 (50% mannetjes, 50% vrouwtjes).

Levensfase: De biggen worden bemonsterd (mest en bloed) op één leeftijd: 15 dagen of 8 weken (afhankelijk van de resultaten van een eerder experiment binnen hetzelfde project).

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Varken	Licht	400	

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.

Vervanging: Doel is om potentiële biomerkers in mest-of bloedmonsters te valideren, indien die in een eerdere proef binnen hetzelfde project zijn gevonden. Het gaat dan om biomerkers in biggen die iets zeggen over weerstand en veerkracht van varkens en die kunnen aangeven hoe deze door een (voeder)interventie mogelijk kunnen worden verbeterd. Daarom kan dit onderzoek niet in een andere diersoort of in een ex vivo of in vitro model worden gedaan. Daarbij is de darm een complex en dynamisch orgaan met verschillende celtypen en de microbiota. Het gedrag van het gehele (darm)systeem, in samenwerking met andere organen, zorgt voor de metabolietprofielen in bloed en mest. Vermindering: Uit eerder onderzoek binnen onze groep kan wel een schatting worden verkregen van de variatie in metabolietconcentraties tussen dieren, maar niet in relatie tot individuele diergezondheid of ziekteverstand. Omdat de in dit onderzoek beoogde correlaties niet vooraf bekend zijn kan het benodigde aantal dieren niet met zekerheid worden bepaald. Wel kunnen wij gebruik maken van eerder onderzoek naar biomerkers voor continue grootheden uit ons eigen onderzoek en uit de literatuur. Op basis daarvan is gekozen voor het in het huidige projectvoorstel genoemde aantal dieren. Verder is er mogelijke vermindering door gebruik te maken van een beslismoment tussen deze dierproef en een eerdere dierproef binnen hetzelfde project: Als in die eerdere dierproef geen geschikte potentiële biomerkers worden gevonden zal de hier beschreven dierproef niet worden uitgevoerd. Verfijning: Bij het nemen van de bloed- en mestmonsters ondervinden de dieren gering ongerief. Er is geen verdere verfijning mogelijk.

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

Bij het nemen van de bloed- en mestmonsters ondervinden de dieren gering ongerief. Bij eventueel benodigde rectale stimulatie voor het verkrijgen van een rectaal mestmonster zal de stimulatie voorzichtig worden uitgevoerd. Ook zullen de dieren zo rustig mogelijk worden benaderd voor monsternemen, om zo stress en angst minimaal te houden.

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.

Het gaat hier in het tweede dierexperiment om specifieke validatie van potentiële biomerkers die in het eerste dierexperiment gevonden zullen gaan worden. Deze validatie is (dus) nog niet eerder verricht. Verder hebben wij een literatuur search gedaan. Uit deze search bleek dat er geen (potentiële) biomerkers in biggen bekend zijn die een voorspelling geven van hun weerstand en veerkracht in het verdere leven. In de gevonden

relevante literatuur wordt juist geconcludeerd dat er wel behoefte is aan dergelijke biomerkers, maar dat die nog niet bestaan. Zie bijvoorbeeld Niewold, TA (2015) Intestinal health biomarkers in vivo. (http://dx.doi.org/10.3920/978-90-8686-792-9_).

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.

We maken gebruik van dieren in gesloten bedrijven in de reguliere commerciële varkenshouderij. Er zullen dierhandelingen worden uitgevoerd die niet vallen onder de reguliere dierhouderij: Het nemen van bloed- en mestmonsters van de varkens zijn dierhandelingen die vallen onder de wet op de dierproeven.

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.

De varkens worden gehouden op commerciële varkenshouderijbedrijven. Het betreft bedrijven die intensief samenwerken met 

.

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

Gekozen is voor onderzoek op praktijkbedrijven omdat we willen dat de te vinden biomerkers bruikbaar zijn op praktijkbedrijven. Huisvesting en verzorging zal in principe plaatsvinden volgens de geldende bedrijfsvoering op dat bedrijf. Het nemen van de bloed- en mestmonsters zal op het bedrijf worden uitgevoerd door erkende biotechnici van het project-researchteam.

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.

Het betreft bloedprikken. De pijn wordt veroorzaakt door de naald. De pijn wordt dermate gering geacht dat (bij mens en dier) nooit een pijnstillend (bijvoorbeeld lidocaïne zalf) wordt toegepast op de te prikken plek.

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Angst en stress tijdens het nemen van de bloed- en mestmonsters.

Explain why these effects may emerge.

Voor het nemen van de bloed- en mestmonsters moeten de biggen kort worden vastgehouden. Dit kan angst en stress veroorzaken. Bij het nemen van de mestmonsters zullen de dieren indien nodig voorzichtig rectaal gestimuleerd worden. Dit kan pijn, angst, en stress veroorzaken.

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

Bij eventueel benodigde rectale stimulatie voor het verkrijgen van een rectaal mestmonster zal de stimulatie voorzichtig worden uitgevoerd. Ook zullen de dieren zo rustig mogelijk worden benaderd voor monsternemen, om zo stress en angst minimaal te houden.

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).

Licht

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

De dieren worden niet voor de proef gedood, maar worden na het bereiken van het normale slachtgewicht regulier geslacht. Wel zullen na het slachten ten behoeve van de proef de volgende organen worden verzameld: long, lever, darmen.

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



Postbus 65 | 8200 AB Lelystad

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Wageningen
University & Research

DATUM
23 mei 2017

ONDERWERP
aanvraag projectvergunning
AVD401002016634

ONS KENMERK
AVD401002016634

POSTADRES



BEZOEKADRES



INTERNET
www.wur.nl

KVK NUMMER
09098104

CONTACTPERSOON



TELEFOON

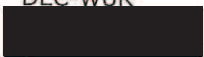


E-MAIL
DEC@wur.nl

Geachte CCD,

Onderstaand het advies dat de DEC-WUR heeft gegeven aangaande het project
"Biomerkers voor darmgezondheid en immuuncompetentie in varkens"

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: **AVD401002016634**
2. Titel van het project: Biomerkers voor darmgezondheid en immuuncompetentie in varkens
3. Titel van de NTS: Biomerkers voor darmgezondheid en immuuncompetentie in varken
4. Type aanvraag: nieuwe aanvraag
5. Contactgegevens DEC:
DEC-WUR

Secretaris: dec@wur.nl
6. Adviestraject
Ontvangen door DEC: 29-03-2017
Aanvraag compleet: 29-03-2017
In vergadering besproken: 18-04-2017
Termijnonderbreking(en) van 20-04-2017 tot 17-05-2017
Aanpassing aanvraag: 17-05-2017
Advies aan CCD: zie datum brief
7. De Instantie voor Dierenwelzijn heeft een positief oordeel over de kwaliteit van de aanvraag uitgebracht en de DEC heeft dit in haar overweging betrokken.
8. Correspondentie met de aanvrager
Datum vragen: 20-04-2017
Gestelde vragen en antwoorden:
 - Het directe doel is het inventariseren van metabolieten/biomarkers in het bloed of de feces van varkens in de houderij teneinde hierop te kunnen interveniëren om varkens gezonder te maken. De DEC merkt op dat zij de omschrijving zoals in het project door de onderzoeker gegeven (het vinden van metabolieten voor voedingsinterventies), minder duidelijk vindt.
 - *Wij hebben nu de tekst van hoofdstuk 3.2 Doel in het projectvoorstel op dit punt aangepast en uitgebreid, en voor een deel tekst die was geplaatst onder 3.2 Doel, haalbaarheid verplaatst naar 3.2 Doel, algemene doelstelling. Ook de nu toegevoegde uitgebreide literatuur en*

motivatie in hoofdstuk 3.2 Doel, haalbaarheid zal de doelen duidelijker maken.

Wij hebben ook de nummering van de proefdiergroepen veranderd, en de tekst aangepast in hoofdstuk 3.4.1 Onderzoeksstrategie in de beschrijving van 'Fase 1'. Op deze manier wordt duidelijker wat de doelen zijn en tevens wordt duidelijker dat we een go/no-go punt hebben na de eerste proefdiergroep.

- Er worden weinig referenties genoemd die de kennis en kunde van de onderzoeksgroep onderbouwen. De DEC vindt de gedachtengang navolgbaar maar vraagt zich af waar men naar op zoek is. Welke metabolieten? Hoe ga je dat doen? Hoe kies je de parameters? Wordt de hydrofiele of hydrofobe fractie in de NMR genomen, hoe worden de metabolieten geëxtraheerd? Dit lijkt niet onderbouwd te zijn in het project waardoor het lijkt dat er gezocht wordt naar een speld in een hooiberg. De DEC wil dat de keuzes in het project duidelijk genoemd en meer onderbouwd worden. Zo een de nadere aanduiding van de aard van het microbiom/metabolieten aangegeven moeten worden op basis van eerder onderzoek.

Wij hebben nu de tekst van het projectvoorstel op dit punt aangepast en uitgebreid. In het hoofdstuk 3.2 Doel, Haalbaarheid, is nu uitvoerig beschreven hoe wij, op basis van

[REDACTED] bredere literatuur, hebben gekozen voor het zoeken naar metabolieten in bloed en mest als potentiële biomerkers voor

[REDACTED]
meer detail beschreven met welke methode en in welke fracties wij de metabolieten zullen analyseren In het hoofdstuk 3.4.1 Onderzoeksstrategie.

- In 3.4.1. van de projectbeschrijving wordt aangegeven dat alleen in groep 3 gekeken wordt naar een relatie met de gezondheidsstatus. In groep 1 en 2 wordt alleen gekeken naar het microbiom. Waarom wordt er in deze groepen ook niet gekeken naar een relatie met gezondheidsstatus?
- *Wij hebben de nummering van de proefdiergroepen veranderd en de tekst aangepast in hoofdstuk 3.4.1 Onderzoeksstrategie in de beschrijving van 'Fase 1'. Op deze manier wordt duidelijker wat de doelen zijn en naar welke parameters in de verschillende proefdiergroepen zal worden gekeken. Tevens wordt duidelijker dat we een go/no-go punt hebben na de eerste proefdiergroep. Groep 1 (nu gebruikte nummering) biggen zullen leven tot aan het bereiken van het slachtgewicht, en van deze dieren hebben we de gehele 'levensgeschiedenis' wat betreft gezondheid/ ziektes Ook hebben we van deze groep bloed en mestmonsters op drie belangrijke momenten gedurende dat leven (dag 15, week 8, en net voor slachten). Het is in deze groep dieren waarin gezocht wordt naar correlaties tussen mogelijke biomerkers (metabolieten van bloed en mest) en de gezondheidsstatus. Het doel is dat biomerkers gevonden worden die een voorspellende waarde hebben voor de gezondheid van het dier in het latere leven; daarom worden gegevens gedurende het gehele leven verzameld. De andere twee proefdiergroepen (Groepen 2 en 3, huidige nummering) dienen een ander doel. In deze groepen wordt gekeken naar de relatie van dezelfde mogelijke biomerkers met kenmerken van het darm-microbiom en van weefselmonsters, op respectievelijk 15 dagen en 8 weken leeftijd. Het doel hiervan is om aanwijzingen te krijgen van de onderliggende mechanismen van de gevonden correlaties, om voorspellingen te kunnen doen hoe deze kenmerken door (voer) interventies kunnen worden beïnvloed. In deze groepen wordt dus wel degelijk naar aanwijzingen voor ziekte en gezondheid, groeisnelheid en naar (rest)laesies in verschillende organen gekeken maar uitsluitend op, c.q. tot aan een leeftijd van respectievelijk 15 dagen en 8 weken.*
- Omdat er weinig over bekend is, is het aantal dieren gebaseerd op "best educated guess". De DEC wil weten hoe de variatie tussen en binnen bedrijven voldoende geborgd is. Een voldoende spreiding is immers cruciaal voor de uitkomsten.

Om voldoende spreiding te kunnen waarborgen tussen en binnen de bedrijven is er gekozen om een aantal criteria vast te stellen met experts van ██████████ denk hierbij aan gezondheids- en aan performance gerelateerde kenmerken. Er is actief gezocht naar bedrijven die uiteenlopend scoren op deze kenmerken om zo voldoende spreiding te krijgen voor ons onderzoek. We hebben deze beschrijving toegevoegd aan hoofdstuk 3.4.1 Onderzoeksstrategie in het projectvoorstel en ook aan de annex voor "Type of Animal Procedures".

- In het kader van vermindering wil de DEC weten of de monsters opgeslagen worden om bij vorderend inzicht in de toekomst nog eens te kunnen bekijken.

De monsters en data zullen worden opgeslagen en blijven beschikbaar voor de bredere wetenschappelijke gemeenschap. We hebben dit nu expliciet vermeld in het voorstel, in Hoofdstuk 3.4.1 Onderzoeksstrategie.

- De onderzoeker vermeldt niets over de gebruikte sekses. De DEC gaat er dan ook van uit dat beide sekses in gelijke mate gebruikt worden in het project.

Dit klopt. Het stond al wel vermeld in de beschrijving van 'Fase 2' in Hoofdstuk 3.4.1 Onderzoeksstrategie, maar het ontbrak in de beschrijving van 'Fase 1'. Dit is nu aangepast in de Project proposal en in de annex voor "Type of Animal Procedures".

De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

DATUM

23 mei 2017

ONS KENMERK

AVD401002016634

PAGINA

3 van 5

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. De DEC heeft vastgesteld dat het project vergunningplichtig is (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag is een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om over de aanvraag te adviseren vanuit het oogpunt van onafhankelijkheid, onpartijdigheid en beschikbare expertises.

C. Beoordeling (inhoud)

1. De DEC heeft vastgesteld dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.
2. De DEC heeft geen tegenstrijdige wetgeving, gericht op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort, signaleerd die het uitvoeren van de proef in de weg kan staan.
3. De DEC heeft vastgesteld dat de in de aanvraag aangekruiste doelcategorie in overeenstemming is met de hoofddoelstelling.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van de aanvraag is het inventariseren van metabolieten/biomerkers in het bloed of de feces van varkens in de houderij teneinde hierop te kunnen interveniëren om varkens gezonder te maken. Het uiteindelijke doel is volgens de DEC het leveren van een bijdrage aan het monitoren van diergezondheid zodat bij het signaleren van problemen maatregelen, b.v. via voedingsinterventies, genomen kunnen worden. De DEC heeft vastgesteld dat er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen en dat het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld.
5. De belanghebbenden in het project en hun morele waarden zijn:
 - Proefdieren: aantasting van welzijn en integriteit
 - Doeldieren: door nu onderzoek te doen naar metabolieten/biomerkers om hierop te kunnen sturen is het wellicht mogelijk dat de varkens een betere gezondheid zullen hebben en houden gedurende hun leven
 - Veehouder: economisch belang, beter draagvlak voor de houderij
 - Onderzoeker/CRO: economisch belang
 - Producent interventies: economische belang
 - Consument/maatschappij: houderij sluit beter aan bij maatschappelijke verwachtingen en waarden
6. Voor zover de DEC dat kan inschatten is er geen sprake van substantiële milieueffecten. Mogelijk zou in de toekomst het gebruik van geneesmiddelen/antibiotica verminderd kunnen worden.

7. De DEC heeft, na schriftelijke toelichting van de onderzoeker, vastgesteld dat de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven, afgaande op het geschreven voorstel en het oordeel van de IvD, voldoende gewaarborgd zijn.
8. De DEC heeft, na schriftelijke toelichting van de onderzoeker vastgesteld dat het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstelling. De gekozen strategie en experimentele aanpak kan in de ogen van de DEC leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.

Welzijn dieren

9. Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren: De dieren worden op praktijkbedrijven, buiten de instelling, gehouden.
10. Gevolg hiervan is dat de huisvesting en verzorging af zal wijken van de Wod. De keuze om op de experimenten op praktijkbedrijven uit te voeren is in de ogen van de DEC legitiem. Dit is nodig om bij een diversiteit aan bedrijven steeds een correlatie te onderzoeken om de kans op toevallige of bedrijfsgebonden correlaties te verkleinen.
11. De DEC stelt vast dat een cumulatieve inschatting van ongerief als "licht" realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Ongerief in de experimenten zal bestaan uit: bloedafname, mestbemonstering en euthanasie.
12. Naast ongerief is er geen sprake van aantasting van integriteit van het dier anders dan als gevolg van de proefbehandelingen.
13. De DEC heeft vastgesteld dat er in dit project geen humane eindpunten verwacht worden. Dit lijkt de DEC reëel ingeschat.

3 V's

14. De DEC heeft vastgesteld dat de onderzoeker voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen alternatieven zijn om de doelstelling van het project te realiseren. Het onderzoek is alleen uit te voeren in het doeldier.
15. De DEC heeft, na schriftelijke verduidelijking van de onderzoeker, vastgesteld dat de onderzoeker voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er optimaal tegemoet gekomen wordt aan de vereiste van vermindering van dierproeven.
16. De DEC heeft vastgesteld dat het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven. De DEC zien geen extra mogelijkheden voor verfijning, anders dan die de onderzoeker nu toepast.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. De dieren worden van beide geslachten in gelijke mate ingezet in de proeven.
19. De dieren worden gedood in het kader van het project. Dit is nodig omdat men onderzoek wil doen aan het darmmicrobioom en de genexpressie in het darmslijmvlies. Tevens wil men laesies beoordelen. M.u.v. de oudste dieren worden de dieren geëuthanaseerd. De oudste dieren worden geslacht. Naar aanleiding hiervan heeft de DEC gevraagd of het wettelijk is toegestaan om dieren op het bedrijf te euthanaseren. De IvD geeft aan dat dit praktisch uitvoerbaar is en wettelijk is toegestaan. De dieren worden gedood volgens een passende methode die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU.

NTS

21. De NTS is naar het oordeel van de DEC een evenwichtige weergave van het project, begrijpelijk geformuleerd en voldoet aan de vereisten in de herziene Wod Art. 10.a.1.7.

D. Ethische afweging

1. De centrale morele vraag van het project is: rechtvaardigt onderzoek naar parameters voor de gezondheid van varkens door middel van het inventariseren van metaboliëten/biomerkers in bloed/feces het lichte ongerief dat 760 varkens ondergaan?
2. De DEC constateert dat het hier gaat om een aanvraag met voldoende samenhang. De DEC heeft meegewogen dat het onderzoek bij kan dragen aan het monitoren van diergezondheid. Als dit onderzoek zijn doel bereikt dan heeft dit een reële bijdrage voor de waarden voor gezondheid van de varkens. Het economisch

belang voor de veehouder is in die situatie gering. De onderzoeker [REDACTED] en de [REDACTED] hebben beide een economisch belang. De DEC heeft dit meegewogen als een beperkt belang. Ook het belang van de maatschappij/consument, een houderij, die beter aansluit bij maatschappelijke verwachtingen heeft de DEC meegewogen als een beperkt belang. Tot slot zijn de waarden van de proefdieren in het geding. De dieren zullen maximaal gering nadeel ondervinden als gevolg van de handelingen in het project.

3. Op basis van bovenstaande overwegingen is de DEC van mening dat het ethisch verantwoord is om onderzoek te doen naar metabolieten/biomerkers in het bloed of de feces van varkens met maximaal gering ongerief voor maximaal 760 dieren. De DEC ziet in dit stadium geen mogelijkheden op het terrein van vervanging, vermindering van het aantal dieren en verfijning van de aanvraag. De centrale morele vraag kan met "ja" beantwoord worden.

DATUM
23 mei 2017

ONS KENMERK
AVD401002016634

PAGINA
5 van 5

E. Advies

1. Advies aan de CCD:
 - De DEC adviseert de vergunning te verlenen.
2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.
3. Onderstaand knelpunt/dilemma is naar voren gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies:
 - De DEC is zich terdege bewust van de gevolgen die de huidige intensieve veehouderij met zich meebrengt en zij neemt dat mee in haar ethische afweging. De DEC is van mening dat het welzijn van de dieren in de intensieve veehouderij onder druk staat en dat onderzoek een bijdrage moet leveren aan het verbeteren van de leefomstandigheden van de dieren. De DEC heeft echter slechts zeer beperkte invloed op de wijze waarop dit ingevuld wordt. De DEC ziet geen directe verantwoordelijkheid voor zichzelf om te sturen op de keuze voor de strategie aangezien die al plaatsvindt voor de indiening van het project. Zij kan in dit kader enkel signaleren. Vanuit dit perspectief heeft de DEC dit project beoordeeld: gegeven de huidige omstandigheden is de DEC van mening dat het project een bijdrage leveren aan het verbeteren van het welzijn (inclusief gezondheid) van de dieren. In de ogen van de DEC zijn de dierproeven niet gericht op een praktijk waarbij het welzijn van de dieren zodanig beïnvloed wordt dat dit intrinsiek tot schade aan de dieren leidt. De DEC ziet dit projecten juist als een stap naar mogelijke verbetering binnen de huidige veehouderij. De discussie over de wenselijkheid van die veehouderij-omstandigheden zal in een ander gremium dan de DEC gevoerd moeten worden.

Met vriendelijke groet

[REDACTED]

secretaris DEC WUR



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Wageningen research

Postbus 59

6700 AB WAGENINGEN



**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
AVD401002016634

Bijlagen

2

Datum 4 april 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED],

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 3 april 2017. Het gaat om uw project "Biomerkers voor darmgezondheid en immuuncompetentie in varkens". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD401002016634. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

Datum:

4 april 2017

Aanvraagnummer:

AVD401002016634

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
4 april 2017
Aanvraagnummer:
AVD401002016634

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 40100
Naam instelling of organisatie: Stichting Wageningen research
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: [REDACTED]
Straat en huisnummer: Akkermaalsbos 12
Postbus: 59
Postcode en plaats: 6700 AB WAGENINGEN
IBAN: NL10RABO0397066465
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: Wageningen UR

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [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 april 2017

Aanvraagnummer:

1002016634

Over uw project

Geplande startdatum:

1 mei 2017

Geplande einddatum:

1 mei 2020

Titel project:

Biomerkers voor darmgezondheid en immunocompetentie in varkens

Titel niet-technische samenvatting:

Biomerkers voor darmgezondheid en immunocompetentie in varken

Naam DEC:

DEC Wageningen UR

Postadres DEC:

Droevendaalsesteeg 4, 6708 PB Wageningen

E-mailadres DEC:

dec@wur.nl

Betaalgegevens

De leges bedragen:

€ 1.287,-

De leges voldoet u:

na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen:

- Projectvoorstel
 Beschrijving Dierproeven
 Niet-technische samenvatting

Ondertekening

Naam:

[Redacted]

Functie:

[Redacted]

Plaats:


Wageningen

Datum:

3 april 2017



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Wageningen University and Research Concernstaf+
t.a.v. Crediteurenadministratie
Droevendaalsesteeg 4
6708 PB WAGENINGEN


**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
AVD401002016634
Bijlagen
2

Datum 4 april 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 4 april 2017
Vervaldatum: 4 mei 2017
Factuurnummer: 170634
Ordernummer: WUR1049359

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD401002016634	€ 1.287,00

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

Van: info@zbo-ccd.nl
Verzonden: dinsdag 4 april 2017 10:58
Aan: dec@wur.nl
Onderwerp: Verzoek om advies over projectvergunningaanvraag AVD401002016634
Bijlagen: AVD401002016634_Animal_Procedure1.pdf; AVD401002016634_NTS_ontsmet.pdf; AVD401002016634_Animal_Procedure2.pdf; AVD401002016634_Aanvraagformulier_ProjectVergunning_.pdf; AVD401002016634_Project_Proposal.pdf

Categorieën: Nieuwe aanvraag (of nummer): [REDACTED]

Geachte leden van DEC Wageningen UR

De Centrale Commissie Dierproeven (hierna: CCD) verzoekt u in het kader van vergunningverlening (of wijziging van een vergunning) advies te geven over het project met als titel: "Biomerkers voor darmgezondheid en immuuncompetentie in varkens" en aanvraagnummer: AVD401002016634.

Uw commissie wordt verzocht op grond van artikel 10.a.2 van de Wet op de dierproeven de aanvraag te beoordelen en een ethische toetsing uit te voeren waarbij wordt afgewogen of de doelstelling van het project, de verwachte voordelen voor mens, dier of milieu en de haalbaarheid van de doelstellingen, het gebruik van dieren en de schade die zal worden toegebracht aan de dieren in de vorm van lijden, pijn en angst kan rechtvaardigen.

Graag ontvangen wij van u bericht dat deze e-mail goed is ontvangen en wanneer u dit advies in de vergadering gaat bespreken.

Voor het in te dienen advies dient de DEC gebruik te maken van de meest actuele versie van het op de website van de CCD gepubliceerde Format DEC-advies en de toelichting daarbij. U dient deze aanvraag vertrouwelijk te behandelen. Voor de communicatie met de CCD dient u gebruik te maken van de beveiligde verbinding.

De CCD verzoekt u uiterlijk binnen 20 werkdagen, na 04-04-2017, uw advies bij de CCD in te dienen. Indien de aanvraag door uw commissie niet in behandeling kan worden genomen, dient u dit per ommegaande per e-mail aan de CCD te melden.

Ingeval uw commissie tussentijds aanvullende informatie wil inwinnen bij de aanvrager kan de termijn worden opgeschort. U dient de CCD zo spoedig mogelijk op de hoogte te stellen van deze opschorting. Zodra de opschortende termijn is beëindigd, stelt u de CCD hiervan onverwijld op de hoogte. Opschorting van de adviestermijn vindt niet plaats ingeval u ten behoeve van uw advies een onafhankelijk extern expert raadpleegt.

Met vriendelijke groeten,

CCD



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Wageningen research

Postbus 59

6700 AB WAGENINGEN



**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
AVD401002016634

Datum 4 april 2017

Betreft Vervolg aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte ██████████,

Op 3 april 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Biomerkers voor darmgezondheid en immuuncompetentie in varkens" met aanvraagnummer AVD401002016634.

DEC advies gevraagd

Uw aanvraag is naar DEC Wageningen UR gestuurd. Zij zal hierover advies aan de CCD uitbrengen. Als de DEC vragen heeft, zal zij contact met u opnemen.

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Wageningen research

Postbus 59

6700 AB WAGENINGEN



**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

AVD401002016634

Bijlagen

1

Datum 6 juni 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 3 april 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Biomerkers voor darmgezondheid en immuuncompetentie in varkens" met aanvraagnummer AVD401002016634. 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 "Biomerkers voor darmgezondheid en immuuncompetentie in varkens" starten. De vergunning wordt afgegeven van 6 juni 2017 tot en met 1 mei 2020.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Wij hebben advies gevraagd bij de Dierexperimentencommissie DEC Wageningen UR. Dit advies is opgesteld op 23 mei 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Er worden

aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

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

Datum:

6 juni 2017

Aanvraagnummer:

AVD401002016634

Bezwaar

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen.

Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

Bij het indienen van een bezwaarschrift vragen we u in ieder geval de datum van de beslissing waartegen u bezwaar maakt en het aanvraagnummer te vermelden. U vindt deze nummers in de rechter kantlijn in deze brief.

Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige voorziening vragen bij de Voorzieningenrechter van de rechtbank in de woonplaats van de aanvrager. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisend belang.

Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op

<http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

Meer informatie

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

Centrale Commissie Dierproeven


Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Stichting Wageningen research

Adres: Postbus 59

Postcode en plaats: 6700 AB WAGENINGEN

Deelnemersnummer: 40100

deze projectvergunning voor het tijdvak 6 juni 2017 tot en met 1 mei 2020, voor het project "Biomerkers voor darmgezondheid en immuuncompetentie in varkens" met aanvraagnummer AVD401002016634, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Wageningen UR. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is .

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 3 april 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 23 mei 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 23 mei 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 23 mei 2017, ontvangen op 23 mei 2017.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Monstername van bloed- en mestmonsters van biggen, en euthanaseren				
	Varkens (<i>Sus scrofa domesticus</i>) /	360	Licht	
3.4.4.2 Monstername van bloed- en mestmonsters van biggen				
	Varkens (<i>Sus scrofa domesticus</i>) /	400	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.

Aanvraagnummer:
AVD401002016634

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:

AVD401002016634

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:

AVD401002016634

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.

Locatie

De vergunning wordt verleend voor een project waarbij dierproeven geheel of gedeeltelijk worden verricht buiten een inrichting van een gebruiker (artikel 10g van de wet).

Inventaris Wob-verzoek W17-11		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	documenten NTS2017881	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
1	Aanvraagformulier				x		x		
2	Projectvoorstel				x		x		
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1				x		x		
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2				x		x		
6	DEC-advies				x		x		
7	Ontvangstbevestiging				x		x		
8	Verzoek aanvulling aanvraag				x		x		
9	Reactie verzoek aanvulling				x		x		
10	Advies CCD		x						x
11	Beschikking en vergunning				x		x		



Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in	50200
		<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	[Redacted]
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]
		KvK-nummer	[Redacted]
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	Straat en huisnummer	[Redacted] 161
		Postbus	[Redacted]
		Postcode en plaats	[Redacted]
		IBAN	N [Redacted]
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	[Redacted]
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[Redacted] [Redacted] [Redacted]
		Functie	Afdelingshoofd
		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] [Redacted] [Redacted]
		Functie	Postdoc 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 | [REDACTED] | X Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
| Functie | Afdelingshoofd | |
| Afdeling | [REDACTED] | |
| Telefoonnummer | + | |
| E-mailadres | [REDACTED] | |
- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?
- Ja > Stuur dan het ingevulde formulier *Melding Machtiging* mee met deze aanvraag
- Nee

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- | | |
|------------|----------------|
| Startdatum | 01 - 08 - 2017 |
| Einddatum | 01 - 08 - 2022 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Evaluatie van therapieën voor de behandeling van multiple sclerose
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Evaluatie van nieuwe kandidaat-geneesmiddelen voor de behandeling van multiple sclerose
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|------------|
| Naam DEC | [REDACTED] |
| Postadres | [REDACTED] |
| E-mailadres | [REDACTED] |

4 Betaalgegevens


- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1187 Lege
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen. 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
- beschrijving dierproeven

6 Ondertekening


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

Naam 

Functie Adjunct Directeur

Plaats 

Datum 1 - 5 - 2017

Handtekening 



Format Projectvoorstel dierproeven

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

1 Algemene gegevens

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

2 Categorie van het project

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

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

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

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

Wat is MS? Multiple sclerose (MS) is een zeer ernstige chronische aandoening die de zenuwbanen in het

centrale zenuwstelsel (CZS) aantast. De ziekte treft vooral jong volwassenen (start tussen 20 – 50 jaar) met een incidentie van 1 op 1000. MS is daarmee na trauma de belangrijkste neurologische ziekte in jong volwassenen. Er zijn circa 17.000 MS patiënten in Nederland. Een Amerikaanse studie uit 2013 laat zien dat de jaarlijkse kosten voor behandeling en zorg per MS patiënt afhankelijk van de behandeling tussen 10.000 en 50.000 USD bedragen [1].

In ongeveer 80% van de gevallen begint de ziekte met een relapsing-remitting (RR-MS) beloop waarbij episodes met neurologische klachten (relapse) alterneren met gedeeltelijk of zelfs geheel herstel (remissie). Rond de leeftijd van 40 jaar verandert de ziekte naar een progressief beloop (secundair progressieve MS, SP-MS) en vindt er nauwelijks herstel meer plaats. Een van de belangrijkste vragen in het MS onderzoek, waar wij een bijdrage aan willen leveren, is wat er verandert bij de overgang van RR naar SP-MS. In een minderheid van de patiënten openbaart de ziekte zich als progressief vanaf het begin (primaire progressieve MS, PP-MS).

De meest voorkomende symptomen zijn ernstige vermoeidheid, tijdelijke blindheid, verminderde mobiliteit, spierzwakte, incontinentie, stijfheid, en onhandigheid en slepen van de benen (meestal asymmetrisch). Uiteindelijk kan de ziekte leiden tot gedeeltelijke of gehele verlamming van de ledematen. Naast motorische problemen ontstaan er ook problemen met geheugen en concentratie, de zogeheten cognitieve problemen, die de kwaliteit van leven ernstig beïnvloeden [2, 3]. Patiënten met gevorderde MS hebben een sterk verminderde kwaliteit van leven, moeten al snel stoppen met werken en alhoewel MS in het algemeen niet dodelijk is, kunnen MS patiënten wel eerder overlijden als gevolg van infecties, zoals een longontsteking.

Oorzaak van MS: De oorzaak van MS is onbekend [4], maar uit epidemiologische studies blijkt dat de interactie tussen genetische en omgevingsfactoren een belangrijke rol speelt. Genetische studies tonen een bijdrage aan van meer dan 200 genen aan de predispositie voor MS, hoewel de rol van individuele genen met uitzondering van major histocompatibility complex (MHC) genen beperkt is. De overgrote meerderheid van de gevonden genen heeft een functie in het immuunsysteem. Omgevingsfactoren die een rol spelen bij MS zijn onder andere vitamine D, roken en infectie met de herpesvirussen Epstein-Barr virus (EBV) en cytomegalovirus (CMV) [5] [6]. Het is echter onduidelijk hoe de bijdrage van deze factoren en hun interactie mechanistisch in elkaar zit. De notie dat het immuunsysteem een centrale rol speelt in het ziekteproces maakt het een belangrijk onderwerp van preklinisch onderzoek alsmede een doelwit voor therapeutische interventie.

Pathologische aspecten van MS: De pathologie van MS kenmerkt zich door laesies in het ruggenmerg en de hersenen, zowel in de witte als de grijze stof. Er zijn infiltraten van immuuncellen aanwezig (macrofagen, B-cellen en T-cellen), er is schade aan myeline (demyelinisatie), de isolerende laag rond zenuwuitlopers (axonen), en beschadiging van de axonen. Laesies in de witte stof van het centrale zenuwstelsel zijn het belangrijkste kenmerk van MS en komen voor in RR-MS en de progressieve vormen. Grijze stof laesies zijn een typisch kenmerk van de progressieve fase van de ziekte; deze veroorzaken veel van de cognitieve problemen.

Behandeling: Op dit moment zijn er 14 therapieën officieel goedgekeurd voor RR-MS. Dit zijn biologicals als IFN-beta en fingolimod en antilichamen gericht tegen B-cellen (zoals rituxumab) of tegen de migratie van lymfocyten naar de hersenen (zoals natalizumab). Deze therapieën remmen met name de ontstekingsactiviteit van T-cellen en macrofagen. Daarmee wordt voorkomen dat de ziekte verergert, maar de patiënt wordt niet beter aangezien de myeline-laag en zenuwcellen onherstelbaar beschadigd zijn. De huidige therapieën werken maar in een deel van de patiënten met RR-MS [7] en ze hebben nauwelijks effect in de progressieve fase van MS. Tevens kunnen er ernstige bijwerkingen ontstaan, zoals reactivatie van virussen en autoimmuun-reacties gericht tegen bijvoorbeeld de schildklier. Daarom zullen ook de komende jaren nog veel nieuwe therapieën tegen MS ontwikkeld en getest moeten worden. Voor de progressieve vormen van MS (SP-MS en PP-MS) zijn er nog geen medicijnen beschikbaar. Dit komt doordat de pathogene mechanismes tijdens progressieve MS alsmede het precieze verschil met RR-MS nog onbekend zijn. Tevens is er nog geen goed diermodel voor progressieve MS bekend, maar zoals hieronder beschreven wordt deze fase van MS het beste gemodelleerd in het marmoset model voor MS.

Het EAE model: Een van de best gekarakteriseerde diermodellen voor MS is experimentele autoimmuun encefalomyelitis (EAE); het model is ontwikkeld in ratten, muizen en niet-humane primaten (NHP) [8, 9]. Het muizen EAE model wordt veel gebruikt voor basaal onderzoek alsmede het testen van nieuwe

kandidaat-geneesmiddelen. Het muizen EAE model heeft in belangrijke mate bijgedragen aan de huidige inzichten in de ziekte mechanismes van MS. In het muizen EAE model zijn diverse therapieën ontwikkeld die gebruikt worden voor de behandeling van RRMS. Een voorbeeld daarvan is de monoclonale antistof natalizumab, dat de entree van immuuncellen in het CNS blokkeert. Er is echter een lange lijst van aanvankelijk veelbelovende kandidaat geneesmiddelen die de vertaling van diermodel naar MS patiënt niet hebben overleefd vanwege onverwachte toxiciteit of onwerkzaamheid. Het wordt in toenemende mate duidelijk dat het muizen EAE model zeer bruikbaar is voor fundamenteel onderzoek aan bepaalde facetten van MS, met name de rol van ontstekingscellen, maar dat het door de afwezigheid van immunologische mechanismes die werkzaam zijn in de chronische fase van MS niet goed bruikbaar is voor geneesmiddelenontwikkeling.

In bepaalde opzichten lijkt het muizen-model niet goed op MS. In het muizen EAE model zitten de laesies alleen in het ruggenmerg, terwijl in MS vooral ook de hersenen zijn aangetast. Tevens lijken deze laesies qua complexiteit niet goed op de laesies in MS patiënten [10]. Ook is er een verschil wat betreft het immuun mechanisme dat tijdens de ziekte een rol speelt: in het muizen EAE model spelen voornamelijk de CD4+ T-helper cellen een rol, terwijl in MS CD8+ killer T cellen het belangrijkste lijken te zijn.

De common marmoset (*Callithrix jacchus*), ook wel het penseelaapje genoemd, is een belangrijk diermodel voor humane ziektes [11, 12], waaronder MS. Het EAE model in de huidige sterk verfijnde vorm is het resultaat van een stapsgewijs reductionistisch proces en heeft zich de afgelopen twee decennia ontwikkeld tot een zeer solide, relevant en goed gevalideerd preklinisch model voor MS [13-15].

Bijzondere eigenschappen van het marmoset EAE model:

- Een direct gevolg van de verfijning van het outbred marmoset EAE model is dat het effect van de genetische heterogeniteit tot uitdrukking komt in een grotere variatie in de respons op de immunisatie en de respons op behandeling. Een dergelijke variatie wordt ook gezien in de MS patiënten populatie. Dit effect kan worden gecompenseerd door studies op te zetten in beenmerg chimere tweelingen, die ondanks genetische verschillen immunologisch sterk vergelijkbaar zijn.
- De klinische symptomen van MS zijn goed terug te zien in het model, o.a. evenwichtsstoornissen en (in)complete verlamming;
- Er is pathologie in de hersenen en het ruggenmerg, terwijl het muizen-EAE vooral wordt gekenmerkt door pathologie in het ruggenmerg;
- Er zijn laesies niet alleen in de witte stof, maar vooral ook in de grijze stof van de hersenen, waardoor het marmoset EAE model te gebruiken is als model voor progressieve MS;
- De laesies in het marmoset EAE model worden gekarakteriseerd door oxidatieve schade en redistributie van ijzer afkomstig uit oligodendrocyten. De patronen zijn sterk vergelijkbaar met MS (Dunham et al in progress). Deze aspecten zijn afwezig in de huidige EAE modellen in SPF muizen [10];
- Een belangrijk verschil tussen de modellen in onder specific pathogen free (SPF) condities gefokte knaagdieren en de onder conventionele condities gefokte marmoset is de maturiteit van het immuunsysteem. Voor inductie van EAE in immunologisch immature SPF muizen moeten sterke bacteriële adjuvantia worden gebruikt, zoals compleet Freund's adjuvant en Bordetella pertussis (toxine) terwijl voor EAE inductie in immunologisch goed-ontwikkelde marmoset het veel mildere incompleet Freund's adjuvant volstaat. Deze verfijning impliceert niet alleen een aanmerkelijke reductie van het ongerief van ziekte inductie door immunisatie voor het dier, maar levert ook een veel relevanter model op voor translationele studies naar de pathogenese en behandeling van MS dan de vigerende knaagdiermodellen [15, 16].
- Voor wat omgevingsfactoren betreft ondersteunt ons onderzoek in het marmoset model voor MS het concept dat infectie met bepaalde herpesvirussen (CMV en EBV) hyperreactiviteit van het immuunsysteem tegen myeline eiwitten induceert [6]. De verfijning zoals hierboven beschreven is gebaseerd op de reactivatie van effector-geheugen T cellen in het immuunrepertoire van de primate. Eerder onderzoek toonde aan dat het repertoire waaruit deze auto-agressieve T-cellen afkomstig zijn, worden aangelegd als reactie op chronisch latente infectie met cytomegalovirus (CMV). Bij de activatie spelen B-cellen geïnfecteerd met een aan Epstein Barr Virus verwant γ 1-herpesvirus

(CalHV3) een essentiële rol. Beide herpesvirussen hebben pathogene relevantie voor MS, maar zijn niet aanwezig in SPF knaagdieren. Pogingen om de rhMOG/IFA en MOG34-56/IFA modellen in muizen op te zetten zijn dan ook mislukt.

- Tevens heeft het marmoset EAE model een chronisch beloop; een gemiddeld experiment duurt 100-120 dagen en kan er zeer regelmatig bloed worden afgenomen voor immuun-profilering. Hierdoor kan het effect van een kandidaat-geneesmiddel op de langere termijn worden gevolgd. Een voorbeeld: op dit moment zijn er een aantal kandidaat-geneesmiddelen die de verhouding tussen de pathogene T-cel en de regulatoire T-cel veranderen. In het marmoset EAE model kan dit goed worden gevolgd doordat het een chronisch model is, terwijl een muizen-experiment gemiddeld 15 dagen duurt.
- Voor immunologisch onderzoek in het muizen EAE model wordt alleen de milt gebruikt. Voor immunologisch onderzoek in de MS patiënt is alleen het bloed beschikbaar. Deze beperking kan een vertekend beeld geven van de werkzaamheid van een kandidaat geneesmiddel. Immers, wanneer een bepaalde immunologische activiteit na behandeling niet meer in het bloed of in de milt aantoonbaar is, is het heel goed mogelijk dat de activiteit zich verplaatst heeft naar een ander immuuncompartiment. Een belangrijk voordeel van het marmoset EAE model is dat een multi-compartimentale immuunprofilering worden gedaan. Dit omvat naast bloed ook primaire (thymus en beenmerg) en secundaire (milt en lymfeklieren) lymfoïde organen.

Inductie-methode van EAE in marmosets: Er zullen twee varianten van het EAE model worden gebruikt, namelijk geïnduceerd met een recombinant eiwit, gebaseerd op het extracellulaire domein van humaan myeline oligodendrocyt glycoproteïne (rhMOG) of een van dit eiwit afgeleid peptide (residuen 34-56; MOG34-56). In het rhMOG/IFA model worden de autoimmuun-mechanismes gemodelleerd die de ziekte initiëren, namelijk pro-inflammatoire T cellen en B cellen; in het MOG34-56/IFA model worden de mechanismes gemodelleerd die de transitie naar progressieve MS mediëren, namelijk activatie van cytotoxische T cellen [17, 18]. Van het laatste model bestaat geen equivalent in knaagdieren. Tezamen bestrijken deze twee modellen de meest belangrijke aspecten van de MS pathogenese.

Beknopte samenvatting van de immunopathogenese van het EAE model:

Het marmoset EAE model wordt gebruikt voor translationeel onderzoek. Translationeel onderzoek in het marmoset EAE model geeft niet alleen antwoord op de effectiviteit van een nieuwe therapie maar leidt ook tot inzichten in het model, in MS, of in het werkingsmechanisme van de therapie. Belangrijke inzichten werden verkregen door een kritische evaluatie van de redenen waarom bepaalde therapieën goed werkzaam waren in MS, terwijl anderen faalden. De onwerkzaamheid in RRMS van een monoclonaal antistof (ustekinumab) tegen de T-cel specifieke signaalmoleculen IL-12 en IL-23 kan mogelijk worden verklaard uit het feit dat wanneer de ziekte op gang gekomen is de ziekte wordt voortgedreven door effector geheugen T cellen die niet gevoelig zijn voor IL-12 en IL-23.

Verder onderzoek gaf een mechanistische verklaring voor de slecht begrepen effectiviteit in RRMS van een monoclonaal antistof (rituximab) dat een ander type lymfocyt depleteert, de CD20+ B-cel. Wij vonden in het marmoset model dat niet alleen witte stof laesies maar ook grijze stof laesies voorkomen kunnen worden door B-cel depletie [19]. Dit is in mensen zeer lastig te onderzoeken omdat grijze stof laesies niet goed te zien zijn op MRI. Verder bleek uit een uitgebreide analyse van secundaire lymfoïde organen (milt en lymfeklieren) na B-cel depletie dat T-cellen een signaal krijgen van B-cellen waardoor ze uit de lymfoïde organen migreren. Als B-cellen worden gedepleteerd blijven T-cellen in de milt of lymfeklieren in plaats van te migreren naar de hersenen [20]. Een ander type behandeling gericht op B-cel depletie is door middel van het wegvangen van twee cytokines die B cellen nodig hebben voor hun overleving en functie (BlyS/APRIL). In tegenstelling tot rituximab bleek deze behandeling onverwacht onwerkzaam te zijn in MS. Deze B-cel depletie studies toonden aan dat B-cellen die geïnficeerd zijn met een marmoset-specifiek lymfocryptovirus verwant aan EBV een cruciale rol spelen in het model. Behandeling met het anti-CD20 antilichaam voorkwam evenals in MS de ontwikkeling van klinische symptomen en pathologie [21, 22]. In deze dieren was ook geen DNA van het lymfocryptovirus in lymfeklieren en milt meer te vinden. In dieren behandeld met een antilichaam tegen de B-cel groeifactoren BlyS of APRIL werd slechts een beperkt klinisch effect van de behandeling aangetoond hoewel een belangrijk deel van de B-cellen waren gedepleteerd; echter de met lymfocryptovirus geïnficeerde B cellen waren niet gedepleteerd. Dit komt omdat lymfocryptovirus-geïnficeerde B cellen

BLYS en APRIL niet nodig hebben voor de groei. Deze dieren ontwikkelden toch EAE [23]. Deze en andere hier niet besproken waarnemingen tonen aan dat juist de B-cellen met het lymfocryptovirus gedepleteerd moeten worden om een effect te zien op de klinische symptomen en pathologie [24, 25]. Met deze informatie is vervolgens een onderzoekslijn opgezet naar de rol van EBV in MS en EAE. In MS zijn CD8+ T-cellen erg belangrijk. Uit ons onderzoek blijkt dat het myeline-eiwit MOG in EBV+ B-cellen anders wordt geprocessed dan in gewone B-cellen, waardoor het mogelijk in MHC klasse I terecht komt en dus gepresenteerd kan worden aan CD8+ T cellen [26].

Waarom de niet-humane primaat?:

MS is een ziekte veroorzaakt door complexe interacties tussen het centrale zenuwstelsel en het gehele afweersysteem. Ook de geneesmiddelen grijpen in op deze interactie. Met de huidige stand van de proefdier vrije alternatieven is het niet mogelijk deze interactie en het effect van geneesmiddelen buiten het levende dier te bestuderen. Wanneer mogelijk zal een kandidaat-geneesmiddel eerst of alleen in een knaagdier model voor MS worden getest. Er zijn echter situaties waarin het marmoset EAE model ingezet moet worden, bijvoorbeeld in de volgende gevallen: Nieuwe geneesmiddelen kunnen met de huidige technologieën steeds specifieker voor de mens worden gemaakt, waardoor ze in knaagdieren hun aangrijpingspunt niet meer herkennen en in apen wel. Ook kan het zijn dat het pathologisch proces waarop de therapie aangrijpt in knaagdier-modellen geen rol speelt of niet aanwezig is, zoals de met lymfocryptovirus-geïnfectede B-cellen of de oxidatieve stress in grijze stof laesies.

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

Het doel van dit project is om de effectiviteit van kandidaat-geneesmiddelen tegen MS te bepalen in het diermodel voor MS, namelijk EAE in de marmoset.

Het instituut waar dit onderzoek zal worden uitgevoerd [REDACTED] heeft in de afgelopen 20 jaar grote expertise opgebouwd op het gebied van het uitvoeren van vergelijkbare studies in het EAE model. Het marmoset EAE model is gebruikt voor het testen van IFN-gamma [27] en antilichamen tegen IL-12p40 [28, 29], CD40 [30, 31], IL-17A [32], CD20 [19, 21, 22], IL-7 receptor (CD127) [33] en antilichamen tegen de B-cel groeifactoren BLYS en April [23]. Tevens is onderzocht of tolerantie geïnduceerd kan worden met een fusie eiwit dat gebruik maakt van het cholera toxine subunit en een Ig bindende regio van staphylococcus aureus protein [34]. Tenslotte is het model gebruikt om de haalbaarheid van stamcel therapie te onderzoeken; dit betrof neurale stamcellen [35] en geïnduceerde pluripotente stamcellen (iPS) [36].

Het instituut waar deze studies zullen worden uitgevoerd heeft beschikking over een grote fokkolonie van marmosets. Op het instituut is de infrastructuur en de expertise aanwezig om deze studies veilig, op DM-2 en ML-2 niveau, en binnen de gestelde termijn uit te voeren.

Referenties bij 3.1 en 3.2

1. Adelman, G. et al. (2013) The cost burden of multiple sclerosis in the United States: a systematic review of the literature. *J Med Econ* 16 (5), 639-47.
2. Compston, A. and Coles, A. (2002) Multiple sclerosis. *Lancet* 359 (9313), 1221-31.
3. Compston, A. and Coles, A. (2008) Multiple sclerosis. *Lancet* 372 (9648), 1502-17.
4. Lassmann, H. (2013) Pathology and disease mechanisms in different stages of multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 333 (1-2), 1-4.
5. Pender, M.P. and Burrows, S.R. (2014) Epstein-Barr virus and multiple sclerosis: potential

opportunities for immunotherapy. *Clin Transl Immunology* 3 (10), e27.

6. Vanheusden, M. et al. (2015) Cytomegalovirus: a culprit or protector in multiple sclerosis? *Trends Mol Med* 21 (1), 16-23.

7. Bertolotto, A. and Gilli, F. (2008) Interferon-beta responders and non-responders. A biological approach. *Neurol Sci* 29 Suppl 2, S216-7.

8. Gold, R. et al. (2006) Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain* 129 (Pt 8), 1953-71.

9. Friese, M.A. et al. (2006) The value of animal models for drug development in multiple sclerosis. *Brain* 129 (Pt 8), 1940-52.

10. Schuh, C. et al. (2014) Oxidative tissue injury in multiple sclerosis is only partly reflected in experimental disease models. *Acta Neuropathol* 128 (2), 247-66.

12. Mansfield, K. (2003) Marmoset models commonly used in biomedical research. *Comp Med* 53 (4), 383-92.

17. Jagessar, S.A. et al. (2010) Induction of progressive demyelinating autoimmune encephalomyelitis in common marmoset monkeys using MOG34-56 peptide in incomplete Freund adjuvant. *J Neuropathol Exp Neurol* 69 (4), 372-385.

18. Jagessar, S.A. et al. (2015) Immune profile of an atypical EAE model in marmoset monkeys immunized with recombinant human myelin oligodendrocyte glycoprotein in incomplete Freund's adjuvant. *J Neuroinflammation* 12, 169.

22. Jagessar, S.A. et al. (2012) B-cell depletion abrogates T cell-mediated demyelination in an antibody-nondependent common marmoset experimental autoimmune encephalomyelitis model. *J Neuropathol Exp Neurol* 71 (8), 716-728.

23. Jagessar, S.A. et al. (2012) Antibodies against human BLYS and APRIL attenuate EAE development in marmoset monkeys. *J Neuroimmune Pharmacol* 7 (3), 557-70.

24. Jagessar, S.A. et al. (2013) The different clinical effects of anti-BLYS, anti-APRIL and anti-CD20 antibodies point at a critical pathogenic role of gamma-herpesvirus infected B cells in the marmoset EAE model. *J Neuroimmune Pharmacol* 8 (3), 727-38.

26. Jagessar, S.A. et al. (2016) Lymphocryptovirus infection of nonhuman primate B cells converts destructive into productive processing of the pathogenic CD8 T cell epitope in myelin oligodendrocyte glycoprotein. *J Immunol* 197 (4), 1074-88.

27. Jagessar, S.A. et al. (2012) Discrepant effects of human interferon-gamma on clinical and immunological disease parameters in a novel marmoset model for multiple sclerosis. *J Neuroimmune Pharmacol* 7 (1), 253-65.

28. Brok, H.P. et al. (2002) Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis in common marmosets using an anti-IL-12p40 monoclonal antibody. *J Immunol* 169 (11), 6554-63.

30. Laman, J.D. et al. (2002) Protection of marmoset monkeys against EAE by treatment with a murine antibody blocking CD40 (mu5D12). *Eur J Immunol* 32 (8), 2218-28.

33. Dunham, J. et al. (2016) Blockade of CD127 exerts a dichotomous clinical effect in marmoset experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmune Pharmacol* 11 (1), 73-83.

35. Pluchino, S. et al. (2009) Human neural stem cells ameliorate autoimmune encephalomyelitis in non-human primates. *Ann Neurol* 66 (3), 343-54.

36. Thiruvalluvan, A. et al. (2016) Survival and functionality of human induced pluripotent stem cell-derived oligodendrocytes in a nonhuman primate model for multiple sclerosis. *Stem Cells Transl Med* 5 (11), 1550-1561.

3.3 Belang

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

Wetenschappelijk: Uit het feit dat een hoog percentage van de kandidaat geneesmiddelen de vertaling van diermodel naar de MS patiënt niet overleven (> 90% voor RRMS en 100% voor SP en PP MS) blijkt hoe beperkt onze kennis nog is van de onderliggende ziekte mechanismes. Een belangrijke oorzaak is de gapende kloof tussen de in het preklinisch onderzoek gebruikte EAE modellen in SPF knaagdieren en de MS patiënt. Er is dringend behoefte aan een relevant diermodel dat deze kloof kan overbruggen. Het EAE model in de marmoset wordt algemeen beschouwd als een zeer relevante overbrugging, enerzijds vanwege de immunologische overeenkomst met zowel muizen EAE als MS, anderzijds vanwege de grote pathologische overeenkomsten met MS. Onderzoek in het marmoset model kan belangrijke nieuwe inzichten verschaffen in de overgang van de relapsing-remitting naar de progressieve fase van de ziekte, waarvoor op dit moment nog geen enkele effectieve medicatie bestaat.

Maatschappelijk: In Nederland leven ongeveer 17.000 mensen met MS, dat is 1 op de 1000 mensen. De ziekte treft vooral jong-volwassenen en is na trauma de belangrijkste oorzaak van neurologische ziekte in jong-volwassenen. MS heeft een sterke impact op de maatschappelijke participatie (werk/sociale contacten). De MS patiënt kan door het toenemend verlies van neurologische functies een aanzienlijk verminderde kwaliteit van leven ervaren. De jaarlijkse kosten voor de zorg en behandeling van de 17.000 MS patiënten liggen tussen 500 en 800 miljoen euro.

Medisch: Er is dringend behoefte aan een qua effectiviteit en veiligheid adequate behandeling van MS. De huidige therapieën die ontwikkeld zijn tegen MS werken niet in alle RR-MS patiënten, en zijn niet werkzaam in patiënten met SP-MS of PP-MS. Tevens hebben de huidige therapieën veel bijwerkingen zoals terugkerende infecties waardoor een patiënt moet stoppen met de therapie. Omdat de ziekte een ernstig verloop heeft met blijvende invaliditeit is het zeer belangrijk dat de ontwikkeling van nieuwe therapieën tegen MS blijft doorgaan. Een belangrijk probleem van de SPF muis EAE modellen die thans worden gebruikt voor de selectie van kandidaat geneesmiddelen is de slechte voorspelbaarheid voor succes in klinische trials. Meer dan 90% van de kandidaten sneuvelt in de vertaling van diermodel naar MS patiënt. De ontwikkeling van technologieën en diermodellen om deze kloof te overbruggen is een top-prioriteit in het geneesmiddelen onderzoek. Het marmoset EAE model kan daar aan bijdragen enerzijds door het testen van de effectiviteit van nieuwe medicijnen maar anderzijds ook doordat onderzoek in het model informatie oplevert over de werking van medicijnen.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

Het project zal bestaan uit meerdere EAE studies, waarin per studie één groep marmosets dient als controle en één of meerdere groepen marmosets worden behandeld met de te testen therapie. In elke studie zal gekeken worden naar de klinische score, de pathologie in het centrale zenuwstelsel en naar het

immuunsysteem in bloed en lymfoïde organen. Wanneer nodig, dit is niet altijd het geval, zal er voorafgaand aan de EAE studie een farmacokinetiek/farmacodynamiek (PK/PD) studie worden uitgevoerd om de optimale dosis en/of toedieningsschema van de therapie te bepalen.

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

Farmacokinetiek/farmacodynamiek in de marmoset:

Voor dit experiment zal één of meerdere concentraties van de therapie eenmalig of herhaaldelijk worden ingespoten in de marmoset. Herhaaldelijke bloedafnames zullen informatie geven over de te gebruiken dosis en/of toedieningsschema tijdens de evaluatie van de therapie in het marmoset EAE model.

Therapie evaluatie in het marmoset EAE model:

De marmosets worden geïmmuniseerd met rhMOG/IFA of MOG34-56/IFA (elke 28 dagen tot er neurologische symptomen optreden, EAE score 2) en zullen dagelijks worden geobserveerd op klinische symptomen behorend tot EAE. Tijdens de dierproef zal er regelmatig bloed worden afgenomen. Aan het eind van de studie of wanneer het humane eindpunt is bereikt, worden de dieren geëuthanaseerd waarna het centrale zenuwstelsel wordt onderzocht op de pathologie behorende bij EAE. In de lymfoïde organen wordt de immunrespons onderzocht en wanneer mogelijk wordt ook gekeken naar de werking van de therapie.

De therapieën moeten aan de volgende criteria voldoen alvorens ze worden getest in het marmoset EAE model,:

1. Het kandidaat medicijn mag niet toxisch zijn in die zin dat het fatale gevolgen kan hebben. Vóórdat het in het aapmodel worden gebruikt moet het eerst uitgebreid *in vitro* (celkweek) of in kleine proefdieren getest zijn op de afwezigheid van toxiciteit.
2. De therapie is in de regel ontwikkeld voor een humaan doel/target, maar zal ook kruisreactief moeten zijn met het doel in de marmoset.

De therapie moet specifiek zijn voor primaten en daardoor niet in een lagere diersoort getest kunnen worden of de therapie kan niet afdoende worden getest in een ander diersoort vanwege het niet-representatief zijn van deze diermodellen voor de specifieke therapie.

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.

Een therapie kan meteen in het marmoset EAE model getest worden als er uit eerdere *in vitro* of *in vivo* studies een indicatie is voor een te testen concentratie en toedieningsschema. Indien dit niet het geval is kan er voorafgaand aan een therapie evaluatie eerst een farmacokinetiek en/of farmacodynamiek experiment in marmosets nodig zijn om de dosis en/of toedieningsschema te bepalen.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Farmacokinetiek/Farmacodynamiek in de marmoset.
2	Therapie evaluatie in het marmoset EAE model.
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Bijlage Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef |
|------------|---|
| 1 | Farmacokinetiek/Farmacodynamiek in de marmoset. |

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.

Dit voorstel omvat het gebruik van de common marmoset (*Callithrix jacchus*, het penseelaapje). Voordat een therapie in het EAE-model in de marmoset getest kan worden, is het soms nodig om de effectieve dosis en/of het toedieningsschema te bepalen in marmosets zonder EAE. Tijdens een experiment zal worden gekeken naar de farmacokinetiek en/of farmacodynamiek. In het geval van farmacokinetiek worden de circulerende levels van een therapie bepaald in bloed dat zeer regelmatig zal worden afgenomen. In het geval van farmacodynamiek kan er o.a. worden gekeken naar hematologie en bloedchemie, celtypes in bloed en lymfoïde organen en cytokine productie.

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

- Voor bloedafname of toediening van teststof of controle preparaat en gelijktijdige weging worden de dieren uitgevangen. Zij worden voor aanvang van het experiment getraind om vrijwillig mee te werken. Daarnaast worden ze regelmatig gewogen in de thuishooi (vrijwillig na training).
- De toedieningsroute van een teststof of controle preparaat wordt per studie bepaald en is afhankelijk van de aard van de teststof. Tijdens een experiment zal er 1 toedieningsroute worden gebruikt. Afhankelijk van de toedieningsroute zal de teststof of controle preparaat eenmalig of herhaaldelijk worden gegeven. Mogelijke toedieningsroutes zijn intraveneus (i.v.), subcutaan (s.c), intramusculair (i.m), intranasaal (i.n.), oraal, intracisternaal of intracraniaal. Wanneer mogelijk (in het geval van i.v., s.c., i.m., oraal en i.n) zal dit zonder sedatie worden uitgevoerd om het dier het ongerief van sedatie te besparen.
- Na de toedieningen zal zeer regelmatig bloed worden afgenomen. In het geval van farmacokinetiek kunnen dit meerdere kleine bloedafnames zijn (< 200 µl, zonder sedatie) in een bepaalde tijdspanne na de eerste injectie. In het geval van farmacodynamiek, waarbij het effect van het kandidaat geneesmiddel op biologische/immunologische processen wordt bepaald, zullen er grotere bloedafnames (0.5 – 2 ml, onder sedatie) plaatsvinden. Tijdens de bloedafnames zullen de dieren ook worden gewogen en indien nodig worden de dieren ook tijdens het experiment extra gewogen in hun thuishooi.

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

In een farmacokinetiek en/of farmacodynamiek experiment is ieder dier zijn eigen controle. Statistische toetsing vindt plaats door vergelijking van een parameter voor en na toediening van een behandeling. De grootte van een testgroep wordt niet door power analyse bepaald, maar wordt bepaald op basis van ervaringen uit eerdere studies met een soortgelijke therapie. Een testgroep zal in de regel bestaan uit een gelimiteerd aantal dieren (n=2-4 per groep). Farmacokinetiek profielen zijn zeer consistent tussen dieren en een groepsgrootte van twee dieren is uit eerdere studies voldoende informatief gebleken. Het effect van een therapie op biologische processen (farmacodynamiek) omvat meerdere variabelen tussen dieren en vereist daarom groepsgrootte van 3 of 4 dieren, afhankelijk van de therapie en de uitkomstparameters.

B. De dieren

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

Common marmoset (*Callithrix jacchus*), volwassen (> 1,5 jaar), M/V, uit de eigen fokkolonie, n=32

Geschatte aantal studies in 5 jaar: 4. Iedere studie zal worden uitgevoerd met een geschat aantal van 4 marmosets per groep. Indien er twee concentraties van de therapie worden getest, zullen er maximaal 32 marmoset in 5 jaar worden gebruikt.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

Dieren die zullen worden gebruikt in de experimenten, zijn mogelijk gebruikt in eerdere studies. Gezien de lange levensduur van deze species kan hergebruik plaats vinden binnen de wettelijke kaders beschreven in art. 1^e van de Wet op de Dierproeven.

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

X 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

Biologicals worden vaak eerst in vitro getest op kruisreactiviteit en bindingscapaciteit met hun doel/target in

marmosets. Hieruit zal enige indicatie komen welke concentratie(s) in de marmoset getest dient te worden. Echter wanneer dit niet voldoende informatie oplevert voor een therapie evaluatie in het EAE model, dient er eerst een farmacokinetiek/farmacodynamiek studie gedaan te worden.

Vermindering

Het uitvoeren van een farmacokinetiek/dynamiek studie zal worden uitgevoerd met een zeer beperkte aantal dieren. Het leidt vooral tot vermindering van het aantal dieren in de daaropvolgende EAE studie. Zo is het bijvoorbeeld dan niet nodig om twee concentraties in een EAE therapie-evaluatie studie te testen, omdat in deze farmacokinetiek/dynamiek studie al de optimale dosis is bepaald.

Verfijning

Er is veel geïnvesteerd in micro-methodes om zoveel mogelijk informatie te krijgen uit een zo klein mogelijk bloedvolume. Daarbij worden voor de marmoset vastgestelde fysiologische grenzen gerespecteerd, namelijk maximaal 1% van het lichaamsgewicht per 4 weken.

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.

Training: De dieren worden voor aanvang van de studie getraind om in de thuishooi op de weegschaal te gaan staan, waardoor de stress van uitvangen wordt voorkomen. De dieren worden getraind om zoveel mogelijk vrijwillig mee te werken aan invasieve biotechnische handelingen zoals het geven van een verdoving of kleine bloedafnames.

Welzijn: Tijdens de studie zullen de dieren dagelijks worden geobserveerd door gekwalificeerde en ervaren dierversorgers. Mochten er veranderingen optreden in gedrag, eetlust, of ontlasting, dan wordt de veterinaire hiervan op de hoogte gesteld.

Medicatie: Hoewel pijn, lijden en angst in de regel niet worden waargenomen, kan het voorkomen niet volledig worden uitgesloten. In een dergelijk geval zal in overleg met de dierenartsen adequate medicatie worden vastgesteld.

Kans op nadelige milieueffecten is alleen te verwachten bij de toepassing van genetisch gemodificeerde cellen. Voor dergelijke studies wordt toestemming gevraagd van de autoriteit GGO.

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.

Niet van toepassing.

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.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

De toediening van een teststof kan, afhankelijk van de toedieningsroute, lokale pijn en irritatie veroorzaken. Ongerief van inspuitingsplaatsen zal naar verwachting licht zijn. Wanneer nodig zal in overleg met de dierenarts medicatie worden toegepast.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

1. ongerief door toediening teststof
2. ongerief door sedatie en ontwaken uit sedatie

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

1. De toediening van een teststof kan, afhankelijk van de toedieningsroute, lokale pijn en irritatie veroorzaken.
2. Voor sedatie moet het dier nuchter blijven. Ook het ontwaken uit sedatie kan vervelend zijn alsmede de temperatuurverlaging tijdens sedatie.

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

1. Alle dieren worden intensief getraind om te wennen aan de experimentele procedures. Ongerief van inspuitingsplaatsen zal naar verwachting licht zijn. Wanneer nodig zal in overleg met de dierenarts medicatie worden toegepast.
2. Dieren liggen op een warmtemat ter voorkoming van temperatuurverlaging.

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.

X Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Indien een dier ernstige gedragsafwijkingen (zoals lethargie), ernstig gewichtsverlies, of ziekteverschijnselen gaat vertonen zal in overleg met de veterinaire worden besloten of behandeling nodig is. In geval van ernstige ziekteverschijnselen zal een dier direct uit studie worden genomen en geëuthanaseerd om verder ongerief te voorkomen.

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

Dit is moeilijk in te schatten, maar niet meer dan 10%.

K. Classificatie van ongerief

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

Het cumulatieve ongerief wordt geassocieerd als matig. Het ongerief wordt vooral bepaald door herhaalde bloedafnames.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee

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

In sommige gevallen zullen de dieren aan het eind van een studie worden gedood ten einde onderzoek te kunnen doen naar de biologische respons van de teststof op (lymfoïde) organen.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

X Ja



Bijlage Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef |
|------------|---|
| 2 | Therapie evaluatie in het marmoset EAE model. |

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Dit voorstel omvat het gebruik van een gevalideerd diermodel voor de neurologische ziekte multiple sclerose (MS), namelijk experimenteel geïnduceerde auto-immuun encefalomyelitis (EAE) in de common marmoset (*Callithrix jacchus*, het penseelaapje), ten behoeve van translationeel onderzoek voor therapie ontwikkeling. Voor de EAE studies zullen wij uitgaan van de experimentele opzet zoals die is gebruikt in eerdere succesvol verlopen EAE studies. De twee behandelingsopties zijn: 1. Preventief, behandeling begint voor of gelijktijdig met de ziekte inductie en 2. (Semi-) therapeutisch, behandeling begint na de ziekte inductie.

De dieren worden geïmmuniseerd met rhMOG/IFA of MOG34-56/IFA, afhankelijk van de te testen therapie. Daarbij zal 1 of meerdere groepen dieren de experimentele behandeling krijgen, bijvoorbeeld een kandidaat therapie, en 1 groep een relevant controle preparaat. Wanneer mogelijk zullen de experimenten worden opgezet in beenmerg-chimere tweelingen, welke immunologisch verwant zijn en waarvan historische data laten zien dat de immuunrespons binnen een tweeling meer overeenkomt dan tussen niet-tweelingen.

De primaire uitkomstparameter is de tijd tot het ontwikkelen van de eerst zichtbare symptomen van een verstoorde motorfunctie, namelijk ataxie of blindheid (EAE score 2, zie tabel in J) en de tijd tot het humane eindpunt, verlamming van het onderlijf (EAE score 3.0; zie J). Hiermee kan het doel 'het bepalen van de effectiviteit van een nieuw medicijn' worden behaald. De ervaring leert dat EAE scores ≤ 2 reversibel zijn. Pas vanaf score 2.5 treedt geen spontaan herstel meer op; de ziekte is dan in de chronisch/progressieve fase. Om deze reden wordt score 2.5 als ethisch eindpunt gehanteerd. Score 3 kan in uitzonderlijke gevallen als ethisch eindpunt worden gehanteerd, wanneer de vraagstelling dit vereist en niet beantwoord kan worden met score 2.5.

Verder wordt post mortem gekeken naar de ernst van de pathologie in de hersenen en het ruggenmerg.

Deze kan worden bepaald door post mortem magnetische resonantie imaging (MRI) van het gefixeerde brein. Daarmee kan het totale oppervlak en de ruimtelijke verdeling van de lesies worden bepaald. Vervolgens wordt door histologische analyse de mate en ernst van ontsteking en weefselschade vastgesteld.

Andere parameters kunnen zijn:

1. Verlies van lichaamsgewicht
2. Afwijkende hematologie en bloedchemie
3. Reactie van immuuncellen in bloed en lymfoïde organen op stimulatie met ziekte-relevante antigenen
4. Celtypen in bloed en lymfoïde organen
5. Productie van cytokines in bloed en lymfoïde organen
6. Productie van antistoffen in bloed

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

- Voor immunisatie zal er soms bloed worden afgenomen voor het maken van getransformeerde B-cellen en/of bepaling van individuele nulwaarden van relevante parameters. Na immunisatie zal regelmatig bloed worden afgenomen voor het bepalen van relevante immuunparameters. Kleine bloedafnames (< 200 µl) worden bij ongesedeerde dieren afgenomen en grote bloedafnames (>0.5 ml) worden uitgevoerd onder sedatie.
- De dieren worden geïmmuniseerd door intracutane injecties op de rug met een emulsie, bevattende recombinant humaan myeline oligodendrocyte glycoproteïne (MOG) met incompleet Freund's adjuvant (rhMOG/IFA) of een rhMOG peptide (34-56) in IFA. Deze handeling wordt elke 28 dagen herhaald totdat een dier EAE score 2 heeft ontwikkeld, met een maximum van 5 immunisaties per dier. Dit gebeurt onder sedatie.
- Voor bloedafname of toediening van de teststof of het controle preparaat en gelijktijdige weging worden de dieren uitgevangen. Zij worden voor aanvang van het experiment voor de vang-methode getraind. Daarnaast worden ze regelmatig ongesedeerd gewogen in de thuishooi (vrijwillig na training).
- De klinische score behorend bij EAE wordt dagelijks gemonitord. Daarbij wordt een standaard score systeem gehanteerd waarmee de gradatie van neurologische defecten wordt vastgelegd.
- De toedieningsroute van teststof of controle preparaat wordt voor iedere studie bepaald en is afhankelijk van de aard van de teststof. Afhankelijk van de toedieningsroute zal de teststof of controle preparaat eenmalig of herhaaldelijk worden gegeven. De start van de toediening is afhankelijk van de teststof en de vraagstelling, soms is dit bijvoorbeeld 1 dag of 1 week voor de immunisatie, soms is dit 3 of meer weken na de immunisatie. Mogelijke toedieningsroutes zijn intraveneus (i.v.), subcutaan (s.c), intramusculaire (i.m.), intranasaal (i.n.), oraal, intracisternaal, of intracraniaal (in het geval van i.v., s.c., i.m., oraal en i.n). Wanneer mogelijk zal de toediening zonder sedatie worden uitgevoerd om het dier het ongerief van sedatie te besparen.

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

Voor experimenten waarin het effect van een nieuwe therapie ten opzichte van een controle preparaat wordt getest is statistische toetsing vereist. Het voor een experiment benodigde aantal dieren zal worden bepaald door middel van power-analyse. Variabelen zijn de verwachte ziekte-incidentie (op basis van historische gegevens >90%) en het verwachte effect van de behandeling.

B. De dieren

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

Common marmoset (*Callithrix jacchus*), volwassen (> 1.5 jaar), M/V, uit de eigen fokkolonie, n=112

Geschatte aantal studies in 5 jaar: 8. Iedere studie zal worden uitgevoerd met een geschat aantal van 7 marmosets per groep (7 controle dieren en 7 dieren per experimentele groep). Dit is afhankelijk van de te testen therapie en de statistische poweranalyse.

Het marmoset EAE model heeft een unieke positie in het translationeel MS onderzoek van ziektemechanismes en behandeling. Vanwege de grote immunologische, klinische en pathologische overeenkomsten met MS is het model een essentiële overbrugging van de brede kloof tussen de knaagdier EAE modellen en de patiënt. Bepalend voor de preklinische relevantie zijn:

1. De huidige sterk verfijnde marmoset EAE modellen zijn gebaseerd op de reactivatie van effector-

geheugen T cellen in het immuunrepertoire van de primate. Dit is mogelijk door de aanwezigheid van herpesvirussen in de marmoset, gelijkend aan de mens. Deze virussen komen niet voor in SPF knaagdieren.

2. De modellen kunnen worden gebruikt voor onderzoek naar de pathogenese en behandeling van progressieve MS; een laat optredende vorm van de ziekte waarvoor nog geen behandeling ontstaat. Het EAE model in marmosets is het enige thans voorhanden model waarin relevante pathologie van progressieve MS is aangetoond.
3. Experimenten gericht op de effectiviteit van nieuwe therapeutische principes in het marmoset EAE model vinden vaak plaats in de laatste fase van het preklinische ontwikkelingstraject. Het therapeutisch middel kan een monoclonaal antistof, een cytokine, oplosbare receptor of een ge-engineerde cel zijn, die ontwikkeld is voor werkzaamheid in de mens. In de meeste gevallen zijn deze middelen alleen actief in nauw aan de mens verwante diermodellen.
4. Tevens is het in de marmoset mogelijk om de werking van een therapie longitudinaal te volgen in bloed en in alle lymfoïde organen aan het eind van de studie.

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.

Er is in principe geen bezwaar tegen hergebruik van marmosets, mits geselecteerde dieren niet zijn behandeld met een product dat kan interfereren met het EAE model of het kandidaat-geneesmiddel dat zal worden getest. Aangezien marmosets na een EAE studie altijd worden opgeofferd voor neuropathologisch en neuroimmunologisch onderzoek is hergebruik van EAE dieren uitgesloten.

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

Vervanging door in vitro methodes: Multipel sclerose is een ziekte veroorzaakt door complexe interacties tussen het centrale zenuwstelsel en het gehele immuunsysteem. Met de huidige stand van de techniek is het niet mogelijk deze interactie buiten het levende dier te bestuderen. Wel worden biologicals vaak eerst in vitro getest op hun capaciteit om aan het beoogde target in de marmoset te binden.

Vervanging door EAE modellen in lagere species. Binnen het neuroimmunologisch onderzoeksveld betreft dat met name SPF muizen en ratten. De huidige sterk verfijnde marmoset modellen, waarbij CFA is vervangen door IFA, zijn gebaseerd op een wezenlijk ander pathogeen mechanisme dan de gebruikte EAE modellen in muis en rat. In de marmoset is EAE het gevolg van de reactivatie van effector-geheugen T cellen die aanwezig zijn in het mature immuun-repertoire van de primate, dat is gevormd door de interactie van genetische factoren met omgevingsfactoren. Met name van belang is de chronisch latente infectie met herpesvirussen verwant aan humaan cytomegalovirus (CMV) en Epstein-Barr Virus (EBV). Deze gekende risicofactoren voor MS zijn afwezig in SPF muizen.

Een tweede reden: De marmoset EAE modellen worden ook gebruikt voor onderzoek naar de pathogenese en behandeling van progressieve MS; een laat optredende vorm van de ziekte waarvoor nog geen behandeling bestaat. Het EAE model in marmosets is het enige thans voorhanden model waarin relevante pathologie van progressieve MS is aangetoond.

Een derde reden: Experimenten gericht op de effectiviteit van nieuwe therapeutische principes in het marmoset EAE model vinden vaak plaats in de laatste fase van het preklinische ontwikkelingstraject. Het therapeutisch middel kan een monoclonaal antistof, een cytokine, oplosbare receptor of een ge-engineerde cel zijn, die ontwikkeld is voor werkzaamheid in de mens. In de meeste gevallen zijn deze middelen alleen effectief in nauw aan de mens verwante diermodellen.

Vermindering

Het effect van een nieuw therapeutisch principe in het model dient in de regel statistisch te worden aangetoond. Het benodigd aantal dieren per groep om de resultaten statistisch te kunnen toetsen zal worden bepaald middels power-analyse. Het minimaal aantal benodigde dieren zal worden gebruikt. Kritische variabelen, zoals ziekte incidentie en spreiding in het ziekteverloop zullen worden gemodelleerd naar eerdere EAE studies. Indien mogelijk zullen meerdere therapeutische groepen een controle groep delen om het aantal dieren te verminderen.

Verfijning

Adjuvant: Een belangrijke storende factor in het EAE onderzoek is de noodzaak om het bacteriële adjuvant CFA te gebruiken. Het eerste nadeel van het gebruik van CFA is dat het ernstige ulceraties veroorzaakt rond de injectieplaatsen in de huid. Een tweede nadeel is dat CFA een autoimmuun-proces activeert waarin de CD4+ T-cel een dominante rol speelt. Er is sterk toenemende twijfel aan de relevantie van dit proces voor MS, waar de auto-immuniteit wordt gedomineerd door de CD8+ T-cel. Een derde nadeel is dat CFA de inductie van een neutraliserende immuunresponse tegen Biologische teststoffen versterkt. De vervanging van CFA door IFA ondervangt al deze nadelen.

Experimentele verfijning: Voor longitudinale monitoring van het immuunproces wordt tijdens een gemiddeld experiment per keer 1 ml bloed afgenomen. Er is veel geïnvesteerd in micro-methodes om zoveel mogelijk informatie te krijgen uit dit beperkte bloedvolume.

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.

Training: De dieren worden voor aanvang van de studie getraind om in de thuishooi op de weegschaal te gaan staan, waardoor de stress van uitvangen wordt voorkomen. De dieren worden getraind om zoveel mogelijk vrijwillig mee te werken aan invasieve biotechnische handelingen zoals het geven van een verdoving of kleine bloedafnames.

Welzijn: Tijdens de studie zullen de dieren dagelijks worden geobserveerd door gekwalificeerde en competente diervverzorgers. Mochten er veranderingen optreden in gedrag, eetlust, of ontlasting, dan wordt de veterinaire hiervan op de hoogte gesteld.

Medicatie: Hoewel pijn, lijden en angst in den regel niet worden waargenomen, kan het voorkomen niet volledig worden uitgesloten. In een dergelijk geval zal in overleg met de dierenartsen adequate medicatie worden vastgesteld.

Kans op nadelige milieueffecten is alleen te verwachten bij de toepassing van genetisch gemodificeerde cellen. Voor dergelijke studies wordt toestemming gevraagd van de autoriteit GGO.

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.

Niet van toepassing.

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?

X Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

In de MS patiënt wordt soms pijnlijke spasticiteit waargenomen. Dit is tot nu toe niet gezien in EAE studies. maar kan niet voor de volle 100% worden uitgesloten. Wanneer symptomen van pijn worden geobserveerd zal orale of parenterale pijnstilling worden toegediend na overleg met de veterinaire.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

1. ongerief door toediening van injectie
2. ongerief door sedatie en ontwaken uit sedatie
3. ongerief door klinische symptomen EAE
4. single huisvesting

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

1. De insputing van een kleine hoeveelheid inoculum voor immunisatie kan ontsteking en irritatie geven. De insputing van teststof kan, afhankelijk van de plaats van de injectie, lokale pijn en irritatie veroorzaken
2. Voor sedatie moet het dier nuchter blijven. Ook het ontwaken uit anesthesie kan vervelend zijn alsmede de temperatuurverlaging tijdens sedatie.
3. EAE leidt tot symptomen als ataxie, blindheid, paresis en paralyse. Het verlies van neurologische functies kan als stressvol worden ervaren.
4. Marmosets worden normaliter in duo's gehuisvest. Marmosets zijn sociale dieren en alleen gehuisvest zitten kan stress geven. Echter, wanneer een kooimaatje vanwege de ernst van de EAE uit de studie dient te worden genomen, is single huisvesting onontkoombaar. Immers, introductie van een nieuw kooimaatje veroorzaakt stress, waardoor het experiment negatief kan worden beïnvloed.

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

1. Alle dieren worden intensief getraind om te wennen aan de experimentele procedures. Ongerief van insputingsplaatsen zal naar verwachting licht zijn. Wanneer nodig zal in overleg met de dierenarts medicatie worden toegepast.

2. Dieren liggen op een warmtemat ter voorkoming van temperatuurverlaging
3. Wanneer neurologische defecten worden waargenomen zal de hoogte van de kooi worden vermindert. Dit om te voorkomen dat ze vallen. We werken met een cumulatieve discomfort schaal (zie ook J). Dieren worden geëuthanaseerd wanneer het humane eindpunt is bereikt.
4. Als een dier door omstandigheden (zoals het bereiken van humaan eindpunt van een kooigenoot) gedurende de studie individueel komt te zitten, wordt er geen nieuwe partner geïntroduceerd omdat dit meer stress oplevert dan individuele huisvesting voor de resterende tijd van een studie.

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 geëuthanaseerd, gevolgd door uitgebreide sectie, wanneer het eindpunt volgens tabel 1 is bereikt, of maximaal 150 dagen na de eerste immunisatie, of wanneer het algemeen welzijn door andere omstandigheden ernstig wordt aangetast. De maximale duratie in tabel 1 is cumulatief. De humane eindpunten voorkomen dat matig ongerief ernstig wordt en daarom is er geen ernstig ongerief in deze dierproef. Door hanteren van deze eindpunten worden de dieren uit studie genomen in een fase waarin de dieren nog steeds zelfredzaam zijn en waarin zelfstandig eten en drinken en het aangaan van sociale interacties in voldoende mate mogelijk blijven.

Tabel 1: Cumulatieve EAE scoringstabel

EAE score	Klinische symptomen	Maximale cumulatieve tijdsduur
0	Asymptomatisch	Eind experiment
0.5	Verminderd alert, veranderd loopgedrag zonder ataxie	20 weken
1	Apathisch (verminderde reactie op externe prikkel, tremor, slechthziend)	10 weken
2	Ataxie (= evenwichtsstoornis), blind	4 weken
2.25	Parese (incomplete verlamming) van 1 ledemaat	7 dagen
2.5	Parese (incomplete verlamming) van 2 ledematen	5 dagen
2.75	Parese (incomplete verlamming) van 3 of 4 ledematen	3 dagen
3.0	Paralyse (complete verlamming) van 1 (hemiplegie) of meerdere ledematen (paraplegie)	2 dagen
4.0	Complete verlamming van 4 ledematen (quadriplegie)	1 uur*

* Dit stadium is nog nooit voorgekomen sinds de invoering van IFA als adjuvant. Indien het toch voorkomt is onmiddellijke actie vereist.

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

Na immunisatie met rhMOG/IFA loopt 100% van de dieren kans deze criteria te halen. Na immunisatie met MOG34-56/IFA loopt >90% van de dieren kans deze criteria te halen. De incidentie in de groep die behandeld wordt met de te testen therapie kan lager liggen als gevolg van de behandeling.

K. Classificatie van ongerief

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

Het cumulatieve ongerief wordt geclassificeerd als matig. Het ongerief wordt bepaald door herhaalde bloedafnames, herhaalde injecties en het ontwikkelen van EAE symptomen.

Indien er geen EAE symptomen optreden, bijvoorbeeld als gevolg van een geslaagde behandeling met de teststof, blijft het ongerief matig als gevolg van de herhaalde bloedafnames en injecties.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee

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

De dieren worden altijd gedood aan het einde van het experiment. Ten einde onderzoek te kunnen doen naar de pathologie in het centrale zenuwstelsel en de immuun response in de lymfoïde organen is het noodzakelijk de dieren te euthanaseren.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

X Ja

Format DEC-advies

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

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

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: [REDACTED] 2017881
2. Titel van het project: Evaluatie van therapieën voor de behandeling van multipele sclerose
3. Titel van de NTS: Evaluatie van nieuwe kandidaat-geneesmiddelen voor de behandeling van multiple sclerose
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
 - wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: [REDACTED]
 - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
 - e-mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: 01-03-2017
 - aanvraag compleet: 01-03-2017
 - in vergadering besproken: 09-03-2017 en 12-04-2017
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van 16-03-2017 tot 29-03-2017 en van 13-04-2017 tot 24-04-2017
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 29-03-2017 en 24-04-2017
 - advies aan CCD: 24-04-2017
7. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.
De aanvrager heeft het projectvoorstel afgestemd met de IvD en het met instemming van de IvD ingediend bij de DEC.

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

opgenomen. Als dat het geval is, moet dat in het DEC advies worden benoemd en in de aanvraag inzichtelijk worden gemaakt.

8. Eventueel horen van aanvrager n.v.t.
 - Datum
 - Plaats
 - Aantal aanwezige DEC-leden
 - Aanwezige (namens) aanvrager
 - Gestelde vraag / vragen
 - Verstrek(e) antwoord(en)
 - Het horen van de aanvrager heeft wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag

9. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum: 16-03-2017 en 13-04-2017
 - Gestelde vraag/vragen: Enige tekstuele aanpassingen, aanvullende informatie betreffende het ziektebeeld MS, verduidelijking betreffende het niet geschikt zijn van het EAE model in knaagdieren als mogelijk alternatief, de te gebruiken toedieningsroutes voor de therapie en of de therapie voorafgaande of tijdens de inductie van EAE wordt toegediend, onderbouwing aantal benodigde dieren, humane eindpunten.
 - Datum antwoord: 29-03-2017
 - Verstrek(e) antwoord(en): In het format projectvoorstel dierproeven is informatie toegevoegd betreffende het ziektebeeld MS bij de mens, de oorzaken van MS en pathologische aspecten en behandeling van MS. Tevens is het marmoset EAE model verder uitgewerkt met betrekking tot het uittesten van diverse kandidaat geneesmiddelen, verschillen ten opzichte van het muizen model voor MS, de EAE inductie methode en de immunopathogenese. Ook zijn aanvullende argumenten voor de noodzaak van het gebruik van non-humane primaten gegeven. In Bijlage 1 zijn de te gebruiken toedieningsroutes nader gespecificeerd en is het benodigde aantal dieren verder onderbouwd. In bijlage 2 zijn zowel preventieve als therapeutische toedieningsvormen en humane eindpunten nader uitgewerkt.
 - De antwoorden hebben wel geleid tot aanpassing van de aanvraag

10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC). N.v.t.
 - Aard expertise
 - Deskundigheid expert
 - Datum verzoek
 - Strekking van het verzoek
 - Datum expert advies
 - Advies expert

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig.
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. Is de DEC competent om hierover te adviseren? De commissie heeft voldoende expertise, inbegrepen de immunologie, neurologie, statistische analyse, onderzoek met niet-humane primaten, en toepassing van alternatieven op deze gebieden. Ook is er voldoende expertise op gebied van ontwerp van dierproeven, proefdiergeneeskundige praktijk, het houden en verzorgen van dieren, ethiek en proefdieren en hun bescherming. De DEC heeft ruime ervaring met het beoordelen van onderzoek naar kandidaat medicijnen gericht tegen multiple sclerose in het EAE model in niet-humane primaten.

4. Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom.
Er waren geen conflicterende belangen bij de beoordeling van dit voorstel.

C. Beoordeling (inhoud)

1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft. Het voorgestelde onderzoek bestaat uit twee fasen, te weten 1) vaststellen van de juiste dosering waarin het kandidaat medicijn getest zal gaan worden, door middel van een farmacokinetiek/farmacodynamiek (PK/PD) studie en 2) bepalen van het therapeutisch effect van het kandidaat medicijn in het marmoset EAE model. Medicijnen die getest zullen worden in dit model zijn innovatief en kunnen niet in een andere diersoort worden getest vanwege het niet representatief zijn van die modellen voor de specifieke therapie. De subdoelen sluiten logisch aan bij het hoofddoel en vormen een samenhangend geheel. Het verwachte ongerief voor de dieren is duidelijk omschreven en de uitkomsten van deze experimenten zijn helder en meetbaar. Het aantal dieren is realistisch ingeschat en voor zover mogelijk statistisch onderbouwd. De klinische eindpunten zijn duidelijk gedefinieerd.
2. Signaleer of er mogelijk tegenstrijdige wetgeving is die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan. Het gaat hier om wetgeving die gericht is op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort (bijvoorbeeld Wet dieren en Wet Natuurbescherming). Er is, zover de DEC kan overzien, geen tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan.
3. Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Nevendoelstellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel. De aangegeven doelcategorie, te weten 'translationeel of toegepast onderzoek', sluit aan bij het projectvoorstel. In deze projectaanvraag wordt voor nieuwe kandidaat medicijnen tegen multiple sclerose (MS), onderzocht of zij in het marmoset EAE model de ontwikkeling van symptomen kunnen vertragen of voorkomen. Daarnaast kan onderzoek in dit EAE model belangrijke inzichten verschaffen over de overgang van de relapse-remissie vorm in de progressieve vorm van MS. Het marmoset EAE model vertoont belangrijke overeenkomsten met MS bij de mens, waardoor de uitkomsten een goede indicatie geven over mogelijke effectiviteit bij de mens.

Belangen en waarden

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen. Beoordeel of het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld. Het directe doel van het project betreft onderzoek naar de effectiviteit van innovatieve kandidaat geneesmiddelen tegen MS in het marmoset EAE model. Daarnaast wordt verwacht dat dit onderzoek kan leiden tot een beter inzicht in progressie van de ziekte van een relapsing-remitting patroon naar een progressieve vorm. Het uiteindelijke doel is om effectieve medicijnen tegen MS te verkrijgen. MS is een ernstige ziekte met blijvende invaliditeit tot gevolg. De huidige therapieën die ontwikkeld zijn tegen MS werken niet in alle patiënten en hebben veel bijwerkingen. Bovendien hebben ze nauwelijks effect in de progressieve fase van MS. Het marmoset EAE model vertoont wat betreft klinische symptomen, pathologie en betrokkenheid van bepaalde componenten van het afweersysteem grote overeenkomsten met MS bij de mens en de uitkomsten binnen dit model vormen daardoor een goede indicatie voor mogelijke effectiviteit bij de mens. Er is binnen dit project een reële relatie tussen het directe doel en het uiteindelijke doel.
5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de

belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 2.B en tabel 1; zie bijlage I voor voorbeeld*). De belangrijkste belanghebbenden in dit translationele project dat gericht is op de ontwikkeling van nieuwe medicijnen tegen MS zijn de te behandelen patiënten, de proefdieren en het onderzoeksveld.

Het belang voor de samenleving is dat de behandeling van mensen met MS verbeterd wordt, door ontwikkeling van meer effectieve medicijnen, die ook in de progressieve fase van de ziekte werkzaam zijn en minder bijwerkingen vertonen. Hierdoor zal de kwaliteit van leven van MS patiënten sterk verbeterd kunnen worden.

Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal worden aangetast, de dieren zullen stress ondervinden, ziek worden en soms enige mate van pijn ondervinden.

Het onderzoeksveld krijgt nieuwe informatie die wordt gedeeld d.m.v. publicatie(s). Dit onderzoek kan leiden tot meer inzicht in de factoren die een rol spelen bij het ontstaan van MS en de onderliggende immuun-mechanismen.

6. Is er aanleiding voor de DEC om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken? Er zijn geen substantiële milieueffecten te verwachten binnen de kaders of ten gevolge van dit project.

Proefopzet en haalbaarheid

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw beoordeling toe. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn boven iedere twijfel verheven gezien de wetenschappelijke output, de verworven interne- en externe financiering alsmede de aandacht voor de drie V's.
8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw beoordeling toe. De DEC is er van overtuigd dat het projectvoorstel aansluit bij recente wetenschappelijke inzichten en geen hiaten bevat die de bruikbaarheid van de resultaten in de weg zullen staan. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en helder gekozen en sluiten aan bij de aangegeven doelstellingen. De cumulatieve EAE scoringstabel vormt zowel een belangrijk instrument voor het bepalen van de wetenschappelijke uitkomst als het bewaken van de ziekteprogressie en beperken van ongerief. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen naar de mening van de DEC leiden tot het behalen van de doelstelling in het kader van het project.

Welzijn dieren

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

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

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

Het experiment wordt uitgevoerd met niet-humane primaten, namelijk de common marmoset (*Callithrix jacchus*, penseelaap). De keuze voor deze diersoort is gebaseerd op de sterke overeenkomsten tussen EAE in de marmoset en MS bij de mens, wat betreft klinische symptomen, pathologie en de componenten van het afweersysteem die betrokken zijn bij de ziekte. Ook de progressieve fase van de ziekte kan in dit model goed bestudeerd worden. De therapieën die worden getest zijn van te voren gekarakteriseerd in *in vitro* en *in vivo* (veelal knaagdieren) modellen. De te testen therapieën zijn gericht op humane target moleculen en daardoor vaak niet zinvol te testen in andere diersoorten.

10. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan, omdat het, om redenen van dierenwelzijn of diergezondheid of om wetenschappelijke redenen, noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. De huisvesting en verzorging voldoet ten volle aan de vereisten in bijlage III.
11. Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe. Het ongerief is op basis van ervaring met PK/PD studies en EAE inductie in common marmosets correct als matig ingeschat en wordt veroorzaakt door de experimentele technieken, de vaccinaties voor inductie van EAE en de klinische symptomen van EAE. In combinatie zijn de gevolgen van deze handelingen terecht als matig ongerief ingeschat. Door implementatie van humane eindpunten op basis van een cumulatieve EAE score wordt ernstig ongerief vermeden. Alhoewel incomplete verlamming kan optreden, wordt voorkomen dat dieren niet meer zelfstandig kunnen functioneren met betrekking tot het tot zich nemen van voedsel en drinkwater en het aangaan van sociale interacties. De dieren voor de experimenten zijn speciaal voor dit doel gefokt, en zullen als sociaal compatibel duo worden gehuisvest. Een dier kan door het uit studie nemen van de kooigenoot (ten gevolge van bereiken humaan eindpunt) gedurende een deel van de studie solitair gehuisvest zijn.
12. Het uitvoeren van dierproeven zal naast het ongerief vaak gepaard gaan met aantasting van de integriteit van het dier. Beschrijf op welke wijze er sprake is van aantasting van integriteit. De integriteit van de dieren wordt aangetast door de dieren te injecteren met teststof en bij een deel van de dieren door inductie van EAE. Bij dieren die in een PK/PD studie gebruikt worden zal deze aantasting van voorbijgaande aard zijn en zullen de dieren in het algemeen geheel terug keren naar hun oorspronkelijke toestand, qua gezondheid en welzijn. In sommige gevallen zullen de dieren aan het eind van de PK/PD studie gedood worden ten einde onderzoek te kunnen doen naar de biologische respons van de teststof. De dieren waarbij EAE wordt geïnduceerd worden gedood aan het einde van het experiment om de neuropathologie te bepalen en de immuun responsen in de weefsels te meten.
13. Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. Licht uw beoordeling toe. Naar de mening van de DEC zijn de humane eindpunten zorgvuldig beschreven (gebaseerd op algemene en specifieke criteria) en is de inschatting van de kans dat dieren een humaan eindpunt zullen bereiken adequaat ingeschat. Met behulp van de cumulatieve EAE scoringstabel kan de mate van ongerief zorgvuldig worden ingeschat. Het humane eindpunt wordt bepaald door deze score en kan afhankelijk van de wetenschappelijke vraag worden beperkt tot score 2,5 of in uitzonderlijke gevallen score 3.

14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Er is geen *in vitro* model waarin de bij MS betrokken complexe interacties tussen het centrale zenuwstelsel en het afweersysteem kan worden nagebootst en de werking van nieuwe medicijnen kan worden getest. Nieuwe medicijnen worden vaak eerst *in vitro* getest op kruisreactiviteit en binding aan hun target moleculen. Echter vaak is dan niet duidelijk of de medicijnen hun specifieke doel binnen het organisme zullen bereiken. Daarom is gebruik van proefdieren noodzakelijk. Verschillende diersoorten worden gebruikt voor onderzoek naar MS. Het EAE marmoset model vertoont een dusdanige overeenkomst met MS in de mens dat alleen in dit model behandeling tegen de progressieve vorm van MS getest kan worden. Experimenten in de marmoset vinden vaak plaats in de laatste fase van het preklinische ontwikkelingstraject. Het geneesmiddel is specifiek gericht op de mens en werkt vaak alleen in de mens en non-humane primaten.
15. Beoordeel of het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en of er een heldere strategie is om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Licht uw beoordeling toe. De proefopzet wordt telkens gebaseerd op de concrete experimentele vraagstelling. Het aantal te gebruiken dieren per behandelgroep wordt bepaald met behulp van statische powerberekeningen op basis van de verwachte effect grootte en spreiding van de data. Het uitvoeren van een PK/PD studie zal worden uitgevoerd met een zeer beperkt aantal dieren en leidt tot gebruik van minder dieren in de EAE therapie-evaluatie studie.
16. Beoordeel of het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project zodanig is opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Licht uw beoordeling toe. De uitvoering is verfijnd door gebruik te maken van sociaal gehuisveste dieren die goed aan mensen gewend zijn, de dieren zijn bovendien getraind om mee te werken aan bepaalde dier technische handelingen, waardoor ze minder stress ervaren. Het model is verder verfijnd door vermijding van gebruik van bacteriële adjuvantia voor de ziekte inductie. Ook wordt door optimalisatie van *in vitro* meet methoden de bloedafname zoveel mogelijk beperkt. Sedatie en pijnbestrijding zullen worden toegepast wanneer geïndiceerd. Het ongerief wordt beperkt door toepassing van humane eindpunten, gebaseerd op een cumulatieve EAE scoringstabel.
17. Beoordeel, indien het wettelijk vereist onderzoek betreft, of voldoende aannemelijk is gemaakt dat er geen duplicatie plaats zal vinden en of de aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om tijdens de uitvoering van het project te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt. Licht uw beoordeling toe. N.v.t.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd. In onderhavige projectaanvraag worden dieren van beide geslachten gebruikt.
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. Bij PK/PD studies zullen de meeste dieren in leven blijven aan het einde van het experiment. Alleen

indien het effect van de teststof op de organen onderzocht moet worden zullen de dieren worden gedood. De dieren waarbij EAE wordt geïnduceerd worden gedood aan het einde van het experiment om de pathologie te bepalen en de immuun respons in de weefsels te meten. Daarnaast worden dieren ge-euthanaseerd wanneer humane eindpuntcriteria worden bereikt, dit om verder ongerief te voorkomen (zoals gedefinieerd in de projectaanvraag). Er wordt een passende dodingsmethode gebruikt (conform bijlage IV van de richtlijn).

20. Indien niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren worden gedood om niet-wetenschappelijke redenen, is herplaatsing of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is. Hergebruik wordt altijd overwogen en ook nagestreefd (binnen de kaders omtrent dierenwelzijn en wetenschappelijke kwaliteit).

NTS

21. Is de niet-technische samenvatting een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd? Naar de mening van de DEC beschrijft de niet-technische samenvatting het project inhoudelijk correct en in begrijpelijke taal.

D. Ethische afweging

1. Benoem de centrale morele vraag. Rechtvaardigt het testen van nieuwe geneesmiddelen tegen MS het ongerief dat niet-humane primaten wordt aangedaan? Is het gebruik van niet-humane primaten in dit geval gerechtvaardigd of kan de gewenste informatie ook verkregen worden door het inzetten van andersoortige proefdieren.
2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn, ten opzichte van elkaar af. Om dit proces te vergemakkelijken, kunt u de belangrijkste belanghebbenden en de belangrijkste waarden die in het geding zijn waarderen. U kunt dit verwoorden in termen van gering, matig of veel/ernstig voordeel of nadeel. Geef aan waarom de DEC bevordering van waarden (baten) voor de ene belanghebbende prevaleert boven de aantasting van waarden (kosten) voor de andere belanghebbende.

De waarden voor de samenleving zijn gelegen in het ontwikkelen van betere medicijnen tegen MS. Naar verwachting leidt dit tot vermindering van de symptomen of vertraging van het ziektebeloop. De voordelen zijn zowel economisch (minder ziekte, minder zorgkosten) als bevorderlijk voor de kwaliteit van leven van de patiënten.

Voor de proefdieren zijn integriteit, welzijn en de autonomie in het geding, door de dieren handelingen met een wetenschappelijk doel te laten ondergaan. Ze kunnen hierdoor ziek worden en enige pijn ondervinden door bloedafnames en injecties. De dieren ondervinden hiervan matig ongerief.

De waarden voor het onderzoeksveld zijn toenemend wetenschappelijk inzicht in de immunomechanismen die betrokken zijn bij het ontstaan of verergeren van MS en de werking van potentiële nieuwe medicijnen. Omdat niet-humane primaten goed modelleren voor de ziekte MS zullen de resultaten relevant zijn voor MS bij de mens en kunnen leiden tot nieuwe inzichten over deze ziekte. Daarmee levert dit onderzoek belangwekkende resultaten en het is de uitdrukkelijke bedoeling om dit te publiceren.

Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit werk een essentiële bijdrage leveren aan het verkrijgen van nieuwe medicijnen tegen MS die effectiever zijn in het bestrijden van de ziekte en minder bijwerkingen geven. Het verwachte ongerief voor de dieren valt daardoor moreel te

verantwoorden.

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

De DEC concludeert dat de belangen van de samenleving die worden nagestreefd in dit project zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de betrokken proefdieren.

Het onderzoek is van groot belang voor mensen met MS omdat het kan resulteren in het beschikbaar komen van medicijnen die de progressie van de ziekte voorkomen en die minder bijwerkingen hebben dan de huidige medicijnen. Daarnaast kan dit onderzoek meer inzicht geven in de factoren die een rol spelen bij ziekte progressie.

De expertise voor het verrichten van deze experimenten is beschikbaar binnen de instelling en bij de betrokken onderzoekers. De kennis en kunde van de aanvragers wordt onderbouwd door eerder onderzoek naar de effectiviteit van geneesmiddelen tegen MS en de vereiste expertise en voorzieningen voor dergelijk onderzoek met niet-humane primaten. Reeds vele jaren wordt er in de instelling onderzoek verricht met het marmoset EAE model. De gekozen strategie voor inductie van de ziekte is in de loop der jaren verder verfijnd. Dit heeft geleid tot een beter diemodel en tot minder ongerief voor de dieren. De keuze voor dit model is gebaseerd op bewezen overeenkomsten met MS wat betreft ziektebeeld en de zeer grote fysiologische en immunologische overeenkomsten met de mens.

De haalbaarheid van de doelstellingen van dit project wordt als hoog ingeschat. De te onderzoeken medicijnen zijn in gevorderde stadia van ontwikkeling. De medicijnen zijn tevoren gekarakteriseerd in *in vitro* en *in vivo* (veelal knaagdieren) modellen. In de laatste fase van de preklinische ontwikkeling is het echter noodzakelijk om de effectiviteit en veiligheid van de kandidaat medicijnen te onderzoeken in een diemodel waarin de aard en verloop van de ziekte, alsmede de responsen van het afweersysteem, grote overeenkomsten vertonen met de mens. Deze medicijnen kunnen niet in andere diere modellen of alternatieve modellen worden getest op therapeutisch effect tegen MS. De effecten (bijvoorbeeld als gevolg van de complexiteit van hun interactie met het zenuwstelsel of de betrokken componenten van het afweersysteem) van de kandidaat medicijnen kunnen in dit diemodel goed worden onderzocht en ook kunnen eventuele nadelige effecten aan het licht komen. Gezien het bovenstaande is de DEC van mening dat dit project het gebruik van deze proefdieren rechtvaardigt.

E. Advies

1. Advies aan de CCD
 - De DEC adviseert de vergunning te verlenen.
 - ✓ De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
 - ✓ Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.
 - Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist
 - Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te

weten...

- De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
 - De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen:...
 - De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...
 - De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...
- 2. Het uitgebrachte advies kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt in de DEC. Indien gebaseerd op een meerderheidsstandpunt, specificeer het minderheidsstandpunt op het niveau van verschillende belanghebbenden en de waarden die in het geding zijn. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.
- 3. Omschrijf de knelpunten/dilemma's die naar voren zijn gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies zowel binnen als buiten de context van het project. Er zijn geen knelpunten ondervonden; de inherente ethische dilemma's zijn hierboven uitgebreid uiteengezet.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag



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

Onze referentie
Aanvraagnummer
[redacted] 2017881
Bijlagen
2

Datum 4 mei 2017
Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted],

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 1 mei 2017. Het gaat om uw project "Evaluatie van therapieën voor de behandeling van multipale sclerose". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is [redacted] 2017881. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:

4 mei 2017

Aanvraagnummer:

2017881

Datum:
4 mei 2017
Aanvraagnummer:
[REDACTED] 2017881

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: [REDACTED]
Naam instelling of organisatie: [REDACTED]
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: [REDACTED]
Straat en huisnummer: [REDACTED]
Postbus: [REDACTED]
Postcode en plaats: [REDACTED]
IBAN: [REDACTED]
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: [REDACTED]

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Datum:

4 mei 2017

Aanvraagnummer:

2017881

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

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

Gegevens gemachtigde

Naam: [REDACTED]
Postbus: [REDACTED]
Postcode en plaats: [REDACTED]

Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Nee

Wat mag de gemachtigde doen?

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

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u?

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

Over uw project

Geplande startdatum: 1 augustus 2017
Geplande einddatum: 1 augustus 2022
Titel project: Evaluatie van therapieën voor de behandeling van multiple sclerose
Titel niet-technische samenvatting: Evaluatie van nieuwe kandidaat-geneesmiddelen voor de behandeling van multiple sclerose
Naam DEC: [REDACTED]
Postadres DEC: [REDACTED]
E-mailadres DEC: [REDACTED]

Datum:
4 mei 2017
Aanvraagnummer:
[REDACTED] 2017881

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1.287,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

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

Ondertekening

Naam: [REDACTED]
Functie: Adjunct Directeur
Plaats: [REDACTED]
Datum: 1 mei 2017



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag



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

Onze referentie
Aanvraagnummer
[redacted] 2017881
Bijlagen
2

Datum 4 mei 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur
Factuurdatum: 4 mei 2017
Vervaldatum: 3 juni 2017
Factuurnummer: 170881

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag [redacted] 2017881	€ 1.287,00

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

[Redacted]

Van: Info-zbo
Verzonden: donderdag 8 juni 2017 13:45
Aan: [Redacted]
CC: [Redacted]
Onderwerp: [Redacted] 2017881: aanhouden beoordelen

Geachte [Redacted],

Op 01 mei 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Evaluatie van therapieën voor de behandeling van multipale sclerose" met aanvraagnummer [Redacted] 2017881.

Welke informatie nog nodig

De CCD heeft uw aanvraag besproken en heeft een vraag over uw project:

U gaat een kinetiek studie uitvoeren. U geeft echter niet aan of u voorafgaand aan deze studie Physiologically based pharmacokinetic modelling gaat doen. U wordt verzocht aan te geven of u dit heeft overwogen? Indien u van mening bent dat dit niet mogelijk is, wordt u verzocht dit toe te lichten.

Opsturen informatie

U heeft 14 dagen de tijd om de ontbrekende informatie op te sturen. U kunt deze informatie onder vermelding van het aanvraagnummer [Redacted] 2017881) aanleveren via NetFTP of per e-mail.

Wanneer een beslissing

De beslistermijn op uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat bovengenoemde informatie is ontvangen. Na ontvangst van uw reactie nemen wij uw aanvraag verder in behandeling. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Met vriendelijke groet,

[Redacted]

Namens,

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

.....
T: 0900 2800028
E: info@zbo-ccd.nl (Let op: nieuw e-mail adres)

Project: **Evaluatie van therapieën voor de behandeling van multipale sclerose**

Aanvraag: ██████████ **2017881**

Geachte leden van de CCD

Uw reactie op het project “Evaluatie van therapieën voor de behandeling van multipale sclerose” met aanvraagnummer ██████████ 2017881 is in goede orde ontvangen. Wij willen u bedanken voor de vraag of wij overwogen hebben physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modelling voorafgaand aan de studie uit te voeren. Deze vraag kunnen we bevestigend beantwoorden. Physiologically based pharmacokinetic modelling staat al enige tijd op ons verlanglijstje, echter voor hoogmoleculaire biologische geneesmiddelen (biologicals), zoals monoclonale antistoffen, cytokines e.d. is deze techniek nog niet ontwikkeld. Voor laag moleculaire chemische drugs is de techniek wel ontwikkeld, maar dit type geneesmiddel wordt slechts zeer zelden getest in onze primaten modellen. Wij zijn al in overleg met een binnenlands expertisecentrum op dit gebied om PBPK modellering ook voor biologicals in non-humane primaten te gaan ontwikkelen.



> 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
[redacted] 017881
Bijlagen
1

Datum 20 juni 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted]

Op 1 mei 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Evaluatie van therapieën voor de behandeling van multipale sclerose" met aanvraagnummer [redacted] 017881. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 12 juni 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Op 8 juni 2017 hebben wij u gevraagd toe te lichten of u overwogen heeft physiologically based pharmacokinetic modelling toe doen. De CCD kan zich vinden in uw toelichting.

Beslissing

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

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

U kunt met uw project "Evaluatie van therapieën voor de behandeling van multipale sclerose" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 augustus 2017 tot en met 31 juli 2022. Deze termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat een vergunning niet voor langer dan 5 jaar mag worden afgegeven.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

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.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie [REDACTED] gevoegd. Dit advies is opgesteld op 24 april 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

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

Bezwaar

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen. Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

Bij het indienen van een bezwaarschrift vragen we u in ieder geval de datum van de beslissing waartegen u bezwaar maakt en het aanvraagnummer te vermelden. U vindt deze nummers in de rechter kantlijn in deze brief.

Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige voorziening vragen bij de Voorzieningenrechter van de rechtbank in de woonplaats van de aanvrager. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisend belang.

Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op

<http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

Meer informatie

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

Datum:

20 juni 2017

Aanvraagnummer:

[REDACTED] 2017881

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



Datum:
20 juni 2017
Aanvraagnummer:
[redacted] 017881

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: [REDACTED]

Adres: [REDACTED]

Postcode en plaats: [REDACTED]

Deelnemersnummer: [REDACTED]

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 augustus 2017 tot en met 31 juli 2022, voor het project "Evaluatie van therapieën voor de behandeling van multipale sclerose" met aanvraagnummer [REDACTED] 017881, volgens advies van Dierexperimentencommissie [REDACTED]. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Afdelingshoofd. Voor de uitvoering van het project is Afdelingshoofd verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 1 mei 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 1 mei 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 1 mei 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 24 april 2017, ontvangen op 24 april 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 12 juni 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1. Farmacokinetiek/Farmacodynamiek in de marmoset.				
	Klauwaapjes (bijv. Callithrix jacchus) /	32	100% Matig	
3.4.4.2. Therapie evaluatie in het marmoset EAE model.				
	Klauwaapjes (bijv. Callithrix jacchus) /	112	100% Matig	

Voorwaarden

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

Dit project wordt voorzien van beoordeling achteraf. Deze beoordeling zal uiterlijk juli 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

Aanvraagnummer:

██████████2017881

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:

2017881

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:

██████████ 2017881

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 W17-11										
nr.	document NTS 2017895	wordt verstrekt				weigeringsgronden				
		reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1	
1	Origineel aanvraagformulier				x		x			
2	NTS initieel			x						
3	Projectvoorstel initeel				x		x			
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1 initieel			x						
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2 initieel				x		x			
6	Ontvangstbevestiging				x		x			
7	Verzoek om DEC-advies				x		x			
8	Brief aanhouden beoordeling				x		x			
9	DEC-advies				x		x			
10	NTS aangepast	x								
11	Projectvoorstel aangepast				x		x			
12	Bijlage beschrijving dierproeven 1 aangepast			x						
13	Bijlage beschrijving dierproeven 2 aangepast				x		x			
14	Aanvullende vraag aan DEC				x		x			
15	Verzoek om aanvullende informatie				x		x			
16	Bijlage beschrijving dierproeven 1 aangepast			x						
17	Bijlage beschrijving dierproeven 2 aangepast				x		x			
18	Adviesnota CCD		x							x
19	Beschikking en vergunning				x		x			



AVD401002017 895

Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in	40100
		<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	Stichting Wageningen Research
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	
		KvK-nummer	9098104
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	Straat en huisnummer	Akkermaalsbos 12
		Postbus	59
		Postcode en plaats	6700AB Wageningen
		IBAN	NL10 RABO 0397066465
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Wageningen UR
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	
		Afdeling	
		Telefoonnummer	
		E-mailadres	
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.
		Functie	
		Afdeling	
		Telefoonnummer	
		E-mailadres	

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- | | |
|------------|--------------|
| Startdatum | 1 - 7 - 2017 |
| Einddatum | 1 - 6 - 2019 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Antilichaam-antibioticum conjugaat therapie tegen Q-koorts
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Antilichaam-antibioticum conjugaat therapie tegen Q-koorts
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|--|
| Naam DEC | DEC-WUR |
| Postadres | Droevendaalsesteeg 4, 6708 PB Wageningen |
| E-mailadres | dec@wur.nl |

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1287 Lege
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen. Via een eenmalige incasso
 Na ontvangst van de factuur
- Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*

5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee? Verplicht
- Projectvoorstel + 2 bijlagen
 Niet-technische samenvatting
- Overige bijlagen, indien van toepassing
- Melding Machtiging
 bestelorder WUR1043283

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	Wageningen
Datum	9 - 3 - 20
Handtekening	

Format
Niet-technische samenvatting

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

1 Algemene gegevens

1.1	Titel van het project	Antilichaam-antibioticum conjugaat therapie tegen Q-koorts
1.2	Looptijd van het project	1-7-2017 - 1-6-2019
1.3	Trefwoorden (maximaal 5)	antilichaam antibioticum therapie Q-koorts

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 Projectbeschrijving

3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)	<p>Sommige mensen krijgen jaren nadat ze een acute infectie met de Q-koorts bacterie (<i>Coxiella burnetii</i>) hebben opgelopen, chronische Q-koorts. De behandeling van chronische Q-koorts bestaat uit het langdurig gebruik van antibiotica, tot wel vier jaar. Het afremmen van de groei van de bacterie is echter vaak problematisch en soms zijn er extra antibiotica nodig om te proberen de groei van de bacterie volledig tot stilstand te brengen. Naast de ongewenste bijwerking van het langdurig gebruik van antibiotica voor de patiënt, leidt de continue blootstelling van de darmflora aan de antibiotica tot de ontwikkeling en verspreiding van antibiotica resistente genen. Een probleem dat ernstige proporties begint aan te nemen en niet onderschat mag worden. Meer effectieve en gerichte therapieën ter bestrijding van de Q-koorts bacterie zouden kunnen bijdragen aan een kortere behandeling van chronische Q-koorts.</p> <p>Dit onderzoek vloeit voort uit de ontwikkeling van de huidige op antilichamen gebaseerde kanker medicijnen. Een aantal van de recent ontwikkelde kanker medicijnen heeft de eigenschap zowel specifiek als zeer efficiënt de tumor aan te vallen, met relatief weinig bijverschijnselen voor de patiënt. Deze nieuwe medicijnen bestaan uit antilichamen gekoppeld aan toxische stoffen, die alleen in de tumor effectief zijn. Een vergelijkbare benadering, waarbij een antilichaam de antibiotica naar de geïnfecteerde cellen brengt is reeds gepatenteerd voor behandeling van infecties met de ziekenhuisbacterie MRSA.</p> <p>Met dit onderzoek willen we antwoord krijgen op de volgende vraag: Kunnen we door gebruikt te maken van de huidige kennis waaronder ontwikkelingen in gerichte kanker therapieën antilichaam-antibioticum conjugaat medicijnen ontwikkelen voor de behandeling van acute en vooral chronische Q-koorts infecties.</p>
3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?	<p>De antilichaam-antibioticum conjugaat therapie zou een ideale behandeling van Q-koorts kunnen zijn. De antibiotica komt alleen terecht daar waar het nodig is wat leidt tot minder bijwerkingen en antibiotica resistentie verspreiding. Het is meer effectief omdat antibiotica aan het antilichaam kan worden gekoppeld en zo gericht naar de geïnfecteerde cel kan worden geleid. Deze eigenschappen kunnen mogelijk leiden tot een betere en kortere behandeling van chronische Q-koorts.</p>
3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?	<p>muis, n=750</p>

3.4	Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?	de muizen zullen door middel van injectie geïnfecteerd worden en de behandeling krijgen. De infectie verloopt in het gekozen model zonder waarneembare ziekteverschijnselen, ook als geen behandeling wordt ingesteld.
3.5	Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?	licht ongerief: 300; matig ongerief: 450
3.6	Wat is de bestemming van de dieren na afloop?	dieren worden geëuthanaseerd aan het eind van de proef

4 Drie V's

4.1	Vervanging Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.	voorafgaand aan dit experiment zijn uitgebreide proeven gedaan in in vitro cel systemen om te bepalen hoe goed de nieuwe medicijnen in cellen bacteriën kunnen doden. De meest veelbelovende medicijn kandidaten zijn geselecteerd voor de dierproef. De evaluatie of het ontwikkelde medicijn via de bloedsomloop geïnfecteerd cellen in organen kan bereiken en daar bacteriën in geïnfecteerd cellen kan doden kan alleen in een diermodel getest worden.
4.2	Vermindering Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.	Reductie van het aantal te testen medicijnen doordat voorafgaand aan dit experiment uitgebreide proeven gedaan zijn in in vitro cel systemen om te bepalen hoe goed de nieuwe medicijnen in cellen bacteriën kunnen doden. Van deze medicijnen wordt vervolgens in de dierproef de veiligheid bepaald. Voor de veilige medicijnen wordt de optimale dosis bepaald. De meest veelbelovende medicijn kandidaten zijn geselecteerd voor de dierproef met Q koorts infectie. Op basis van eerdere ervaring met het infectiemodel en technisch vergelijkbare behandelingsstudies is de optimale groepsgrootte bepaald.

- 4.3 **Verfijning** Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diermodel(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.
- Het gekozen muismodel is het meest verfijnde model omdat het een kort durend model is waarbij de muizen na infectie geen waarneembare ziekteverschijnselen ontwikkelen. Daardoor blijft het ongerief voor de dieren beperkt. Op deze manier kan snel en effectief een selectie gemaakt worden van antilichaam-antibiotica conjugaten die doorontwikkeld kunnen worden als medicijnen voor mensen met Q-koorts.
- 4.4 Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.
- De dieren worden gehouden in groepshuisvesting met verrijking van de omgeving. Het aantal handelingen met de dieren die mogelijk stress op kunnen leveren is tot een minimum beperkt. De dieren wordt door deskundige verzorgers frequent geobserveerd zodat indien nodig direct actie kan worden ondernomen.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Form Project proposal

- This form should be used to write the project proposal of animal procedures.
- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed
- For more information on the project proposal, see our website(www.zbo-ccd.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

- | | | |
|-----|--|--|
| 1.1 | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. | 40100 |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment. | Stichting Wageningen Research |
| 1.3 | Provide the title of the project. | Antilichaam-antibioticum conjugaat therapie tegen Q-koorts |

2 Categories

- | | | |
|-----|---|---|
| 2.1 | Please tick each of the following boxes that applies to your project. | <input type="checkbox"/> Basic Research
<input checked="" type="checkbox"/> Translational or applied research
<input type="checkbox"/> Regulatory use of routine production
<input type="checkbox"/> Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare dier
<input type="checkbox"/> Research aimed at preserving the species subjected to procedures |
|-----|---|---|

Higher education or training

Forensic enquiries

Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

3 General description of the project

3.1 Background

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

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

De verwekker van Q-koorts, *C. burnetii* is een obligaat intracellulair pathogeen die zich met name verschuilt in macrofagen en macrofaag-achtige cellen in het lichaam. Blootstelling aan *Cb* kan leiden tot of acute of chronische infecties in mensen. Acute Q-koorts wordt in verband gebracht met lever en long-ontsteking. Chronische Q-koorts ontwikkelt zich over een periode van maanden tot jaren na de initiële infectie en wordt voornamelijk gekarakteriseerd door hartklepontsteking (endocarditis) of bloedvatontsteking (endovasculaire infectie). Hoewel slechts een klein percentage (2-5%) van de geïnfecteerde individuen chronische Q-koorts ontwikkelt, is de belasting van deze groep patiënten erg groot omdat langdurige behandeling met antibiotica nodig is om mortaliteit te voorkomen. Mortaliteit kan oplopen tot wel 60% wanneer chronische Q-koorts niet wordt behandeld. Naast de noodzaak van krachtigere antibiotica om acute Q-koorts te behandelen, zijn er vooral betere antibioticum behandelingen nodig voor chronische Q-koorts, één van de prioriteiten zoals vermeld in het rapport van de stichting Q-support.

De huidige antibiotica behandeling van Q-koorts patiënten die zijn geïnfecteerd met slechts één enkele pathogene bacterie – *C. burnetii* – toont vele overeenkomsten met chemotherapie ter behandeling van kanker: in beide gevallen wordt het hele lichaam bloot gesteld aan het medicijn, terwijl een relatief kleine populatie cellen (bacterie geïnfecteerde cellen/kanker cellen) het doel zijn. In het geval van kanker heeft de chemotherapie ernstige bijwerkingen voor de patiënt, in het geval van Q-koorts geeft de langdurige behandeling niet alleen bijwerkingen voor de patiënt, maar draagt het ook bij aan de problematische opkomst van antibiotica resistentie. Door continue blootstelling van de darmflora aan de antibiotica, ontstaan er antibiotica resistente bacteriën die bijdragen aan het als maar toenemende wereldwijde probleem van antibiotica resistentie. In beide gevallen zijn betere medicijnen, die specifiek de ziekte-veroorzakers aanpakken, wenselijk. Ons doel is om een eerste stap te zetten in de ontwikkeling van meer specifieke en krachtigere antibiotica ter behandeling van acute en vooral chronische Q-koorts.

Een aantal medicijnen die recentelijk zijn ontwikkeld ter behandeling van kanker hebben deze wenselijke eigenschappen. Antilichaam therapieën hebben de behandeling van kanker de laatste 20 jaar gerevolutioneerd. Deze antilichamen zijn ontwikkeld tot dragers van medicijnen om cytostatische medicijnen specifiek af te geven in tumoren. De antilichamen binden specifiek aan moleculen op de tumor cel en geven zo gericht de cytostatische medicijnen af waar ze werken moeten. Deze recent geïntroduceerde Antibody Drug Conjugates (ADC), Adcetris en Kadcyła, voor de

behandeling van respectievelijk Hodgkin lymphoma en HER2 positieve borstkanker zijn effectiever dan chemotherapie en hebben minder bijwerkingen. Recent is aangetoond dat conjugatie van antibiotica in plaats van cytostatische drugs aan antilichamen een veel belovende stap zou kunnen zijn voor de behandeling van multi-drug resistente *Staphylococcus aureus* (de ziekenhuis bacterie MRSA). (Lehar 2015) Door zijn obligate intracellulaire levensstijl is Cb een perfecte kandidaat voor een Antilichaam Antibiotica Conjugaten (AAC). Omdat het intracellulaire volume beperkt is, bereikt een relatief kleine hoeveelheid doelgerichte antibiotica snel voldoende concentratie in de cel om het pathogeen te elimineren. AAC kunnen krachtigere antibiotica naar de plaats van infectie brengen, om zowel op effectievere wijze de Q-koorts bacterie *C. burnetii* te elimineren als de ontwikkeling en verspreiding van antibioticum resistentie in de darmflora van de patiënt te voorkomen. De lange half-waarde tijd van antilichamen (30 dagen) in vergelijking met antibiotica (gemiddeld 3 uur) kan mogelijk leiden tot een verminderde doseringsfrequentie. Effectievere behandeling kan ook tot een kortere behandelingsduur van de Q-koorts patiënt leiden.

Lehar SM, Pillow T, Xu M, Staben L, Kajihara KK, Vandlen R, DePalatis L, Raab H, Hazenbos WL, Morisaki JH, Kim J, Park S, Darwish M, Lee BC, Hernandez H, Loyet KM, Lupardus P, Fong R, Yan D, Chalouni C, Luis E, Khalfin Y, Plise E, Cheong J, Lyssikatos JP, Strandh M, Koefoed K, Andersen PS, Flygare JA, Wah Tan M, Brown EJ, Mariathasan S. Novel antibody-antibiotic conjugate eliminates intracellular *S. aureus*. *Nature*. 2015 Nov 19;527(7578):323-8. doi: 10.1038/nature16057.

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?

Dit onderzoeksvoorstel heeft één algemeen doel: Het ontwikkelen van Antilichaam Antibiotica Conjugaten (AAC) voor een effectieve behandeling van Q-koorts. In de eerste fase van het project ligt de focus op het identificeren van het juiste antigeen en in vitro validatie. De geselecteerde AAC moeten veilig en effectief zijn tegen Cb in vivo. In de tweede fase van het project zullen deze resultaten daarom in vivo getest worden door het toepassen van de in vitro geteste AAC in het Q-koorts infectie muizen model. Door combinatie van bestaande expertise met betrekking tot de ontwikkeling van AAC, in vitro effectiviteit en kennis van en ervaring met het Q-koorts infectie model in muizen wordt de haalbaarheid van het project hoog geacht.

3.3 Relevance

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

Wetenschappelijk belang: ontwikkeling van AAC als mogelijke therapie tegen intra-cellulaire bacteriële infecties is een nieuwe ontwikkeling waarmee antibiotica effectiever ingezet kunnen worden met minder bijwerkingen door lagere doseringen en doseringsfrequentie; en minder risico op resistentie ontwikkeling.

Maatschappelijk belang: Chronische Q-koorts is erg belastend voor patiënten omdat nu langdurige behandeling met antibiotica nodig is om mortaliteit te voorkomen. Mortaliteit kan oplopen tot wel 60% wanneer chronische Q-koorts niet wordt behandeld. Naast de noodzaak van krachtigere antibiotica om acute Q-koorts te behandelen, zijn er vooral betere antibioticum behandelingen nodig voor chronische Q-koorts, één van

de prioriteiten zoals vermeld in het rapport van de stichting Q-support. Antibiotica Antilichaam Conjugaten (AAC) kunnen krachtigere antibiotica naar de plaats van infectie brengen, om zowel op effectievere wijze de Q-koorts bacterie *C. burnetii* te elimineren als de ontwikkeling en verspreiding van antibioticum resistentie in de darmflora van de patiënt te voorkomen. Mogelijk kan AAC ook leiden tot een verminderde doseringsfrequentie, en tot een kortere behandelingsduur van de Q-koorts patiënt.

3.4 Research Strategy

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

De eisen voor de ontwikkeling van Antibiotica Antilichaam Conjugaten die effectief antibiotica leveren op de plaats van infectie met *C. burnetii* viervoudig: het molecuul wat herkent wordt door het antilichaam moet op de (macrofaag)cellen voorkomen waar de bacterie zich in vermenigvuldigt, en dat molecuul moet in voldoende mate op de celmembraan aanwezig zijn om genoeg antibiotica af te leveren om *C. burnetii* effectief te doden. Het antilichaam moet specifiek en sterk binden aan het molecuul op de cel om correcte lokalisatie en afgifte van de antibiotica waarborgen. De koppeling die het antilichaam met het antibioticum verbindt moet zorgen voor afgifte van het antibiotica in de nabijheid van het pathogeen, maar tegelijkertijd moet het bescherming bieden tegen ongewenste afgifte in het plasma. Het antibioticum zelf moet voldoende sterk zijn om *C. burnetii* in lage concentraties te doden en actief zijn in een het relatief zure milieu van het fagosoom waar *C. burnetii* verblijft.

Fase 1 van het project is de ontwikkeling van AAC. Dit gedeelte van het project wordt uitgevoerd met behulp van chemische testen en in vitro cel systemen. AAC die in de in vitro systemen aan de bovenstaande eisen voldoen komen in aanmerking voor in vivo testen.

Fase 2 betreft het in vivo testen van geselecteerde AAC zoals beschreven in deze aanvraag.

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.

De in vivo testen richten zich op 2 hoofdonderdelen:

- (1) veiligheid en farmacokinetiek van de AAC: bepalen van een veilige en effectieve dosis en de halfwaardetijd van de AAC in vivo in de muis
- (2) therapeutische effectiviteit in het muis Q-koorts infectiemodel

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

Aan de hand van de in vitro resultaten is een inschatting gemaakt worden van welke dosis in vivo gebruikt moeten worden. Op basis hiervan moet in muizen bepaald worden of de berekende doses veilig zijn of leiden tot bijwerkingen.

In de veiligheidsstudie wordt voor elk te testen conjugaat eerst het antilichaam zonder antibioticum conjugaat getest worden. Als het antilichaam (zonder gekoppeld antibioticum) bijwerkingen laat zien ((acute) klinische verschijnselen en/of lokale ontstekingsverschijnselen in organen op basis van histopathologische analyse) dan zal dit antilichaam en de bijbehorende AAC niet verder getest worden. (Go / No Go)

Van de veilige antilichamen moet bepaald worden wat de halfwaardetijd van de AAC in vivo is in de muis zodat de dosis en het behandelingschema bepaald kunnen worden. Ook hier wordt naast farmacokinetische kenmerken ook de veiligheid van het AAC geëvalueerd. (Go / No Go)
Als de beoogde dosis veilig is voor de muis en zonder bijwerkingen gebruikt kan worden moet de effectiviteit van de AAC bepaald worden. Voor dit doel worden met muizen geïnfecteerd met Cb en vervolgens behandeld met AAC. In deze muizen wordt de effectiviteit van de behandeling bepaald aan de hand van de hoeveelheid Cb die in de milt van de muis aangetoond wordt na sectie.

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	Veiligheid en farmacokinetiek van AAC
2	Therapeutische effectiviteit van AAC

Appendix
Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	40100	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Wageningen Research	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 1	Type of animal procedure Veiligheid en farmacokinetiek van AAC

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.

Om te bepalen of het antilichaam-antibioticum conjugaat (AAC) veilig in vivo kan worden toegepast in hoeveelheden die nodig zijn om therapeutische effectiviteit te bereiken moeten veiligheids- en farmacokinetiek studies verricht worden. Iedere AAC bestaat uit een combinatie van een specifiek antilichaam en een antibioticum. Het antilichaam is in staat om aan macrofagen en andere relevante myeloïde cellen te binden waar *Coxiella burnetii* (Cb) zich in kan ophouden en zorgt er dus voor dat het antibioticum op de juiste plaats in het lichaam wordt afgeleverd. Na binding van het antilichaam wordt de AAC in zijn geheel opgenomen door de fagocyterende cel. In de cel vindt een enzymatische splitsing plaats waardoor het antibioticum los komt van de AAC en de bacterie in de cel kan doden. Door de koppeling van de 2 actieve stoffen (antilichaam en antibioticum) is het mogelijk dat de farmacokinetiek (zoals de halfwaarde tijd en de klaring) anders is dan van de afzonderlijke stoffen. Dit geldt ook voor mogelijke bijwerkingen. Om deze aspecten te kwantificeren en evalueren worden dieren behandeld met verschillende doses van de ontwikkelde AAC. Op 3-5 tijdstippen in een periode tot maximaal 28 dagen na toediening van de AAC worden 3 dieren per tijdstip geëuthanaseerd. Serum van deze muizen wordt gebruikt om de farmacokinetiek van de AAC te bepalen en diverse weefsels van deze dieren wordt geanalyseerd door middel van macroscopisch en histopathologisch onderzoek om, naast klinische observatie, bijwerkingen vast te kunnen stellen.

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

Na 7 dagen acclimatisatie worden per te testen AAC 3 groepen vrouwelijke muizen van 6-8 weken leeftijd intraveneus geïnjecteerd met antilichaam of antilichaam-antibioticum conjugaat. Het antilichaam-antibioticum conjugaat wordt in 2 doses getest. Deze doses worden bepaald aan de hand van de berekende dosis op basis van gegevens van in vitro studies met cel systemen en een dosis die 10 maal hoger is. Het vrije antilichaam wordt in de hoge doses getest. Op 3-5 tijdstippen in een periode tot maximaal 28 dagen na toediening van de AAC worden 3 dieren per tijdstip geëuthanaseerd. Serum van deze muizen wordt gebruikt om de farmacokinetiek van de AAC te bepalen en diverse weefsels van deze dieren wordt geanalyseerd door middel van macroscopisch en histopathologisch onderzoek om, naast klinische observatie, bijwerkingen vast te kunnen stellen van zowel het vrije antilichaam als het antilichaam-antibioticum conjugaat.

Er is gekozen voor deze werkwijze omdat hiermee voorkomen wordt dat er bij de muizen herhaaldelijk via reto-orbitaal punctie bloed afgenomen moet worden. Daarnaast heeft deze methode als voordeel dat op weefselniveau eventuele bijwerkingen vastgesteld kunnen worden van zowel het vrije antilichaam als het antilichaam-antibioticum conjugaat. Aangezien de AAC methode zich specifiek richt op macrofagen en andere myeloïde cellen die met name in diverse weefsel voorkomen (en niet in circulatie) geniet deze benadering de voorkeur.

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

Er is gekozen voor sequentieel opofferen van 3 dieren per tijdstip op 3-5 tijdstippen in een periode tot maximaal 28 dagen na toediening van de AAC op basis van bovenstaande redenering, statistische methoden en uitkomst gegevens in de literatuur over farmacokinetische studies van antilichamen in muizen (Tam 2013).

Tam SH, McCarthy SG, Brosnan K, Goldberg KM, Scallon BJ. Correlations between pharmacokinetics of IgG antibodies in primates vs. FcRn-transgenic mice reveal a rodent model with predictive capabilities. *MAbs*. 2013 May-Jun;5(3):397-405. doi: 10.4161/mabs.23836.

B. The animals

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

De studies worden uitgevoerd met 6-8 weken oude vrouwelijke muizen (Specific Pathogen Free female Swiss OF1 stam) van erkend fokbedrijf. Dit is de muizenstam, geslacht en leeftijd zoals die ook gebruikt wordt voor de Cb challenge en effectiviteitsstudies. Het gebruik van hetzelfde model is belangrijk om de resultaten zo relevant mogelijk te maken voor de vervolg studie (zie bijlage 2)

Voor 1 farmacokinetiek experiment worden maximaal 3 muizen per tijdstip op maximaal 5 tijdstippen gebruikt: 15 muizen (hiermee kan een tijdcurve gemaakt worden waaruit halfwaarde tijd berekend kan worden)

Voor elk te testen conjugaat zal eerst een proef met het antilichaam zonder antibioticum conjugaat uitgevoerd worden. Als het antilichaam zonder antibioticum bijwerkingen laat zien ((acute) klinische verschijnselen en/of lokale ontstekingsverschijnselen in organen op basis van histopathologische analyse dan zal dit antilichaam en de bijbehorende AAC niet verder getest worden. (NoGo)

Voor elk AAC zijn 2 experimenten nodig om verschillende doses te testen voor kinetiek en mogelijke bijwerkingen (veiligheid).

In totaal zullen maximaal 5 AAC worden ontwikkeld die gericht zijn tegen verschillende moleculen die op de oppervlakte van macrofagen aanwezig zijn. Aan deze antilichamen wordt een antibioticum gekoppeld dat werkzaam is tegen Cb (bijvoorbeeld rifamycine of derivaten daarvan).

Dat betekent dat maximaal $(15) \times (2) \times (5) = 150$ muizen gebruikt zullen worden.

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.

Vervanging: farmacokinetiek en veiligheid kan alleen uitgevoerd worden in het levende dier. Te testen AAC kandidaten gaat door een uitgebreide in vitro voorscreening zodat alleen AAC kandidaten die specifiek de beoogde doelcellen herkennen en op de juiste wijze het antibioticum in de cel afgeven ook daadwerkelijk in dieren getest worden. Vermindering: in de methode gebruikt door Tam et al worden steeds 4 of 5 dieren per tijdstip bemonsterd. Echter de waargenomen spreiding in die data is zo beperkt dat wij in deze proef het aantal dieren per tijdstip terug gebracht hebben tot 3 dieren, hetgeen voldoende moet zijn voor een betrouwbaar resultaat. Verfijning: wij kiezen ervoor om voor de farmacokinetiek niet herhaalde retro-orbitale punctie uit te voeren bij de muizen als methode om serum te verzamelen maar onderzoek naar bijwerkingen op weefsel niveau te combineren met de farmacokinetiek studie. Hierbij worden dieren per tijdstip geëuthanaseerd. Het ongerief voor de dieren is hierdoor minder, er kan meer serum afgenomen worden wat de betrouwbaarheid van de AAC bepalingstesten ten goede komt en er kan nauwkeurig onderzoek gedaan worden naar bijwerkingen in relevante weefsels.

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

wij kiezen ervoor om voor de farmacokinetiek niet herhaalde retro-orbitale punctie uit te voeren bij de muizen als methode om serum te verzamelen maar onderzoek naar bijwerkingen op weefsel niveau te combineren met de farmacokinetiek studie. Hierbij worden dieren per tijdstip geëuthanaseerd. Het ongerief voor de dieren is hierdoor minder, er kan meer serum afgenomen worden wat de betrouwbaarheid van de AAC bepalingstesten ten goede komt en er kan nauwkeurig onderzoek gedaan worden naar bijwerkingen in relevante weefsels. Dieren worden gehouden in groepen en kooiverrijking wordt toegepast.

Repetition and Duplication

E. Repetition

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.

De AAC tegen Cb die ontwikkeld worden zijn voor zover ons bekend uniek en niet eerder beschreven

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

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.

De injectie met de AAC zal vanwege het doorsteken van de huid een korte lichte pijnprikkel geven maar het ongerief door het toepassen van een pijnbestrijdingsmethode weegt niet op tegen het te verwachten effect hiervan.

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

stress door hantering, bijwerking van de AAC

Explain why these effects may emerge.

oppakken en behandelen van dieren is stressvol; de antilichaam component van de AAC is gericht tegen moleculen op de oppervlakte van macrofagen en myeloïde cellen. Deze cellen kunnen ontstekingsverschijnselen veroorzaken als ze in weefsel geactiveerd worden. Bij in vivo toepassing van de AAC zou dit in de context van weefsel ontsteking tot gevolg kunnen hebben ook al is dit stimulerende effect in vitro bij cellijnen niet waargenomen.

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

het aantal handelingen per dier is door de gekozen opzet tot een minimum beperkt; door middel van in vitro vooronderzoek worden AAC ontwikkeld waarvan het onwaarschijnlijk is dat deze tot bijwerkingen zullen leiden; als bijwerkingen zoals ontsteking waargenomen worden is dit een no go voor verdere testen van het betreffende AAC.

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.

muizen die na behandeling op 2 opeenvolgende dagelijkse observaties tekenen van ongerief vertonen die duiden op het optreden van (systemische) ontsteking (opgezet haar, bol zitten, afzonderen, niet reageren op dierverzorger) worden geëuthanaseerd en door middel van histopathologisch onderzoek geëvalueerd.

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).

injectie met AAC: licht ongerief euthanasie: licht ongerief cumulatief ongerief indien geen bijwerking optreedt (>98% van de dieren): licht ongerief indien bijwerking optreedt (wat op basis van literatuur, in vitro vooronderzoek en verwachting uitzonderlijk geacht word): matig ongerief (

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

Om te bepalen of de toepassing van de AAC leidt tot ontstekingsverschijnselen in weefsels is het doden van het dier essentieel.

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

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

Yes

Appendix
Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	40100				
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Wageningen Research				
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	<table border="1"><thead><tr><th>Serial number</th><th>Type of animal procedure</th></tr></thead><tbody><tr><td>2</td><td>Therapeutische effectiviteit van AAC</td></tr></tbody></table>	Serial number	Type of animal procedure	2	Therapeutische effectiviteit van AAC
Serial number	Type of animal procedure					
2	Therapeutische effectiviteit van AAC					

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.

Om te bepalen of het antibioticum-antilichaam conjugaat (AAC) in vivo kan worden toegepast om therapeutische effectiviteit tegen *Coxiella burnetii* (Cb) te bereiken moeten therapeutische effectiviteits studies verricht worden. Iedere AAC bestaat uit een combinatie van een specifiek antilichaam en een antibioticum. Het antilichaam is in staat om aan macrofagen en andere relevante myeloïde cellen te binden waar *Coxiella burnetii* (Cb) zich in kan ophouden en zorgt er dus voor dat het antibioticum op de juiste plaats in het lichaam wordt afgeleverd. Na binding van het antilichaam wordt de AAC in zijn geheel opgenomen door de fagocyterende cel. In de cel vind een enzymatische splitsing plaats waardoor het antibioticum los komt van de AAC en de bacterie in de cel kan doden. Om de preventieve en therapeutische effectiviteit te kwantificeren en evalueren worden dieren behandeld met de ontwikkelde AAC in de eerder bepaalde veilige optimale dosis. Hiervoor wordt een challenge model gebruikt waarbij muizen geïnfecteerd worden met Cb na (preventief) of voor (therapeutisch) behandeling met een AAC. Het challenge model dat in eerdere studies gebruikt is. Dit betreft een kort durend infectie model in muizen met een looptijd van 7 dagen waarbij muizen geen klinisch waarneembare symptomen hebben. Virulentie van Cb en ernst van infectie worden in dit model bepaald aan de hand van het gewicht van de muis, de milt van de muis en de Cb load in de milt.

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

Therapeutische effectiviteit: Na 7 dagen acclimatisatie worden vrouwelijke muizen van 6-8 weken leeftijd geïnfecteerd met ca 10^5 genome copies Cb in max 0,2 ml volume via een intraperitoneale injectie. Op 18-24 uur na infectie worden de muizen intraveneus geïnjecteerd met de vooraf bepaalde dosis AAC in max. 0.2 ml volume (bijlage 1). Afhankelijk van de farmacokinetiek zoals bepaald in bijlage 1 wordt de behandeling met AAC in de periode van 2-6 dagen na infectie maximaal 2 maal herhaald. Controle groepen krijgen een intraveneuze behandeling met fysiologische zoutoplossing, antilichaam zonder antibioticum en vrij antibioticum. Zeven dagen na infectie worden de muizen geëuthanaseerd. De muizen worden gewogen, de milt wordt verwijderd en gewogen en de load van Cb in de milt wordt bepaald als maat voor effectiviteit van de AAC.

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

Er is gekozen voor een eindpunt studie op basis van bovenstaande redenering en statistische methoden en uitkomst gegevens in de literatuur over therapeutisch effect van AAC tegen *Staphylococcus aureus* infectie in een vergelijkbaar muizen model (Lehar 2015) en het infectiemodel van Cb in Swiss OF1 muizen [REDACTED]. Uit deze studies blijkt een groepsgrootte van n=10 muizen noodzakelijk om met voldoende betrouwbaarheid effectiviteit van AAC tegen Cb infectie in muizen vast te stellen.

Lehar SM, Pillow T, Xu M, Staben L, Kajihara KK, Vandlen R, DePalatis L, Raab H, Hazenbos WL, Morisaki JH, Kim J, Park S, Darwish M, Lee BC, Hernandez H, Loyet KM, Lupardus P, Fong R, Yan D, Chalouni C, Luis E, Khalfin Y, Plise E, Cheong J, Lyssikatos JP, Strandh M, Koefoed K, Andersen PS, Flygare JA, Wah Tan M, Brown EJ, Mariathasan S. Novel antibody-antibiotic conjugate eliminates intracellular *S. aureus*. *Nature*. 2015 Nov 19;527(7578):323-8. doi: 10.1038/nature16057.

B. The animals

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

De studies worden uitgevoerd met 6-8 weken oude vrouwelijke muizen (Specific Pathogen Free female Swiss OF1 stam) van erkend fokbedrijf. Dit is de muizenstam, geslacht en leeftijd zoals die ook gebruikt wordt voor eerder beschreven Cb challenge model en de voorafgaande farmacokinetiek studie (zie bijlage 1). Het gebruik van hetzelfde model is belangrijk om de resultaten zo betrouwbaar mogelijk te maken en vergelijkbaar met eerder onderzoek voor wat betreft het Cb challenge model.

Voor 1 effectiviteitsexperiment worden maximaal 10 muizen per challenge groep gebruikt en 4 groepen: controle (behandeld met fysiologisch zout oplossing); alleen 1 malig antilichaam; alleen 1 malig antibioticum en 1 malig AAC. = totaal 40 dieren

Elk AAC wordt getest op werkzaamheid tegen 3 verschillende stammen van Cb; de referentie stam Nine Mile, en 2 gekarakteriseerde veldisolaten van geit resp. rund.

In totaal zullen maximaal 5 AAC worden ontwikkeld die gericht zijn tegen verschillende moleculen die op de oppervlakte van macrofagen aanwezig zijn. Aan deze antilichamen wordt een antibioticum gekoppeld dat werkzaam is tegen Cb (bijvoorbeeld rifamycine of derivaten daarvan).

Dat betekent dat maximaal $(40) \cdot (3) \cdot (5) = 600$ muizen gebruikt zullen worden.

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.

Vervanging: effectiviteit kan alleen uitgevoerd worden in het levende dier. Te testen AAC kandidaten gaat door een uitgebreide in vitro voorscreening en een in vivo veiligheidsstudie (zie bijlage 1) zodat alleen AAC kandidaten die zonder bijwerkingen specifiek de beoogde doelcellen herkennen en op de juiste wijze het antibioticum in de cel afgeven en Cb afdoden ook daadwerkelijk in Cb geïnfecteerde dieren getest worden. Vermindering: op basis van behaalde resultaten in technisch vergelijkbare studies wordt het minimaal aantal dieren gebruikt waarbij een betrouwbaar resultaat te behalen is. Verfijning: het gekozen muizen model leidt niet tot klinische symptomen bij de muizen in tegenstelling tot andere Cb infectiemodellen terwijl op basis van milt gewicht en Cb load in de milt een goede indicatie van effectiviteit gemeten kan worden.

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

Het gekozen muizen model leidt niet tot klinische symptomen bij de muizen in tegenstelling tot andere Cb infectiemodellen terwijl op basis van milt gewicht en Cb load in de milt een goede indicatie van effectiviteit gemeten kan worden. Dieren worden gehouden in groepen en kooiverrijking wordt toegepast.

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.

De AAC tegen Cb die ontwikkeld worden zijn voor zover ons bekend uniek en niet eerder beschreven

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.

H. Pain and pain relief

De ip injectie met het infectie inoculum en de iv injectie met de AAC zal vanwege het doorsteken van de huid een korte lichte pijnprikkel geven maar het ongerief door het toepassen van een pijnbestrijdingsmethode weegt niet op tegen het te verwachten effect hiervan.

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

stress door hantering, infectie met Cb

Explain why these effects may emerge.

oppakken en behandelen van dieren is stressvol; intra peritoneale injectie met virulente Cb kan mogelijk in uitzonderlijke gevallen tot ontsteking van de buikholte leiden

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

het aantal handelingen per dier is door de gekozen methode tot een minimum beperkt, er wordt een muizen model gebruikt waar het ontstaan van klinische symptomen uitzonderlijk is, door toepassing van humane eindpunten wordt ernstig ongerief voorkomen

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.

muizen die na behandeling op 2 opeenvolgende dagelijkse observaties tekenen van ongerief vertonen die duiden op het optreden van (systemische) ontsteking (opgezet haar, bol zitten, afzonderen, niet reageren op dierverzorger) worden geëuthanaseerd en door middel van histopathologisch onderzoek geëvalueerd.

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).

injectie met AAC: licht ongerief injectie/infectie met Cb: licht ongerief euthanasie: licht ongerief cumulatief ongerief: indien therapeutische effectiviteit optreedt (75% van de dieren): matig ongerief

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

Om te bepalen of de toepassing van de AAC leidt tot therapeutisch effectieve afdoding van Cb in weefsels is het doden van het dier essentieel.

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

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

Yes



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Wageningen Research

Postbus 59
6700 AB WAGENINGEN



**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
AVD401002017895

Bijlagen

2

Datum 10 maart 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 10 maart 2017. Het gaat om uw project "Antilichaam-antibioticum conjugaat therapie tegen Q-koorts". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD401002017895. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

Datum:

10 maart 2017

Aanvraagnummer:

AVD401002017895

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

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:

10 maart 2017

Aanvraagnummer:

1002017895

Over uw project

Geplande startdatum: 1 juli 2017
Geplande einddatum: 1 juni 2019
Titel project: Antilichaam-antibioticum conjugaat therapie tegen Q-koorts
Titel niet-technische samenvatting: Antilichaam-antibioticum conjugaat therapie tegen Q-koorts
Naam DEC: DEC-WUR
Postadres DEC: Droevendaalsesteeg 4, 6708 PB Wageningen
E-mailadres DEC: dec@wur.nl


Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1.287,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen


Verplichte bijlagen: Projectvoorstel
 Beschrijving Dierproeven
 Niet-technische samenvatting

Ondertekening

Naam: 
Functie: 
Plaats: Wageningen
Datum: 9 maart 2017



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Wageningen University and Research Concernstaf+
t.a.v. Crediteurenadministratie
Droevendaalsesteeg 4
6708 PB WAGENINGEN


**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
AVD401002017895
Bijlagen
2

Datum 10 maart 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 10 maart 2017
Vervaldatum: 9 april 2017
Factuurnummer: 170895
Ordernummer: WUR1043283

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD401002017895	€ 1.287,00

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

[REDACTED]

Van: DEC WUR <dec@wur.nl>
Verzonden: maandag 13 maart 2017 10:31
Aan: 'info@zbo-ccd.nl'
Onderwerp: RE: Verzoek om advies over projectvergunningsaanvraag AVD401002017895

L.S.,

Dit project wordt 20-3 in de DEC behandeld.

Met vriendelijke groeten,

[REDACTED]

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

[REDACTED]

Dit bericht is uitsluitend bestemd voor geadresseerde. Het bericht kan vertrouwelijke informatie bevatten. Gebruik door derden of openbaarmaking van dit bericht zonder toestemming van de [REDACTED] is niet toegestaan. Als u dit bericht per abuis heeft ontvangen, wordt u verzocht het te vernietigen en ons te informeren.

From: info@zbo-ccd.nl [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]
Sent: vrijdag 10 maart 2017 11:28
To: DEC WUR
Subject: Verzoek om advies over projectvergunningsaanvraag AVD401002017895

Geachte leden van DEC-WUR

De Centrale Commissie Dierproeven (hierna: CCD) verzoekt u in het kader van vergunningverlening (of wijziging van een vergunning) advies te geven over het project met als titel: "Antilichaam-antibioticum conjugaat therapie tegen Q-koorts" en aanvraagnummer: AVD401002017895.

Uw commissie wordt verzocht op grond van artikel 10.a.2 van de Wet op de dierproeven de aanvraag te beoordelen en een ethische toetsing uit te voeren waarbij wordt afgewogen of de doelstelling van het project, de verwachte voordelen voor mens, dier of milieu en de haalbaarheid van de doelstellingen, het

gebruik van dieren en de schade die zal worden toegebracht aan de dieren in de vorm van lijden, pijn en angst kan rechtvaardigen.

Graag ontvangen wij van u bericht dat deze e-mail goed is ontvangen en wanneer u dit advies in de vergadering gaat bespreken.

Voor het in te dienen advies dient de DEC gebruik te maken van de meest actuele versie van het op de website van de CCD gepubliceerde Format DEC-advies en de toelichting daarbij. U dient deze aanvraag vertrouwelijk te behandelen. Voor de communicatie met de CCD dient u gebruik te maken van de beveiligde verbinding.

De CCD verzoekt u uiterlijk binnen 20 werkdagen, na 10-03-2017, uw advies bij de CCD in te dienen. Indien de aanvraag door uw commissie niet in behandeling kan worden genomen, dient u dit per ommegaande per e-mail aan de CCD te melden.

Ingeval uw commissie tussentijds aanvullende informatie wil inwinnen bij de aanvrager kan de termijn worden opgeschort. U dient de CCD zo spoedig mogelijk op de hoogte te stellen van deze opschorting. Zodra de opschortende termijn is beëindigd, stelt u de CCD hiervan onverwijld op de hoogte. Opschorting van de adviestermijn vindt niet plaats ingeval u ten behoeve van uw advies een onafhankelijk extern expert raadpleegt.

Met vriendelijke groeten,

CCD



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Wageningen Research

Postbus 59

6700 AB WAGENINGEN



**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
AVD401002017895

Datum 10 maart 2017

Betreft Vervolg aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED],

Op 10 maart 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Antilichaam-antibioticum conjugaat therapie tegen Q-koorts" met aanvraagnummer AVD401002017895.

DEC advies gevraagd

Uw aanvraag is naar DEC-WUR gestuurd. Zij zal hierover advies aan de CCD uitbrengen. Als de DEC vragen heeft, zal zij contact met u opnemen.

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Postbus 65 | 8200 AB Lelystad

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Wageningen
University & Research

DATUM
9 mei 2017

ONDERWERP
aanvraag projectvergunning
AVD401002017895

ONS KENMERK
AVD401002017895

POSTADRES
[REDACTED]

BEZOEKADRES
[REDACTED]

INTERNET
www.wur.nl

KVK NUMMER
09098104

CONTACTPERSOON
[REDACTED]

TELEFOON
[REDACTED]

E-MAIL
DEC@wur.nl

Geachte CCD,

Onderstaand het advies dat de DEC-WUR heeft gegeven aangaande het project "Antilichaam-antibioticum conjugaat therapie tegen Q-koorts"

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: **AVD401002017895**
2. Titel van het project: Antilichaam-antibioticum conjugaat therapie tegen Q-koorts
3. Titel van de NTS: Antilichaam-antibioticum conjugaat therapie tegen Q-koorts
4. Type aanvraag: nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
DEC-WUR
[REDACTED]
Secretaris: dec@wur.nl
6. Adviestraject
Ontvangen door DEC: 08-03-2017
Aanvraag compleet: 08-03-2017
In vergadering besproken: 20-03-2017
Anderszins behandeld: schriftelijke ronde 20-04-2017
Termijnonderbreking(en) van 21-03-2017 tot 19-04-2017
Aanpassing aanvraag: 19-04-2017
Advies aan CCD: zie datum brief
7. De Instantie voor Dierenwelzijn heeft een positief oordeel over de kwaliteit van de aanvraag uitgebracht en de DEC heeft dit in haar overweging betrokken.
9. Correspondentie met de aanvrager
Datum vragen: 21-03-2017
Gestelde vragen en antwoorden:
 - De kennis en kunde van deze onderzoeksgroep is, afgaande op het geschreven voorstel en oordeel nog niet voldoende gewaarborgd in de ogen van de DEC. De DEC is van mening dat men voldoende kennis en kunde heeft om de proef technisch goed uit te voeren, maar kan niet goed beoordelen of men voldoende samenwerking heeft met partijen buiten de proefdierwereld, in de klinische/humane geneeskunde waardoor de resultaten in de toekomst vertaalbaar zijn naar mensen.
Dit onderzoeksvoorstel hoort bij een project wat loopt bij een universitair research laboratorium waar de AAC ontwikkeld worden. Dit project is gehonoreerd door de Nederlandse belangen organisatie voor chronische Q-

koorts patiënten. Deze organisatie is in hoge mate gericht op het subsidiëren van projecten die op kortere of langere termijn een bijdrage kunnen leveren aan de betere behandeling van chronische Q koorts patiënten. Vanwege de contacten en de rapportage cyclus is er dus nauwlettend toezicht op dit project en de mogelijkheden tot translatie. Daarnaast heeft de onderzoeksgroep op basis van onderzoek tijdens de Q-koorts uitbraak in Nederland nauwe contacten met onder andere het universitair medisch centrum wat de zorg voor chronische Q-koorts patiënten uitvoert en coördineert. Via dit bestaande netwerk borgen wij de samenwerking met partijen buiten de proefdierwereld en spelen wij een actieve rol in het meedenken over oplossingen die voor patiënten relevant kunnen zijn of worden.

- De DEC is van mening dat het project te algemeen beschreven is. Zij heeft hierover de volgende vragen:
 - Wat maakt dat de resultaten vertaalbaar is naar de mens? Voor dit specifieke in ontwikkeling zijnde medicijn is deze dierproefstudie de eerste stap van in vitro naar in vivo. Dit is een essentiële stap omdat in een in vitro systeem het medicijn en de cellen direct met elkaar in contact kunnen komen. In een dergelijk systeem werkt het medicijn in zowel dierlijke als humane cellen. In een in vivo situatie wordt het medicijn in de bloedbaan ingebracht en moet vervolgens de bloedbaan verlaten om bij de relevante cellen te komen die niet vrij in de bloedbaan bewegen maar in orgaanweefsel zitten. De huidige aanvraag is er dus op gericht om die vraag te beantwoorden en de muis is een goed model hiervoor omdat het mechanisme van verdeling van de AAC in de bloedbaan en de weefsel grote overeenkomsten vertoont met het mechanisme in de mens. Als de AAC inderdaad in de doelcellen in het weefsel aankomt en werkt tegen de bacterie zonder dat bijwerkingen optreden dan is dat een belangrijke set aan data die gebruikt kunnen worden in aanvragen die de opdrachtgever wil doen om toestemming te krijgen om het medicijn te gaan testen in 'clinical trials' met mensen. Varianten van deze combinatie medicijnen (een werkzame stof gekoppeld aan een antilichammolecuul) zijn succesvol getest in muizenmodellen om vervolgens in te stromen in humane 'clinical trials' en de eerste varianten hiervan zijn, zoals vermeld in de aanvraag, recent op de markt gekomen.
 - Waarom is dit een goed model? De muis is een goed model om te testen of het medicijn vanuit de bloedbaan de doelcellen in weefsel kan bereiken omdat het mechanisme van verdeling van de AAC in de bloedbaan en de weefsel grote overeenkomsten vertoont met het mechanisme in de mens. In combinatie met het gevalideerde Q koorts infectiemodel kan naast de veiligheid ook een eerste indicatie gekregen worden van de effectiviteit van het AAC.
 - Het aantal dieren en het ongerief dat de dieren ondergaan is onvoldoende onderbouwd. De onderzoeker heeft dit in de bijlagen beter onderbouwd.
 - In bijlage 2 wordt gesproken over preventieve behandeling. De DEC constateert dat de onderzoeker hier in de verdere aanvraag niet op terug komt en alleen de therapeutische behandeling uitwerkt. Verder vraagt de DEC zich af wat het nut is van preventieve behandeling. De DEC kan zich niet voorstellen dat men preventief antibiotica of antilichamen zal toedienen. De term preventieve behandeling had hier niet moeten staan want dat is inderdaad geen voorstelbare toepassing van dit medicijn.

- De DEC is van mening dat de HEP's beter beschreven moeten worden. Kan er een scorelijst toegevoegd worden?
De klinische scorelijst is toegevoegd.
- De onderbouwing voor de keuze van het model (en daarmee het aantal dieren) moet verduidelijkt worden. Waarom is dit model het meest geschikt?
De keuze van het model is enerzijds gebaseerd op modellen waarin met succes muizen gebruikt worden voor veiligheids- en farmacokinetiekstudies van antilichamen die ontwikkeld worden voor gebruik in mensen. Anderzijds is het muizen Q-koorts model zoals beschreven in de aanvraag een Q-koorts infectie model met een korte looptijd en beperkt ongerief waarin de vraag of het AAC medicijn de doelcellen kan bereiken en de bacteriën af kan doden in cellen die zich buiten de bloedbaan in weefsel bevinden goed beantwoord kan worden.
- Verder wil de DEC weten of het gebruik van een wangprik kan leiden tot het verminderen van het aantal dieren omdat een dier dan vaker geprikt kan worden en gevolgd kan worden in de tijd.
Het is van belang om op orgaan / weefsel niveau te onderzoeken of er sprake is van bijwerkingen van het AAC medicijn. Aangezien het medicijn contact maakt met macrofagen die zich in weefsel bevinden kan dit leiden tot activatie van de cel. De betrokken cellen hebben hun natuurlijke functie in ontstekingsprocessen en activatie zou dus kunnen leiden tot een ontstekingsreactie in het orgaan. Dit zou een ongewenste bijwerking zijn. Door herhaalde bloedafname te introduceren zou de halfwaardetijd studie gesplitst worden van de bijwerkingen studie. Voor de bijwerkingen studie zouden dan apart nog muizen behandeld en opgeofferd moeten worden voor weefselonderzoek. Door de beide onderzoeken te combineren kunnen we juist minder muizen gebruiken. Het 5 x wekelijks achter elkaar via wangprik bloed afnemen veroorzaakt ook matig ongerief voor de muizen en vergt waarschijnlijk ook nog extra behandelingen en ongerief door de totale hoeveelheid afgenomen bloed per 2 weken dan mogelijk hoger uitkomt dan 10% van het circulerende volume op basis van 8 ml /kg lichaamsgewicht per 2 weken.
- Inherent aan het model is dat men enkel gebruik maakt van vrouwelijke dieren. Wanneer de onderzoeker goed kan onderbouwen dat dit model het meest geschikt is kan zij hiermee instemmen. De DEC wil echter wel weten of de resultaten verkregen bij vrouwelijke muizen in de toekomst te vertalen is naar mannelijke patiënten.
De keuze hiervoor wordt ingegeven doordat het Q koorts infectie model ontwikkeld en gevalideerd is met vrouwelijke muizen door een Frans zusterinstituut. Uit die studies blijkt dat de variatie tussen vrouwelijke dieren kleiner is dan bij mannelijke dieren en de infectie milder verloopt. Als wij op dit moment evenredig mannelijke en vrouwelijke muizen in zouden zetten zouden we eerst een voorstudie moeten doen om inzicht te krijgen in het verloop van de infectie bij mannelijke dieren en deze variant van het model valideren voordat de beoogde studies met de AAC kunnen plaats vinden. Als inderdaad blijkt dat er meer variatie is in het verloop van de infectie bij mannelijke dieren dan zal dit ook consequenties hebben voor de powerberekening en zal het uiteindelijk aantal dieren per groep in de effectiviteitsstudies toenemen. In totaal zal deze keuze dus zowel op kortere als waarschijnlijk ook op langere termijn leiden tot gebruik van meer dieren. Daarnaast is er geen essentieel verschil op basis van geslacht te verwachten voor wat betreft de uitkomsten rond de vraag of het AAC medicijn in staat is de bloedbaan te verlaten en cellen in weefsel te bereiken. Het toepassen van de onderzoeksvraag op zowel mannelijke als vrouwelijke muizen heeft in onze ogen dus geen toegevoegde waarde voor wat betreft mogelijkheden tot translatie.

De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

DATUM
9 mei 2017

ONS KENMERK
AVD401002017895

PAGINA
3 van 6

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. De DEC heeft vastgesteld dat het project vergunningplichtig is (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag is een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om over de aanvraag te adviseren vanuit het oogpunt van onafhankelijkheid, onpartijdigheid en beschikbare expertises.

C. Beoordeling (inhoud)

1. De DEC heeft vastgesteld dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.
2. De DEC heeft geen tegenstrijdige wetgeving, gericht op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort, gesignaleerd die het uitvoeren van de proef in de weg kan staan.
3. De DEC heeft vastgesteld dat de in de aanvraag aangekruiste doelcategorie in overeenstemming is met de hoofddoelstelling.

Belangen en waarden

4. Het directe doel is op te splitsen in 3 delen:
 - De ontwikkeling van een antilichaam-antibioticum conjugaat tegen Q-koorts (AAC-Cb) in muizen
 - Het testen van AAC tegen Q koorts op veiligheid en farmacokinetiek in muizen
 - Het testen van therapeutische effectiviteit van AAC in muizenHet uiteindelijke doel is het ontwikkelen van AAC voor een effectieve behandeling van chronische en acute Q-koorts bij mensen.
5. De belanghebbenden in het project en hun morele waarden zijn:
 - Proefdieren: aantasting van welzijn en integriteit
 - Patiënten: gezondheidsbelang
 - Onderzoeker/CRO: kennisvergaring en economisch belang
 - Maatschappij: gezondheidsbelang, het belang van het hebben van een effectief middel tegen Q-koorts, de algemene maatschappelijke bezorgdheid rond Q-koorts
 - De DEC merkt op dat er in deze fase van het project de farmaceutische industrie nog niet betrokken is bij het project
6. Voor zover de DEC dat kan inschatten is er geen sprake van substantiële milieueffecten.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De DEC heeft vastgesteld dat de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven, afgaande op de aanvullende toelichting die de onderzoeker heeft gegeven en het oordeel van de IvD, voldoende gewaarborgd zijn.
8. De DEC heeft, na aanvullende informatie van de onderzoeker beoordeeld te hebben, vastgesteld dat het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstelling. De gekozen strategie en experimentele aanpak kan in de ogen van de DEC 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.
10. De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen om bijlage III van richtlijn 2010/63/EU.
11. De DEC stelt vast dat een cumulatieve inschatting van ongerief als "matig" realistisch is ingeschat en geclassificeerd. De onderzoeker verwacht geen ongerief dat de classificatie matig overschrijdt. Wanneer dit door onvoorziene omstandigheden wel dreigt te gebeuren dan zorgen de HEP's ervoor dat het ongerief matig blijft. Ongerief in de experimenten zal bestaan uit: eenmalige ip-en-iv toediening
12. Naast ongerief is er geen sprake van aantasting van integriteit van het dier, anders dan voortvloeiend uit de proefhandelingen.
13. De DEC heeft, na beoordeling van de aanvullende informatie van de onderzoeker, vastgesteld dat de criteria voor humane eindpunten goed zijn

gedefinieerd en dat goed is ingeschat welk percentage van de dieren een humaan eindpunt zal bereiken.

3 V's

14. De DEC heeft vastgesteld dat de onderzoeker voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen alternatieven zijn om de doelstelling van het project te realiseren. De DEC heeft gediscussieerd of vervanging mogelijk zou zijn door microdosering in de mens te gebruiken voor het bepalen van de dynamiek. Zij komt echter tot de conclusie dat deze techniek nog in de kinderschoenen staat en niet geschikt is om in te zetten in dit project.
15. De DEC heeft, na beoordeling van de door de onderzoeker verstrekte aanvullende informatie vastgesteld dat de onderzoeker voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er optimaal tegemoet gekomen wordt aan de vereiste van vermindering van dierproeven.
16. De DEC heeft vastgesteld dat het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven. De onderzoeker heeft gekozen voor een model zonder klinische symptomen. Ook heeft de onderzoeker HEP's geformuleerd voor onvoorziene omstandigheden. De DEC ziet geen verdere mogelijkheden voor verfijning.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Inherent aan het model is dat men enkel gebruik maakt van vrouwelijke dieren. N.a.v. een vraag van de DEC heeft de onderzoeker goed onderbouwd dat dit model het meest geschikt is. De DEC kan hiermee instemmen.
19. De dieren worden gedood in het kader van het project. De dieren worden gedood volgens een passende methode die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU.

NTS

21. De NTS is naar het oordeel van de DEC een evenwichtige weergave van het project, begrijpelijk geformuleerd en voldoet aan de vereisten in de herziene Wod Art. 10.a.1.7.

D. Ethische afweging

1. De centrale morele vraag van het project is of onderzoek naar de veiligheid en werkzaamheid in muizen van een AAC tegen Q-koorts, opweegt tegen het naar verwachting lichte, maar maximaal matige, ongerief van 750 muizen.
2. In de afweging heeft de DEC geconstateerd dat het hier gaat om een aanvraag met voldoende samenhang.
Als het project zijn uiteindelijke doel behaalt dan acht de DEC de belangen voor de patiënten substantieel. Het gaat hierbij om de waarde van gezondheid: genezing van Q-koorts of de verlichting van de klachten. De DEC heeft in haar discussie meegenomen dat er twee groepen chronische Q-koorts patiënten te onderscheiden zijn: enerzijds de chronische Q-koorts waar 60% van de patiënten aan overlijdt en anderzijds de patiënten die chronische klachten houden na het doormaken van Q-koorts. Voor beide groepen kunnen resultaten van dit project relevant zijn. Gezien de maatschappelijke impact en onrust naar aanleiding van Q-koorts heeft de DEC ook de maatschappij als betrokkene in de afweging meegenomen. Het belang van de maatschappij, gerelateerd aan de waarden van volksgezondheid en een goede leefomgeving, ziet de DEC als een reëel belang. Gezien de samenwerking met de Nederlandse belangenorganisatie voor chronische Q-koorts patiënten en een ervaren universitair medisch centrum acht de DEC de kans dat het eindelijke doel ook gehaald kan worden als zeer reëel in. Zowel bij dit uiteindelijke doel als het directe doel hebben de onderzoekers een belang voor de onderzoeker. De DEC waardeert dat in dit project als een beperkt belang.
Tot slot zijn de waarden van de proefdieren in het geding. Het gaat om naar verwachting licht ongerief (en mogelijk matig ongerief indien de werkzaamheid van het vaccin niet voldoende blijkt te zijn). De integriteit van de proefdieren wordt in dit project niet sterker aangetast dan gebruikelijk bij het uitvoeren van een dierproef.
3. Op basis van bovenstaande overwegingen is de DEC van mening dat het ethisch verantwoord is om onderzoek te doen naar een therapie tegen Q-koorts met maximaal matig ongerief voor maximaal 750 dieren. De centrale morele vraag kan met "ja" beantwoord worden.

DATUM
9 mei 2017

ONS KENMERK
AVD401002017895

PAGINA
5 van 6

DATUM

9 mei 2017

ONS KENMERK

AVD401002017895

PAGINA

6 van 6

E. Advies

1. Advies aan de CCD:
 - De DEC adviseert de vergunning te verlenen.
2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.
3. Er zijn geen knelpunten/dilemma's zijn naar voren gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies.

Met vriendelijke groet



**Form
Project proposal**

- This form should be used to write the project proposal of animal procedures.
- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed
- For more information on the project proposal, see our website(www.zbo-ccd.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	40100
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Wageningen Research
1.3	Provide the title of the project.	Antilichaam-antibioticum conjugaat therapie tegen Q-koorts

2 Categories

2.1	Please tick each of the following boxes that applies to your project.	<input type="checkbox"/> Basic Research
		<input checked="" type="checkbox"/> Translational or applied research
		<input type="checkbox"/> Regulatory use of routine production
		<input type="checkbox"/> Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare dier
		<input type="checkbox"/> Research aimed at preserving the species subjected to procedures

Higher education or training

Forensic enquiries

Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

3 General description of the project

3.1 Background

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

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

De verwekker van Q-koorts, *C. burnetii* is een obligaat intracellulair pathogeen die zich met name verschuilt in macrofagen en macrofaag-achtige cellen in het lichaam. Blootstelling aan *Cb* kan leiden tot of acute of chronische infecties in mensen. Acute Q-koorts wordt in verband gebracht met lever en long-ontsteking. Chronische Q-koorts ontwikkelt zich over een periode van maanden tot jaren na de initiële infectie en wordt voornamelijk gekarakteriseerd door hartklepontsteking (endocarditis) of bloedvatontsteking (endovasculaire infectie). Hoewel slechts een klein percentage (2-5%) van de geïnfecteerde individuen chronische Q-koorts ontwikkelt, is de belasting van deze groep patiënten erg groot omdat langdurige behandeling met antibiotica nodig is om mortaliteit te voorkomen. Mortaliteit kan oplopen tot wel 60% wanneer chronische Q-koorts niet wordt behandeld. Naast de noodzaak van krachtigere antibiotica om acute Q-koorts te behandelen, zijn er vooral betere antibioticum behandelingen nodig voor chronische Q-koorts, één van de prioriteiten zoals vermeld in het rapport van de stichting Q-support.

De huidige antibiotica behandeling van Q-koorts patiënten die zijn geïnfecteerd met slechts één enkele pathogene bacterie – *C. burnetii* – toont vele overeenkomsten met chemotherapie ter behandeling van kanker: in beide gevallen wordt het hele lichaam bloot gesteld aan het medicijn, terwijl een relatief kleine populatie cellen (bacterie geïnfecteerde cellen/kanker cellen) het doel zijn. In het geval van kanker heeft de chemotherapie ernstige bijwerkingen voor de patiënt, in het geval van Q-koorts geeft de langdurige behandeling niet alleen bijwerkingen voor de patiënt, maar draagt het ook bij aan de problematische opkomst van antibiotica resistentie. Door continue blootstelling van de darmflora aan de antibiotica, ontstaan er antibiotica resistente bacteriën die bijdragen aan het als maar toenemende wereldwijde probleem van antibiotica resistentie. In beide gevallen zijn betere medicijnen, die specifiek de ziekte-veroorzakers aanpakken, wenselijk. Ons doel is om een eerste stap te zetten in de ontwikkeling van meer specifieke en krachtigere antibiotica ter behandeling van acute en vooral chronische Q-koorts.

Een aantal medicijnen die recentelijk zijn ontwikkeld ter behandeling van kanker hebben deze wenselijke eigenschappen. Antilichaam therapieën hebben de behandeling van kanker de laatste 20 jaar gerevolutioneerd. Deze antilichamen zijn ontwikkeld tot dragers van medicijnen om cytostatische medicijnen specifiek af te geven in tumoren. De antilichamen binden specifiek aan moleculen op de tumor cel en geven zo gericht de cytostatische medicijnen af waar ze werken moeten. Deze recent geïntroduceerde Antibody Drug Conjugates (ADC), Adcetris en Kadcyła, voor de

behandeling van respectievelijk Hodgkin lymphoma en HER2 positieve borstkanker zijn effectiever dan chemotherapie en hebben minder bijwerkingen. Recent is aangetoond dat conjugatie van antibiotica in plaats van cytostatische drugs aan antilichamen een veel belovende stap zou kunnen zijn voor de behandeling van multi-drug resistente Staphylococcus aureus (de ziekenhuis bacterie MRSA). (Lehar 2015) Door zijn obligate intracellulaire levensstijl is Cb een perfecte kandidaat voor een Antilichaam Antibiotica Conjugaten (AAC). Omdat het intracellulaire volume beperkt is, bereikt een relatief kleine hoeveelheid doelgerichte antibiotica snel voldoende concentratie in de cel om het pathogeen te elimineren. AAC kunnen krachtigere antibiotica naar de plaats van infectie brengen, om zowel op effectievere wijze de Q-koorts bacterie C. burnetii te elimineren als de ontwikkeling en verspreiding van antibioticum resistentie in de darmflora van de patiënt te voorkomen. De lange half-waarde tijd van antilichamen (30 dagen) in vergelijking met antibiotica (gemiddeld 3 uur) kan mogelijk leiden tot een verminderde doseringsfrequentie. Effectievere behandeling kan ook tot een kortere behandelingsduur van de Q-koorts patiënt leiden.

Lehar SM, Pillow T, Xu M, Staben L, Kajihara KK, Vandlen R, DePalatis L, Raab H, Hazenbos WL, Morisaki JH, Kim J, Park S, Darwish M, Lee BC, Hernandez H, Loyet KM, Lupardus P, Fong R, Yan D, Chalouni C, Luis E, Khalfin Y, Plise E, Cheong J, Lyssikatos JP, Strandh M, Koefoed K, Andersen PS, Flygare JA, Wah Tan M, Brown EJ, Mariathasan S. Novel antibody-antibiotic conjugate eliminates intracellular S. aureus. Nature. 2015 Nov 19;527(7578):323-8. doi: 10.1038/nature16057.

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?

Dit onderzoeksvoorstel heeft één algemeen doel: Het ontwikkelen van Antilichaam Antibiotica Conjugaten (AAC) voor een effectieve behandeling van Q-koorts. Dit onderzoeksvoorstel hoort bij een project wat loopt bij een universitair research laboratorium waar de AAC ontwikkeld worden. Dit project is gehonoreerd door de Nederlandse belangen organisatie voor chronische Q-koorts patiënten. Deze organisatie is in hoge mate gericht op het subsidiëren van projecten die op kortere of langere termijn een bijdrage kunnen leveren aan de betere behandeling van chronische Q koorts patiënten en er is nauwlettend toezicht op dit project en de mogelijkheden tot translatie. Daarnaast heeft de onderzoeksgroep op basis van onderzoek tijdens de Q-koorts uitbraak in Nederland nauwe contacten met onder andere het universitair medisch centrum wat de zorg voor chronische Q-koorts patiënten uitvoert en coördineert. In de eerste fase van het project ligt de focus op het identificeren van het juiste antigeen en in vitro validatie. De geselecteerde AAC moeten veilig en effectief zijn tegen Cb in vivo. In de tweede fase van het project zullen deze resultaten daarom in vivo getest worden door het toepassen van de in vitro geteste AAC in het Q-koorts infectie muizen model. Door combinatie van bestaande expertise met betrekking tot de ontwikkeling van AAC, in vitro effectiviteit en kennis van en ervaring met het Q-koorts infectie model in muizen wordt de haalbaarheid van het project hoog geacht.

3.3 Relevance

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

Wetenschappelijk belang: ontwikkeling van AAC als mogelijke therapie tegen intra-cellulaire bacteriële infecties is een nieuwe ontwikkeling waarmee

antibiotica effectiever ingezet kunnen worden met minder bijwerkingen door lagere doseringen en doseringsfrequentie; en minder risico op resistentie ontwikkeling.

Voor dit specifieke in ontwikkeling zijnde medicijn is deze dierproefstudie de eerste stap van in vitro naar in vivo. Dit is een essentiële stap omdat in een in vitro systeem het medicijn en de cellen direct met elkaar in contact kunnen komen. In een dergelijk systeem werkt het medicijn in zowel dierlijke als humane cellen. In een in vivo situatie wordt het medicijn in de bloedbaan ingebracht en moet vervolgens de bloedbaan verlaten om bij de relevante cellen te komen die niet vrij in de bloedbaan bewegen maar in orgaanweefsel zitten. De huidige aanvraag is er dus op gericht om die vraag te beantwoorden en de muis is een goed model hiervoor omdat het mechanisme van verdeling van de AAC in de bloedbaan en de weefsel grote overeenkomsten vertoont met het mechanisme in de mens. Als de AAC inderdaad in de doelcellen in het weefsel aankomt en werkt tegen de bacterie zonder dat bijwerkingen optreden dan is dat een belangrijke set aan data die gebruikt kunnen worden in aanvragen die de opdrachtgever wil doen om toestemming te krijgen om het medicijn te gaan testen in 'clinical trials' met mensen. Varianten van deze combinatie medicijnen (een werkzame stof gekoppeld aan een antilichaammolecuul) zijn succesvol getest in muizenmodellen om vervolgens in te stromen in humane 'clinical trials' en de eerste varianten hiervan zijn recent op de markt gekomen. Maatschappelijk belang: Chronische Q-koorts is erg belastend voor patiënten omdat nu langdurige behandeling met antibiotica nodig is om mortaliteit te voorkomen. Mortaliteit kan oplopen tot wel 60% wanneer chronische Q-koorts niet wordt behandeld. Naast de noodzaak van krachtigere antibiotica om acute Q-koorts te behandelen, zijn er vooral betere antibioticum behandelingen nodig voor chronische Q-koorts, één van de prioriteiten zoals vermeld in het rapport van de stichting Q-support. Antibiotica Antilichaam Conjugaten (AAC) kunnen krachtigere antibiotica naar de plaats van infectie brengen, om zowel op effectievere wijze de Q-koorts bacterie *C. burnetii* te elimineren als de ontwikkeling en verspreiding van antibioticum resistentie in de darmflora van de patiënt te voorkomen. Mogelijk kunnen AAC ook leiden tot een verminderde doseringsfrequentie, en tot een kortere behandelingsduur van de Q-koorts patiënt.

3.4 Research Strategy

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

De eisen voor de ontwikkeling van Antibiotica Antilichaam Conjugaten die effectief antibiotica leveren op de plaats van infectie met *C. burnetii* viervoudig: het molecuul wat herkent wordt door het antilichaam moet op de (macrofaag)cellen voorkomen waar de bacterie zich in vermenigvuldigt, en dat molecuul moet in voldoende mate op de celmembraan aanwezig zijn om genoeg antibiotica af te leveren om *C. burnetii* effectief te doden. Het antilichaam moet specifiek en sterk binden aan het molecuul op de cel om correcte lokalisatie en afgifte van de antibiotica waarborgen. De koppeling die het antilichaam met het antibioticum verbindt moet zorgen voor afgifte van het antibiotica in de nabijheid van het pathogeen, maar tegelijkertijd moet het bescherming bieden tegen ongewenste afgifte in het plasma. Het antibioticum zelf moet voldoende sterk zijn om *C. burnetii* in lage concentraties te doden en actief zijn in een het relatief zure milieu van het fagosoom waar *C. burnetii* verblijft.

Fase 1 van het project is de ontwikkeling van AAC. Dit gedeelte van het project wordt uitgevoerd met behulp van chemische testen en in vitro cel systemen. AAC die in de in vitro systemen aan de bovenstaande eisen voldoen komen in aanmerking voor in vivo testen.

Fase 2 betreft het in vivo testen van geselecteerde AAC zoals beschreven in deze aanvraag.

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.

De in vivo testen richten zich op 2 hoofdonderdelen:

- (1) veiligheid en farmacokinetiek van de AAC: bepalen van een veilige en effectieve dosis en de halfwaardetijd van de AAC in vivo in de muis
- (2) therapeutische effectiviteit in het muis Q-koorts infectiemodel

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

Aan de hand van de in vitro resultaten is een inschatting gemaakt worden van welke dosis in vivo gebruikt moeten worden. Op basis hiervan moet in muizen bepaald worden of de berekende doses veilig zijn of leiden tot bijwerkingen.

In de veiligheidsstudie wordt voor elk te testen conjugaat eerst het antilichaam zonder antibioticum conjugaat getest worden. Als het antilichaam (zonder gekoppeld antibioticum) bijwerkingen laat zien ((acute) klinische verschijnselen en/of lokale ontstekingsverschijnselen in organen op basis van histopathologische analyse) dan zal dit antilichaam en de bijbehorende AAC niet verder getest worden. (Go / No Go)

Van de veilige antilichamen moet bepaald worden wat de halfwaardetijd van de AAC in vivo is in de muis zodat de dosis en het behandelingschema bepaald kunnen worden. Ook hier wordt naast farmacokinetische kenmerken ook de veiligheid van het AAC geëvalueerd. (Go / No Go)

Als de beoogde dosis veilig is voor de muis en zonder bijwerkingen gebruikt kan worden moet de effectiviteit van de AAC bepaald worden. Voor dit doel worden met muizen geïnfecteerd met Cb en vervolgens behandeld met AAC. In deze muizen wordt de effectiviteit van de behandeling bepaald aan de hand van de hoeveelheid Cb die in de milt van de muis aangetoond wordt na sectie.

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	Veiligheid en farmacokinetiek van AAC
2	Therapeutische effectiviteit van AAC

Appendix
Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	40100	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	WR	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 1	Type of animal procedure Veiligheid en farmacokinetiek van AAC

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.

Om te bepalen of het antilichaam-antibioticum conjugaat (AAC) veilig in vivo kan worden toegepast in hoeveelheden die nodig zijn om therapeutische effectiviteit te bereiken moeten veiligheids- en farmacokinetiek studies verricht worden. Iedere AAC bestaat uit een combinatie van een specifiek antilichaam en een antibioticum. Het antilichaam is in staat om aan macrofagen en andere relevante myeloïde cellen te binden waar *Coxiella burnetii* (Cb) zich in kan ophouden en zorgt er dus voor dat het antibioticum op de juiste plaats in het lichaam wordt afgeleverd. Na binding van het antilichaam wordt de AAC in zijn geheel opgenomen door de fagocyterende cel. In de cel vindt een enzymatische splitsing plaats waardoor het antibioticum los komt van de AAC en de bacterie in de cel kan doden. Door de koppeling van de 2 actieve stoffen (antilichaam en antibioticum) is het mogelijk dat de farmacokinetiek (zoals de halfwaardetijd en de klaring) anders is dan van de afzonderlijke stoffen. Dit geldt ook voor mogelijke bijwerkingen. Om deze aspecten te kwantificeren en evalueren worden dieren behandeld met verschillende doses van de ontwikkelde AAC.

Voor de veiligheids- en farmacokinetische studie is de primaire uitleesparameter de hoeveelheid AAC die in het bloed gemeten kan worden. Tussen het begin en het eind tijdstip moet een reductie van 82.5% met een power van 80% en een betrouwbaarheid van 95% gemeten worden. Op basis van de testeigenschappen levert dit een groepsgrootte per tijdstip op van 3 dieren. Op basis van gepubliceerde data voor de bepaling van antilichaam halfwaardetijd in muizen is een meetreeks van 5 tijdstippen noodzakelijk. Op 5 tijdstippen in een periode tot maximaal 28 dagen na toediening van de AAC worden 3 dieren per tijdstip geëuthanaseerd. Serum van deze muizen wordt gebruikt om de farmacokinetiek van de AAC te bepalen en diverse weefsels van deze dieren wordt geanalyseerd door middel van macroscopisch en histopathologisch onderzoek om, naast klinische observatie, bijwerkingen vast te kunnen stellen.

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

Na 7 dagen acclimatisatie worden per te testen AAC 3 groepen vrouwelijke muizen van 6-8 weken leeftijd intraveneus geïnjecteerd met antilichaam of antilichaam-antibioticum conjugaat. Het antilichaam-antibioticum conjugaat wordt in 2 doses getest. Deze doses worden bepaald aan de hand van de berekende dosis op basis van gegevens van in vitro studies met cel systemen en een dosis die 10 maal hoger is. Het vrije antilichaam wordt in de hoge doses getest. Op 5 tijdstippen in een periode tot maximaal 28 dagen na toediening van de AAC worden 3 dieren per tijdstip geëuthanaseerd. Serum van deze muizen wordt gebruikt om de farmacokinetiek van de AAC te bepalen en diverse weefsels van deze dieren wordt geanalyseerd door middel van macroscopisch en histopathologisch onderzoek om, naast klinische observatie, bijwerkingen vast te kunnen stellen van zowel het vrije antilichaam als het antilichaam-antibioticum conjugaat.

Er is gekozen voor deze werkwijze omdat hiermee voorkomen wordt dat er bij de muizen herhaaldelijk (5 x in 28 dagen) voldoende bloed afgenomen moet worden voor de AAC bepalingen. Bij euthanasie kan ruim voldoende serum afgenomen worden en heeft deze methode als voordeel dat direct op weefselniveau eventuele bijwerkingen vastgesteld kunnen worden van zowel het vrije antilichaam als het antilichaam-antibioticum conjugaat. Aangezien de AAC methode zich specifiek richt op macrofagen en andere myeloïde cellen die met name in diverse weefsels voorkomen (en niet in circulatie) geniet deze benadering de voorkeur.

Eerst wordt bepaald of het antilichaam alleen een effect heeft, daarna de AAC. Om onnodig ongerief te voorkomen worden eerst de muizen behandeld voor het eind tijdstip (4 weken follow-up). Als in de eerste week na toediening geen klinische verschijnselen worden waargenomen wordt de eerstvolgende groep (3 weken follow-up) behandeld. Zo ook voor de groepen 2 weken follow-up, 1 week follow-up en 1 dag follow-up. Eén dag na de laatste toediening worden alle muizen geëuthanaseerd. Serum wordt gebruikt om de AAC halfwaardetijd te bepalen en de organen worden gebruikt om op weefselniveau steriele ontstekingsverschijnselen te analyseren.

Indien in de eerste week na toediening van het antilichaam alleen of de AAC een HEP toegepast moet worden, worden de volgende behandelingen niet gestart maar wordt eerst onderzocht of de HEP een gevolg is van de behandeling. Indien dit het geval is wordt de AAC niet verder onderzocht in de dierproef. (No Go)

Indien geen bijwerkingen optreden worden per antilichaam en AAC dosis 15 muizen gebruikt voor de veiligheids- en farmacokinetische studie (i.c. per dosis 3 muizen per groep x 5 tijdstippen).

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

Er is gekozen voor sequentieel opofferen van 3 dieren per tijdstip op 5 tijdstippen in een periode tot maximaal 28 dagen na toediening van de AAC op basis van bovenstaande redenering, statistische methoden en uitkomst gegevens in de literatuur over farmacokinetische studies van antilichamen in muizen (Tam 2013).

Voor de veiligheids- en farmacokinetische studie is de primaire uitleesparameter de hoeveelheid AAC die in het bloed gemeten kan worden. Tussen het begin en het eind tijdstip moet een reductie van 82.5% met een power van 80% en een betrouwbaarheid van 95% gemeten worden. Op basis van de testeigenschappen levert dit een groepsgrootte per tijdstip op van 3 dieren. Op basis van gepubliceerde data voor de bepaling van antilichaam halfwaardetijd in muizen is een meet reeks van 5 tijd punten noodzakelijk.

Tam SH, McCarthy SG, Brosnan K, Goldberg KM, Scallon BJ. Correlations between pharmacokinetics of IgG antibodies in primates vs. FcRn-transgenic mice reveal a rodent model with predictive capabilities. *MABs*. 2013 May-Jun;5(3):397-405. doi: 10.4161/mabs.23836.

B. The animals

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

De studies worden uitgevoerd met 6-8 weken oude vrouwelijke muizen (Specific Pathogen Free female Swiss OF1 stam) van erkend fokbedrijf. Dit is de muizenstam, geslacht en leeftijd zoals die ook gebruikt wordt voor de Cb challenge en effectiviteitsstudies. Het gebruik van hetzelfde model met vrouwelijke dieren is belangrijk om de resultaten zo relevant mogelijk te maken voor de vervolg studie (zie bijlage 2). Het opnieuw valideren van het muizen Cb infectie model is noodzakelijk als in dit stadium zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt gaan worden. Dit leidt tot een toename in aantal muizen. Aangezien de translocatie van antilichamen van bloed naar weefsel geen geslachtsgebonden kenmerk is is er geen noodzaak om deze aanpassing in het model te maken.

Voor 1 farmacokinetiek experiment worden maximaal 3 muizen per tijdstip op maximaal 5 tijdstippen gebruikt: 15 muizen (hiermee kan een tijdcurve gemaakt worden waaruit halfwaarde tijd berekend kan worden)

Voor elk te testen conjugaat zal eerst een proef met het antilichaam zonder antibioticum conjugaat uitgevoerd worden. Als het antilichaam zonder antibioticum bijwerkingen laat zien ((acute) klinische verschijnselen en/of lokale ontstekingsverschijnselen in organen op basis van histopathologische analyse dan zal dit antilichaam en de bijbehorende AAC niet verder getest worden. (No Go)

Voor elk AAC zijn 2 experimenten nodig om verschillende doses te testen voor kinetiek en mogelijke bijwerkingen (veiligheid).

In totaal zullen maximaal 5 AAC worden ontwikkeld die gericht zijn tegen verschillende moleculen die op de oppervlakte van macrofagen aanwezig zijn. Aan deze antilichamen wordt een antibioticum gekoppeld dat werkzaam is tegen Cb (bijvoorbeeld rifamycine of derivaten daarvan).

Dat betekent dat maximaal $(15) \times (3) \times (5) = 225$ muizen gebruikt zullen worden.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
muis	licht	218	
muis	matig	7	

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.

Vervanging: farmacokinetiek en veiligheid kan alleen uitgevoerd worden in het levende dier. Te testen AAC kandidaten gaat door een uitgebreide in vitro voorscreening zodat alleen AAC kandidaten die specifiek de beoogde doelcellen herkennen en op de juiste wijze het antibioticum in de cel afgeven ook daadwerkelijk in dieren getest worden. Vermindering: in de methode gebruikt door Tam et al worden steeds 4 of 5 dieren per tijdstip bemonsterd. Echter de waargenomen spreiding in die data is zo beperkt dat wij in deze proef het aantal dieren per tijdstip terug gebracht hebben tot 3 dieren, hetgeen voldoende moet zijn voor een betrouwbaar resultaat. Door de volgorde van de proeven zo te kiezen dat bijwerkingen vroeg opgemerkt kunnen worden als een beperkt deel van de dieren gestart zijn met de behandeling kan het aantal dieren wat ingezet wordt bij een antilichaam of AAC met bijwerkingen sterk beperkt worden. Verfijning: wij kiezen ervoor om voor de farmacokinetiek niet herhaalde bloedafname uit te voeren bij de muizen als methode om serum te verzamelen maar onderzoek naar bijwerkingen op weefsel niveau te combineren met de farmacokinetiek studie. Hierbij worden dieren per tijdstip geëuthanaseerd. Het ongerief voor de dieren is hierdoor minder, er kan meer serum afgenomen worden wat de betrouwbaarheid van de AAC bepalingstesten ten goede komt en er kan nauwkeurig onderzoek gedaan worden naar bijwerkingen in relevante weefsels.

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

wij kiezen ervoor om voor de farmacokinetiek niet herhaalde retro-orbitale punctie uit te voeren bij de muizen als methode om serum te verzamelen maar onderzoek naar bijwerkingen op weefsel niveau te combineren met de farmacokinetiek studie. Hierbij worden dieren per tijdstip geëuthanaseerd. Het ongerief voor de dieren is hierdoor minder, er kan meer serum afgenomen worden wat de betrouwbaarheid van de AAC bepalingstesten ten goede komt en er kan nauwkeurig onderzoek gedaan worden naar bijwerkingen in relevante weefsels. Dieren worden gehouden in groepen en kooiverrijking wordt toegepast.

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.

De AAC tegen Cb die ontwikkeld worden zijn voor zover ons bekend uniek en niet eerder beschreven

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.

H. Pain and pain relief

De intraveneuze injectie met het antilichaam of de AAC zal vanwege het doorsteken van de huid een korte lichte pijnprikkel geven maar het ongerief door het toepassen van een pijnbestrijdingsmethode weegt niet op tegen het te verwachten effect hiervan.

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

stress door hantering, bijwerking van het antilichaam of de AAC

Explain why these effects may emerge.

oppakken en behandelen van dieren is stressvol; de antilichaam component van het antilichaam of de AAC is gericht tegen moleculen op de oppervlakte van macrofagen en myeloïde cellen. Deze cellen kunnen ontstekingsverschijnselen veroorzaken als ze in weefsel geactiveerd worden. Bij in vivo toepassing van de AAC zou dit in de context van weefsel ontsteking tot gevolg kunnen hebben ook al is dit stimulerende effect in vitro bij cellijnen niet waargenomen.

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

het aantal handelingen per dier is door de gekozen opzet tot een minimum beperkt; door middel van in vitro vooronderzoek worden AAC ontwikkeld waarvan het onwaarschijnlijk is dat deze tot bijwerkingen zullen leiden; als bijwerkingen zoals ontsteking waargenomen worden is dit een no go voor verdere testen van het betreffende AAC.

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.

Het dagelijkse klinische scoresysteem ziet er als volgt uit: 0 = normale muis; 1 = ruwe vacht, maar net zo actief tijdens handelingen als normale muis; 2 = ruwe vacht, (evt. bol/opgerold), minder actief tijdens handelingen; 3 = ruwe vacht, (bol/opgerold), moeilijkere (versnelde, buik-) ademhaling, minder actief tijdens handelingen; de dieren met een score 3 worden twee maal daags gescoord, dieren die in een periode van 24 uur op drie opeenvolgende waarnemingen een score 3 hebben worden geëuthanaseerd (HEP) 4 = ruwe vacht, (evt. bol/opgerold), moeilijkere (versnelde, buik-) ademhaling, geringe reactie als de muis wordt opgepakt of gemanipuleerd. Bij score 4 wordt de muis geëuthanaseerd (HEP) 5 = dood gevonden. HEP: het humaan eindpunt wordt gedefinieerd als 1x een score 4 of in een periode van 24 uur op drie opeenvolgende waarnemingen een score 3. Muizen waar HEP op van toepassing is worden geëuthanaseerd en door middel van histopathologisch onderzoek geëvalueerd.

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).

injectie met AAC: licht ongerief euthanasie: licht ongerief cumulatief ongerief indien geen bijwerking optreedt (>98% van de dieren): licht ongerief
Ongerief op basis van 1-malige intraveneuze injectie en euthanasie wordt ingeschat als licht. Indien bijwerkingen optreden die leiden tot toepassing van een HEP dan wordt het ongerief matig. Op basis van in vitro voorstudies wordt het risico op bijwerkingen als laag ingeschat omdat bij in vitro studies de antilichamen de cellen niet activeren (

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

Om te bepalen of de toepassing van de antilichamen of AAC leidt tot ontstekingsverschijnselen in weefsels is het doden van het dier essentieel.

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

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

Yes

Appendix
Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	40100	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	WR	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 2	Type of animal procedure Therapeutische effectiviteit van AAC

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.

Om te bepalen of het antibioticum-antilichaam conjugaat (AAC) in vivo kan worden toegepast om therapeutische effectiviteit tegen *Coxiella burnetii* (Cb) te bereiken moeten therapeutische effectiviteits studies verricht worden. Iedere AAC bestaat uit een combinatie van een specifiek antilichaam en een antibioticum. Het antilichaam is in staat om aan macrofagen en andere relevante myeloïde cellen te binden waar *Coxiella burnetii* (Cb) zich in kan ophouden en zorgt er dus voor dat het antibioticum op de juiste plaats in het lichaam wordt afgeleverd. Na binding van het antilichaam wordt de AAC in zijn geheel opgenomen door de fagocyterende cel. In de cel vind een enzymatische splitsing plaats waardoor het antibioticum los komt van de AAC en de bacterie in de cel kan doden. Om de therapeutische effectiviteit te kwantificeren en evalueren worden dieren behandeld met de ontwikkelde AAC in de eerder bepaalde veilige optimale dosis. Hiervoor wordt een challenge model gebruikt waarbij muizen geïnfecteerd worden met Cb voor therapeutische behandeling met een AAC. Het challenge model dat in eerdere studies gebruikt is. Dit betreft een kort durend infectie model in muizen met een looptijd van 7 dagen waarbij muizen geen klinisch waarneembare symptomen hebben. Virulentie van Cb en ernst van infectie worden in dit model bepaald aan de hand van het gewicht van de muis, de milt van de muis en de Cb load in de milt.

Voor de effectiviteitsstudie is de primaire uitleesparameter de log₂ van de met qPCR bepaalde gemiddelde bacteriële 'genome copy number' per gram milt zoals eerder beschreven door Kuley et al. 2015. Om op basis van gepubliceerde eigenschappen van het infectiemodel een daling van ten minste 40% in de gemiddelde bacteriële 'genome copy number' per gram milt te kunnen meten (met een power van 80% en een betrouwbaarheid van 95%) als relevante maat voor effectiviteit van de AAC is een groepsgrootte 10 dieren per behandeling noodzakelijk.

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

Therapeutische effectiviteit: Na 7 dagen acclimatisatie worden vrouwelijke muizen van 6-8 weken leeftijd geïnfecteerd met ca 10⁵ genome copies Cb in max 0,2 ml volume via een intraperitoneale injectie. Op 18-24 uur na infectie worden de muizen intraveneus geïnjecteerd met de vooraf bepaalde dosis AAC in max. 0.2 ml volume (bijlage 1). Afhankelijk van de farmacokinetiek zoals bepaald in bijlage 1 wordt de behandeling met AAC in de periode van 2-6 dagen na infectie maximaal 2 maal herhaald. Controle groepen (3) krijgen een intraveneuze behandeling met fysiologische zoutoplossing (1), antilichaam zonder antibioticum (2) en vrij antibioticum (3). Zeven dagen na infectie worden de muizen geëuthanaseerd. De muizen worden gewogen, de milt wordt verwijderd en gewogen en de load van Cb in de milt wordt bepaald als maat voor effectiviteit van de AAC.

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

Er is gekozen voor een eindpunt studie op basis van bovenstaande redenering en statistische methoden en uitkomst gegevens in de literatuur over therapeutisch effect van AAC tegen *Staphylococcus aureus* infectie in een vergelijkbaar muizen model (Lehar 2015) en het infectiemodel van Cb in Swiss OF1 muizen [REDACTED]

Voor de effectiviteitsstudie is de primaire uitleesparameter de log₂ van de met qPCR bepaalde gemiddelde bacteriële 'genome copy number' per gram milt zoals eerder beschreven door Kuley et al. 2015. Om op basis van gepubliceerde eigenschappen van het infectiemodel een daling van ten minste 40% in de gemiddelde bacteriële 'genome copy number' per gram milt te kunnen meten (met een power van 80% en een betrouwbaarheid van 95%) als relevante maat voor effectiviteit van de AAC is een groepsgrootte 10 dieren per behandeling noodzakelijk.

Lehar SM, Pillow T, Xu M, Staben L, Kajihara KK, Vandlen R, DePalatis L, Raab H, Hazenbos WL, Morisaki JH, Kim J, Park S, Darwish M, Lee BC, Hernandez H, Loyet KM, Lupardus P, Fong R, Yan D, Chalouni C, Luis E, Khalfin Y, Plise E, Cheong J, Lyssikatos JP, Strandh M, Koefoed K, Andersen PS, Flygare JA, Wah Tan M, Brown EJ, Mariathasan S. Novel antibody-antibiotic conjugate eliminates intracellular *S. aureus*. *Nature*. 2015 Nov 19;527(7578):323-8. doi: 10.1038/nature16057.

B. The animals

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

De studies worden uitgevoerd met 6-8 weken oude vrouwelijke muizen (Specific Pathogen Free female Swiss OF1 stam) van erkend fokbedrijf. Dit is de muizenstam, geslacht en leeftijd zoals die ook gebruikt wordt voor eerder beschreven Cb challenge model en de voorafgaande farmacokinetiek studie (zie bijlage 1). Het gebruik van hetzelfde model is belangrijk om de resultaten zo betrouwbaar mogelijk te maken en vergelijkbaar met eerder onderzoek voor wat betreft het Cb challenge model.

Voor 1 effectiviteitsexperiment worden maximaal 10 muizen per challenge groep gebruikt en 4 groepen: controle (behandeld met fysiologisch zout oplossing); alleen 1 malig antilichaam; alleen 1 malig antibioticum en 1 malig AAC. = totaal 40 dieren

De effectiviteit van de AAC wordt getest tegen de referentiestam NineMile, en 2 gekarakteriseerde veldisolaten (geit en rund). De geitenstam die getest wordt betreft de stam van de Nederlandse Q-koorts uitbraak en is dus zeer relevant voor de verdere translatie van de AAC naar een medicijn voor de chronische Q koorts patienten.

In totaal zullen maximaal 5 AAC worden ontwikkeld die gericht zijn tegen verschillende moleculen die op de oppervlakte van macrofagen aanwezig zijn. Aan deze antilichamen wordt een antibioticum gekoppeld dat werkzaam is tegen Cb (bijvoorbeeld rifamycine of derivaten daarvan).

Dat betekent dat maximaal $(40) \cdot (3) \cdot (5) = 600$ muizen gebruikt zullen worden.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
muis	matig	600	

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.

Vervanging: effectiviteit kan alleen uitgevoerd worden in het levende dier. Te testen AAC kandidaten gaat door een uitgebreide in vitro voorscreening en een in vivo veiligheidsstudie (zie bijlage 1) zodat alleen AAC kandidaten die zonder bijwerkingen specifiek de beoogde doelcellen herkennen en op de juiste wijze het antibioticum in de cel afgeven en Cb afdoden ook daadwerkelijk in Cb geïnfecteerde dieren getest worden Vermindering: op basis van behaalde resultaten in technisch vergelijkbare studies wordt het minimaal aantal dieren gebruikt waarbij een betrouwbaar resultaat te behalen is. Verfijning: het gekozen muizen model leidt niet tot klinische symptomen bij de muizen in tegenstelling tot andere Cb infectiemodellen terwijl op basis van milt gewicht en Cb load in de milt een goede indicatie van effectiviteit gemeten kan worden.

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

Het gekozen muizen model leidt niet tot klinische symptomen bij de muizen in tegenstelling tot andere Cb infectiemodellen terwijl op basis van milt gewicht en Cb load in de milt een goede indicatie van effectiviteit gemeten kan worden. Dieren worden gehouden in groepen en kooiverrijking wordt toegepast.

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.

De AAC tegen Cb die ontwikkeld worden zijn voor zover ons bekend uniek en niet eerder beschreven

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.

De ip injectie met het infectie inoculum en de iv injectie met de AAC zal vanwege het doorsteken van de huid een korte lichte pijnprikkel geven maar het ongerief door het toepassen van een pijnbestrijdingsmethode weegt niet op tegen het te verwachten effect hiervan.

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

stress door hantering, infectie met Cb

Explain why these effects may emerge.

oppakken en behandelen van dieren is stressvol; intra peritoneale injectie met virulente Cb kan mogelijk in uitzonderlijke gevallen tot ontsteking van de buikholte leiden

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

het aantal handelingen per dier is door de gekozen methode tot een minimum beperkt, er wordt een muizen model gebruikt waar het ontstaan van klinische symptomen uitzonderlijk is, door toepassing van humane eindpunten wordt ernstig ongerief voorkomen

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.

Het dagelijkse klinische scoresysteem ziet er als volgt uit: 0 = normale muis; 1 = ruwe vacht, maar net zo actief tijdens handelingen als normale muis; 2 = ruwe vacht, (evt. bol/opgerold), minderactief tijdens handelingen; 3 = ruwe vacht, (bol/opgerold), moeilijkere (versnelde, buik-) ademhaling, minder actief tijdens handelingen; de dieren met een score 3 worden twee maal daags gescoord, dieren die in een periode van 24 uur op drie opeenvolgende waarnemingen een score 3 hebben worden geëuthanaseerd (HEP) 4 = ruwe vacht, (evt. bol/opgerold), moeilijkere (versnelde, buik-) ademhaling, geringe reactie als de muis wordt opgepakt of gemanipuleerd. Bij score 4 wordt de muis geëuthanaseerd (HEP) 5 = dood gevonden. HEP: het humaan eindpunt wordt gedefinieerd als 1x een score 4 of in een periode van 24 uur op drie opeenvolgende waarnemingen een score 3.

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).

Het ongerief is gelijk voor alle dieren: injectie met fysiologisch zout, antilichaam, antibioticum of AAC: licht ongerief injectie met Cb: licht ongerief infectie met Cb: licht ongerief euthanasie: licht ongerief Het cumulatief ongerief van de diverse handelingen in het beperkte tijdspad van 7 dagen wordt ingeschat als matig ongerief

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

Om te bepalen of de toepassing van de AAC leidt tot therapeutisch effectieve afdoding van Cb in weefsels is het doden van het dier essentieel.

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

Van: DEC WUR <dec@wur.nl>
Verzonden: maandag 29 mei 2017 9:42
Aan: 'info@zbo-ccd.nl'
Onderwerp: RE: Verzoek aanvullende informatie projectvergunningsaanvraag AVD401002017895

Categorieën: Dossier: [REDACTED]

Beste [REDACTED]

Dit aantal komt door de verwarring die er geweest is in het DEC-traject over het aantal dieren. Onderstaand een citaat uit een mail van de onderzoeker aan de DEC:

“In de bijlagen een word document met de antwoorden op onderstaande vragen en de pdf van de aangepaste aanvraag. Na de beoordeling door de IvD is het totaal aantal dieren naar beneden bijgesteld in verband met een vermeende telfout. Tijdens het aanpassen van de aanvraag nav de vragen van de DEC kwam ik er echter achter dat dit niet terecht was en heb dit bijgesteld naar het originele aantal. Dit laatste ter toelichting waarom het aantal dieren in de aanvraag gewijzigd is. “

In het DEC-advies heb ik per abuis het verkeerde aantal opgenomen. De DEC heeft de aangepaste versie met het juiste aantal dieren beoordeeld en daarop haar ethische afweging gebaseerd

Met vriendelijke groeten,

[REDACTED]

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

[REDACTED]

Dit bericht is uitsluitend bestemd voor geadresseerde. Het bericht kan vertrouwelijke informatie bevatten. Gebruik door derden of openbaarmaking van dit bericht zonder toestemming van de [REDACTED] is niet toegestaan. Als u dit bericht per abuis heeft ontvangen, wordt u verzocht het te vernietigen en ons te informeren.

From: info@zbo-ccd.nl [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]

Sent: woensdag 24 mei 2017 17:37

To: DEC WUR

Subject: Verzoek aanvullende informatie projectvergunningsaanvraag AVD401002017895

Geachte DEC-WUR,

Op 10-03-2017 hebben wij een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het gaat om het project 'Antilichaam-antibioticum conjugaat therapie tegen Q-koorts' met aanvraagnummer AVD401002017895.

In uw ethische afweging (D1) geeft u aan dat er sprake is van 750 muizen. In de aanvraag die wij hebben ontvangen, gaat het echter om 825 dieren. Kunt u aangeven of uw ethische afweging gelijk is met meer dieren?

Kunt u hier voor 1 juni 2017 antwoord op geven?

Mocht u vragen hebben, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,


Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl

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

.....
T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Wageningen Research

Postbus 59

6700 AB WAGENINGEN



**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
AVD401002017895

Datum 24 mei 2017
Betreft aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED],

Op 10 maart 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Antilichaam-antibioticum conjugaat therapie tegen Q-koorts" met aanvraagnummer AVD401002017895. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

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

Onduidelijkheden

Kunt u voor beide Bijlage Dierproeven aangeven wat de kans is dat dieren de criteria van humane eindpunten halen? Kunt u dit verwerken in een nieuwe Bijlage Dierproeven?

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

Opsturen binnen veertien dagen

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

Wanneer een beslissing

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Datum:

24 mei 2017

Aanvraagnummer:

AVD401002017895

Appendix

Description animal procedures

14.

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

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority' 40100

1.2 Provide the name of the licenced establishment. Stichting Wageningen Research

1.3 List the different types of animal procedures.
Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.

Serial number	Type of animal procedure
1	Veiligheid en farmacokinetiek van AAC

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.

Om te bepalen of het antilichaam-antibioticum conjugaat (AAC) veilig in vivo kan worden toegepast in hoeveelheden die nodig zijn om therapeutische effectiviteit te bereiken moeten veiligheids- en farmacokinetiek studies verricht worden. Iedere AAC bestaat uit een combinatie van een specifiek antilichaam en een antibioticum. Het antilichaam is in staat om aan macrofagen en andere relevante myeloïde cellen te binden waar *Coxiella burnetii* (Cb) zich in kan ophouden en zorgt er dus voor dat het antibioticum op de juiste plaats in het lichaam wordt afgeleverd. Na binding van het antilichaam wordt de AAC in zijn geheel opgenomen door de fagocyterende cel. In de cel vindt een enzymatische splitsing plaats waardoor het antibioticum los komt van de AAC en de bacterie in de cel kan doden. Door de koppeling van de 2 actieve stoffen (antilichaam en antibioticum) is het mogelijk dat de farmacokinetiek (zoals de halfwaardetijd en de klaring) anders is dan van de afzonderlijke stoffen. Dit geldt ook voor mogelijke bijwerkingen. Om deze aspecten te kwantificeren en evalueren worden dieren behandeld met verschillende doses van de ontwikkelde AAC.

Voor de veiligheids- en farmacokinetische studie is de primaire uitleesparameter de hoeveelheid AAC die in het bloed gemeten kan worden. Tussen het begin en het eind tijdstip moet een reductie van 82.5% met een power van 80% en een betrouwbaarheid van 95% gemeten worden. Op basis van de testeigenschappen levert dit een groepsgrootte per tijdstip op van 3 dieren. Op basis van gepubliceerde data voor de bepaling van antilichaam halfwaardetijd in muizen is een meetreeks van 5 tijdstipen noodzakelijk. Op 5 tijdstipen in een periode tot maximaal 28 dagen na toediening van de AAC worden 3 dieren per tijdstip geëuthanaseerd. Serum van deze muizen wordt gebruikt om de farmacokinetiek van de AAC te bepalen en diverse weefsels van deze dieren wordt geanalyseerd door middel van macroscopisch en histopathologisch onderzoek om, naast klinische observatie, bijwerkingen vast te kunnen stellen.

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

Na 7 dagen acclimatisatie worden per te testen AAC 3 groepen vrouwelijke muizen van 6-8 weken leeftijd intraveneus geïnjecteerd met antilichaam of antilichaam-antibioticum conjugaat. Het antilichaam-antibioticum conjugaat wordt in 2 doses getest. Deze doses worden bepaald aan de hand van de berekende dosis op basis van gegevens van in vitro studies met cel systemen en een dosis die 10 maal hoger is. Het vrije antilichaam wordt in de hoge doses getest. Op 5 tijdstipen in een periode tot maximaal 28 dagen na toediening van de AAC worden 3 dieren per tijdstip geëuthanaseerd. Serum van deze muizen wordt gebruikt om de farmacokinetiek van de AAC te bepalen en diverse weefsels van deze dieren wordt geanalyseerd door middel van macroscopisch en histopathologisch onderzoek om, naast klinische observatie, bijwerkingen vast te kunnen stellen van zowel het vrije antilichaam als het antilichaam-antibioticum conjugaat.

Er is gekozen voor deze werkwijze omdat hiermee voorkomen wordt dat er bij de muizen herhaaldelijk (5 x in 28 dagen) voldoende bloed afgenomen moet worden voor de AAC bepalingen. Bij euthanasie kan ruim voldoende serum afgenomen worden en heeft deze methode als voordeel dat direct op weefselniveau eventuele bijwerkingen vastgesteld kunnen worden van zowel het vrije antilichaam als het antilichaam-antibioticum conjugaat. Aangezien de AAC methode zich specifiek richt op macrofagen en andere myeloïde cellen die met name in diverse weefsels voorkomen (en niet in circulatie) geniet deze benadering de voorkeur.

Eerst wordt bepaald of het antilichaam alleen een effect heeft, daarna de AAC. Om onnodig ongerief te voorkomen worden eerst de muizen behandeld voor het eind tijdstip (4 weken follow-up). Als in de eerste week na toediening geen klinische verschijnselen worden waargenomen wordt de eerstvolgende groep (3 weken follow-up) behandeld. Zo ook voor de groepen 2 weken follow-up, 1 week follow-up en 1 dag follow-up. Eén dag na de laatste toediening worden alle muizen geëuthanaseerd. Serum wordt gebruikt om de AAC halfwaardetijd te bepalen en de organen worden gebruikt om op weefselniveau steriele ontstekingsverschijnselen te analyseren.

Indien in de eerste week na toediening van het antilichaam alleen of de AAC een HEP toegepast moet worden, worden de volgende behandelingen niet gestart maar wordt eerst onderzocht of de HEP een gevolg is van de behandeling. Indien dit het geval is wordt de AAC niet verder onderzocht in de dierproef. (No Go)

Indien geen bijwerkingen optreden worden per antilichaam en AAC dosis 15 muizen gebruikt voor de veiligheids- en farmacokinetische studie (i.c. per dosis 3 muizen per groep x 5 tijdstippen).

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

Er is gekozen voor sequentieel opofferen van 3 dieren per tijdstip op 5 tijdstippen in een periode tot maximaal 28 dagen na toediening van de AAC op basis van bovenstaande redenering, statistische methoden en uitkomst gegevens in de literatuur over farmacokinetische studies van antilichamen in muizen (Tam 2013).

Voor de veiligheids- en farmacokinetische studie is de primaire uitleesparameter de hoeveelheid AAC die in het bloed gemeten kan worden. Tussen het begin en het eind tijdstip moet een reductie van 82.5% met een power van 80% en een betrouwbaarheid van 95% gemeten worden. Op basis van de testeigenschappen levert dit een groeps grootte per tijdstip op van 3 dieren. Op basis van gepubliceerde data voor de bepaling van antilichaam halfwaardetijd in muizen is een meet reeks van 5 tijd punten noodzakelijk.

Tam SH, McCarthy SG, Brosnan K, Goldberg KM, Scallon BJ. Correlations between pharmacokinetics of IgG antibodies in primates vs. FcRn-transgenic mice reveal a rodent model with predictive capabilities. *MAbs*. 2013 May-Jun;5(3):397-405. doi: 10.4161/mabs.23836.

B. The animals

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

De studies worden uitgevoerd met 6-8 weken oude vrouwelijke muizen (Specific Pathogen Free female Swiss OF1 stam) van erkend fokbedrijf. Dit is de muizenstam, geslacht en leeftijd zoals die ook gebruikt wordt voor de Cb challenge en effectiviteitsstudies. Het gebruik van hetzelfde model met vrouwelijke dieren is belangrijk om de resultaten zo relevant mogelijk te maken voor de vervolgstudie (zie bijlage 2). Het opnieuw valideren van het muizen Cb infectie model is noodzakelijk als in dit stadium zowel mannelijke als

vrouwelijke dieren gebruikt gaan worden. Dit leidt tot een toename in aantal muizen. Aangezien de translocatie van antilichamen van bloed naar weefsel geen geslachtsgebonden kenmerk is is er geen noodzaak om deze aanpassing in het model te maken.

Voor 1 farmacokinetiek experiment worden maximaal 3 muizen per tijdstip op maximaal 5 tijdstippen gebruikt: 15 muizen (hiermee kan een tijdcurve gemaakt worden waaruit halfwaarde tijd berekend kan worden)

Voor elk te testen conjugaat zal eerst een proef met het antilichaam zonder antibioticum conjugaat uitgevoerd worden. Als het antilichaam zonder antibioticum bijwerkingen laat zien ((acute) klinische verschijnselen en/of lokale ontstekingsverschijnselen in organen op basis van histopathologische analyse dan zal dit antilichaam en de bijbehorende AAC niet verder getest worden. (No Go)

Voor elk AAC zijn 2 experimenten nodig om verschillende doses te testen voor kinetiek en mogelijke bijwerkingen (veiligheid).

In totaal zullen maximaal 5 AAC worden ontwikkeld die gericht zijn tegen verschillende moleculen die op de oppervlakte van macrofagen aanwezig zijn. Aan deze antilichamen wordt een antibioticum gekoppeld dat werkzaam is tegen Cb (bijvoorbeeld rifamycine of derivaten daarvan).

Dat betekent dat maximaal $(15) \cdot (3) \cdot (5) = 225$ muizen gebruikt zullen worden.

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.

Vervanging: farmacokinetiek en veiligheid kan alleen uitgevoerd worden in het levende dier. Te testen AAC kandidaten gaat door een uitgebreide in vitro voorscreening zodat alleen AAC kandidaten die specifiek de beoogde doelcellen herkennen en op de juiste wijze het antibioticum in de cel afgeven ook daadwerkelijk in dieren getest worden

Vermindering: in de methode gebruikt door Tam et al worden steeds 4 of 5 dieren per tijdstip bemonsterd. Echter de waargenomen spreiding in die data is zo beperkt dat wij in deze proef het aantal dieren per tijdstip terug gebracht hebben tot 3 dieren, hetgeen voldoende moet zijn voor een betrouwbaar resultaat. Door de volgorde van de proeven zo te kiezen dat bijwerkingen vroeg opgemerkt kunnen worden als een beperkt deel van de dieren gestart zijn met de behandeling kan het aantal dieren wat ingezet wordt bij een antilichaam of AAC met bijwerkingen sterk beperkt worden. Verfijning: wij kiezen ervoor om voor de farmacokinetiek niet herhaalde bloedafname uit te voeren bij de muizen als methode om serum te verzamelen maar onderzoek naar bijwerkingen op weefsel niveau te combineren met de farmacokinetiek studie. Hierbij worden dieren per tijdstip geëuthanaseerd. Het ongerief voor de dieren is hierdoor minder, er kan meer serum afgenomen worden wat de betrouwbaarheid van de AAC bepalingstesten ten goede komt en er kan nauwkeurig onderzoek gedaan worden naar bijwerkingen in relevante weefsels.

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

wij kiezen ervoor om voor de farmacokinetiek niet herhaalde retro-orbitale punctie uit te voeren bij de muizen als methode om serum te verzamelen maar onderzoek naar bijwerkingen op weefsel niveau te combineren met de farmacokinetiek studie. Hierbij worden dieren per tijdstip geëuthanaseerd. Het ongerief voor de dieren is hierdoor minder, er kan meer serum afgenomen worden wat de betrouwbaarheid van de AAC bepalingstesten ten goede komt en er kan nauwkeurig onderzoek gedaan worden naar bijwerkingen in relevante weefsels. Dieren worden gehouden in groepen en kooiverrijking wordt toegepast.

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.

De AAC tegen Cb die ontwikkeld worden zijn voor zover ons bekend uniek en niet eerder beschreven

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.

De intraveneuze injectie met het antilichaam of de AAC zal vanwege het doorsteken van de huid een korte lichte pijnprikkel geven maar het ongerief door het toepassen van een pijnbestrijdingsmethode weegt niet op tegen het te verwachten effect hiervan.

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

stress door hantering, bijwerking van het antilichaam of de AAC

Explain why these effects may emerge.

oppakken en behandelen van dieren is stressvol; de antilichaam component van het antilichaam of de AAC is gericht tegen moleculen op de oppervlakte van macrofagen en myeloïde cellen. Deze cellen kunnen ontstekingsverschijnselen veroorzaken als ze in weefsel geactiveerd worden. Bij in vivo toepassing van de AAC zou dit in de context van weefsel ontsteking tot gevolg kunnen hebben ook al is dit stimulerende effect in vitro bij cellijnen niet waargenomen.

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

het aantal handelingen per dier is door de gekozen opzet tot een minimum beperkt; door middel van in vitro vooronderzoek worden AAC ontwikkeld waarvan het onwaarschijnlijk is dat deze tot bijwerkingen zullen leiden; als bijwerkingen zoals ontsteking waargenomen worden is dit een no go voor verdere testen van het betreffende AAC.

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.

Het dagelijkse klinische scoresysteem ziet er als volgt uit: 0 = normale muis; 1 = ruwe vacht, maar net zo actief tijdens handelingen als normale muis; 2 = ruwe vacht, (evt. bol/opgerold), minder actief tijdens handelingen; 3 = ruwe vacht, (bol/opgerold), moeilijkere (versnelde, buik-) ademhaling, minder actief tijdens handelingen; de dieren met een score 3 worden twee maal daags gescoord, dieren die in een periode van 24 uur op drie opeenvolgende waarnemingen een score 3 hebben worden geëuthanaseerd (HEP) 4 = ruwe vacht, (evt. bol/opgerold), moeilijkere (versnelde, buik-) ademhaling, geringe reactie als de muis wordt opgepakt of gemanipuleerd. Bij score 4 wordt de muis geëuthanaseerd (HEP) 5 = dood gevonden. HEP: het humaan eindpunt wordt gedefinieerd als 1x een score 4 of in een periode van 24 uur op drie opeenvolgende waarnemingen een score 3. Muizen waar HEP op van toepassing is worden geëuthanaseerd en door middel van histopathologisch onderzoek geëvalueerd.

Indicate the likely incidence.

<2%

K. Classification of severity of procedures

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

injectie met AAC: licht ongerief euthanasie: licht ongerief cumulatief ongerief indien geen bijwerking optreedt (>98% van de dieren): licht ongerief Ongerief op basis van 1-malige intraveneuze injectie en euthanasie wordt ingeschat als licht. Indien bijwerkingen optreden die leiden tot toepassing van een HEP dan wordt het ongerief matig. Op basis van in vitro voorstudies wordt het risico op bijwerkingen als laag ingeschat omdat bij in vitro studies de antilichamen de cellen niet activeren (

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

Om te bepalen of de toepassing van de antilichamen of AAC leidt tot ontstekingsverschijnselen in weefsels is het doden van het dier essentieel.

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

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

Yes

Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority' 40100

1.2 Provide the name of the licenced establishment. Stichting Wageningen Research

1.3 List the different types of animal procedures.

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

Serial number	Type of animal procedure
2	Therapeutische effectiviteit van AAC

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.

Om te bepalen of het antibioticum-antilichaam conjugaat (AAC) in vivo kan worden toegepast om therapeutische effectiviteit tegen *Coxiella burnetii* (Cb) te bereiken moeten therapeutische effectiviteits studies verricht worden. Iedere AAC bestaat uit een combinatie van een specifiek antilichaam en een antibioticum. Het antilichaam is in staat om aan macrofagen en andere relevante myeloïde cellen te binden waar *Coxiella burnetii* (Cb) zich in kan ophouden en zorgt er dus voor dat het antibioticum op de juiste plaats in het lichaam wordt afgeleverd. Na binding van het antilichaam wordt de AAC in zijn geheel opgenomen door de fagocyterende cel. In de cel vindt een enzymatische splitsing plaats waardoor het antibioticum los komt van de AAC en de bacterie in de cel kan doden. Om de therapeutische effectiviteit te kwantificeren en evalueren worden dieren behandeld met de ontwikkelde AAC in de eerder bepaalde veilige optimale dosis. Hiervoor wordt een challenge model gebruikt waarbij muizen geïnfecteerd worden met Cb voor therapeutische behandeling met een AAC. Het challenge model dat in eerdere studies gebruikt is. Dit betreft een kort durend infectie model in muizen met een looptijd van 7 dagen waarbij muizen geen klinisch waarneembare symptomen hebben. Virulentie van Cb en ernst van infectie worden in dit model bepaald aan de hand van het gewicht van de muis, de milt van de muis en de Cb load in de milt.

Voor de effectiviteitsstudie is de primaire uitleesparameter de log₂ van de met qPCR bepaalde gemiddelde bacteriële 'genome copy number' per gram milt zoals eerder beschreven door ██████████. Om op basis van gepubliceerde eigenschappen van het infectiemodel een daling van ten minste 40% in de gemiddelde bacteriële 'genome copy number' per gram milt te kunnen meten (met een power van 80% en een betrouwbaarheid van 95%) als relevante maat voor effectiviteit van de AAC is een groepsgrootte 10 dieren per behandeling noodzakelijk.

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

Therapeutische effectiviteit: Na 7 dagen acclimatisatie worden vrouwelijke muizen van 6-8 weken leeftijd geïnfecteerd met ca 10⁵ genome copies Cb in max 0,2 ml volume via een intraperitoneale injectie. Op 18-24 uur na infectie worden de muizen intraveneus geïnjecteerd met de vooraf bepaalde dosis AAC in max. 0.2 ml volume (bijlage 1). Afhankelijk van de farmacokinetiek zoals bepaald in bijlage 1 wordt de behandeling met AAC in de periode van 2-6 dagen na infectie maximaal 2 maal herhaald. Controle groepen (3) krijgen een intraveneuze behandeling met fysiologische zoutoplossing (1), antilichaam zonder antibioticum (2) en vrij antibioticum (3). Zeven dagen na infectie worden de muizen geëuthanaseerd. De muizen worden gewogen, de milt wordt verwijderd en gewogen en de load van Cb in de milt wordt bepaald als maat voor effectiviteit van de AAC.

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

Er is gekozen voor een eindpunt studie op basis van bovenstaande redenering en statistische methoden en uitkomst gegevens in de literatuur over therapeutisch effect van AAC tegen *Staphylococcus aureus* infectie in een vergelijkbaar muizen model (Lehar 2015) en het infectiemodel van Cb in Swiss OF1 muizen (Kuley 2015).

Voor de effectiviteitsstudie is de primaire uitleesparameter de log₂ van de met qPCR bepaalde gemiddelde bacteriële 'genome copy number' per gram milt zoals eerder beschreven door Kuley et al. 2015. Om op basis van gepubliceerde eigenschappen van het infectiemodel een daling van ten minste 40% in de gemiddelde bacteriële 'genome copy number' per gram milt te kunnen meten (met een power van 80% en een betrouwbaarheid van 95%) als relevante maat voor effectiviteit van de AAC is een groepsgrootte 10 dieren per behandeling noodzakelijk.

Lehar SM, Pillow T, Xu M, Staben L, Kajihara KK, Vandlen R, DePalatis L, Raab H, Hazenbos WL, Morisaki JH, Kim J, Park S, Darwish M, Lee BC, Hernandez H, Loyet KM, Lupardus P, Fong R, Yan D, Chalouni C, Luis E, Khalfin Y, Plise E, Cheong J, Lyssikatos JP, Strandh M, Koefoed K, Andersen PS, Flygare JA, Wah Tan M, Brown EJ, Mariathan S. Novel antibody-antibiotic conjugate eliminates intracellular *S. aureus*. *Nature*. 2015 Nov 19;527(7578):323-8. doi: 10.1038/nature16057.

B. The animals

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

De studies worden uitgevoerd met 6-8 weken oude vrouwelijke muizen (Specific Pathogen Free female Swiss OF1 stam) van erkend fokbedrijf. Dit is de muizenstam, geslacht en leeftijd zoals die ook gebruikt wordt voor eerder beschreven Cb challenge model en de voorafgaande farmacokinetiek studie (zie bijlage 1). Het gebruik van hetzelfde model is belangrijk om de resultaten zo betrouwbaar mogelijk te maken en vergelijkbaar met eerder onderzoek voor wat betreft het Cb challenge model.

Voor 1 effectiviteitsexperiment worden maximaal 10 muizen per challenge groep gebruikt en 4 groepen: controle (behandeld met fysiologisch zout oplossing); alleen 1 malig antilichaam; alleen 1 malig antibioticum en 1 malig AAC. = totaal 40 dieren

De effectiviteit van de AAC wordt getest tegen de referentiestam NineMile, en 2 gekarakteriseerde veldisolaten (geit en rund). De geitenstam die getest wordt betreft de stam van de Nederlandse Q-koorts uitbraak en is dus zeer relevant voor de verdere translatie van de AAC naar een medicijn voor de chronische Q koorts patienten.

In totaal zullen maximaal 5 AAC worden ontwikkeld die gericht zijn tegen verschillende moleculen die op de oppervlakte van macrofagen aanwezig zijn. Aan deze antilichamen wordt een antibioticum gekoppeld dat werkzaam is tegen Cb (bijvoorbeeld rifamycine of derivaten daarvan).

Dat betekent dat maximaal $(40) \cdot (3) \cdot (5) = 600$ muizen gebruikt zullen worden.

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.

Vervanging: effectiviteit kan alleen uitgevoerd worden in het levende dier. Te testen AAC kandidaten gaat door een uitgebreide in vitro voorscreening en een in vivo veiligheidsstudie (zie bijlage 1) zodat alleen AAC kandidaten die zonder bijwerkingen specifiek de beoogde doelcellen herkennen en op de juiste wijze het antibioticum in de cel afgeven en Cb afdoden ook daadwerkelijk in Cb geïnfecteerde dieren getest worden. Vermindering: op basis van behaalde resultaten in technisch vergelijkbare studies wordt het minimaal aantal dieren gebruikt waarbij een betrouwbaar resultaat te behalen is. Verfijning: het gekozen muizen model leidt niet tot klinische symptomen bij de muizen in tegenstelling tot andere Cb infectiemodellen terwijl op basis van milt gewicht en Cb load in de milt een goede indicatie van effectiviteit gemeten kan worden.

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

Het gekozen muizen model leidt niet tot klinische symptomen bij de muizen in tegenstelling tot andere Cb infectiemodellen terwijl op basis van milt gewicht en Cb load in de milt een goede indicatie van effectiviteit gemeten kan worden. Dieren worden gehouden in groepen en kooiverrijking wordt toegepast.

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.

De AAC tegen Cb die ontwikkeld worden zijn voor zover ons bekend uniek en niet eerder beschreven

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.

De ip injectie met het infectie inoculum en de iv injectie met de AAC zal vanwege het doorsteken van de huid een korte lichte pijnprikkel geven maar het ongerief door het toepassen van een pijnbestrijdingsmethode weegt niet op tegen het te verwachten effect hiervan.

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

stress door hantering, infectie met Cb

Explain why these effects may emerge.

oppakken en behandelen van dieren is stressvol; intra peritoneale injectie met virulente Cb kan mogelijk in uitzonderlijke gevallen tot ontsteking van de buikholte leiden

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

het aantal handelingen per dier is door de gekozen methode tot een minimum beperkt, er wordt een muizen model gebruikt waar het ontstaan van klinische symptomen uitzonderlijk is, door toepassing van humane eindpunten wordt ernstig ongerief voorkomen

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.

Het dagelijkse klinische scoresysteem ziet er als volgt uit: 0 = normale muis; 1 = ruwe vacht, maar net zo actief tijdens handelingen als normale muis; 2 = ruwe vacht, (evt. bol/opgerold), minderactief tijdens handelingen; 3 = ruwe vacht, (bol/opgerold), moeilijkere (versnelde, buik-) ademhaling, minder actief tijdens handelingen; de dieren met een score 3 worden twee maal daags gescoord, dieren die in een periode van 24 uur op drie opeenvolgende waarnemingen een score 3 hebben worden geëuthanaseerd (HEP) 4 = ruwe vacht, (evt. bol/opgerold), moeilijkere (versnelde, buik-) ademhaling, geringe reactie als de muis wordt opgepakt of gemanipuleerd. Bij score 4 wordt de muis geëuthanaseerd (HEP) 5 = dood gevonden. HEP: het humaan eindpunt wordt gedefinieerd als 1x een score 4 of in een periode van 24 uur op drie opeenvolgende waarnemingen een score 3.

Indicate the likely incidence.

<2%

K. Classification of severity of procedures

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

Het ongerief is gelijk voor alle dieren: injectie met fysiologisch zout, antilichaam, antibioticum of AAC: licht ongerief injectie met Cb: licht ongerief infectie met Cb: licht ongerief euthanasie: licht ongerief Het cumulatief ongerief van de diverse handelingen in het beperkte tijdspad van 7 dagen wordt ingeschat als matig ongerief

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

Om te bepalen of de toepassing van de AAC leidt tot therapeutisch effectieve afdoding van Cb in weefsels is het doden van het dier essentieel.

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

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

Yes



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Wageningen Research

Postbus 59

6700 AB WAGENINGEN



**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
AVD401002017895
Bijlagen
1

Datum 6 juni 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 10 maart 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Antilichaam-antibioticum conjugaat therapie tegen Q-koorts" met aanvraagnummer AVD401002017895. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 31 mei 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Dit betrof het percentage van de dieren die de criteria van humane eindpunten zullen halen.

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 "Antilichaam-antibioticum conjugaat therapie tegen Q-koorts" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 juli 2017 tot en met 1 juni 2019.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Wij hebben advies gevraagd bij de Dierexperimentencommissie DEC-WUR. Dit advies is opgesteld op 9 mei 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet. Wij hebben de DEC om aanvullende informatie gevraagd. Op 29 mei 2017 heeft de DEC

gereageerd op onze vragen. Dit betrof het aantal dieren waarop de ethische afweging is gebaseerd.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

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

Datum:
6 juni 2017
Aanvraagnummer:
AVD401002017895

Bezwaar

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen.

Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

Bij het indienen van een bezwaarschrift vragen we u in ieder geval de datum van de beslissing waartegen u bezwaar maakt en het aanvraagnummer te vermelden. U vindt deze nummers in de rechter kantlijn in deze brief.

Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige voorziening vragen bij de Voorzieningenrechter van de rechtbank in de woonplaats van de aanvrager. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisend belang.

Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op

<http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

Meer informatie

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

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



Bijlagen:

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



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Stichting Wageningen Research
Adres: Postbus 59
Postcode en plaats: 6700 AB WAGENINGEN
Deelnemersnummer: 40100

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 juli 2017 tot en met 1 juni 2019, voor het project "Antilichaam-antibioticum conjugaat therapie tegen Q-koorts" met aanvraagnummer AVD401002017895, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-WUR. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is .

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 10 maart 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 9 mei 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 9 mei 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 9 mei 2017, ontvangen op 9 mei 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 31 mei 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Veiligheid en farmacokinetiek van AAC				
	Muizen (Mus musculus) / Swiss OF1	225	3% Matig 97% Licht	
3.4.4.2 Therapeutische effectiviteit van AAC				
	Muizen (Mus musculus) / Swiss OF1	600	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:
AVD401002017895

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:

AVD401002017895

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

Volgens artikel 10c van de Wet op de Dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g. Uit artikel 10b volgt dat de dierproeven zijn ingedeeld in de categorieën terminaal, licht, matig of ernstig. Als er wijzigingen in een dierproef plaatsvinden, moeten deze gemeld worden aan de Centrale Commissie Dierproeven. Hebben de wijzigingen negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn, dan moet volgens artikel 10a5 de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.

Artikel 10b schrijft voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister een ontheffing is verleend.

Verzorging

De fokker, leverancier en gebruiker moeten volgens artikel 13f van de wet over voldoende personeel beschikken en ervoor zorgen dat de dieren behoorlijk worden verzorgd, behandeld en gehuisvest. Er moeten ook personen zijn die toezicht houden op het welzijn en de verzorging van de dieren in de inrichting, personeel dat met de dieren omgaat moet toegang hebben tot informatie over de in de inrichting gehuisveste soorten en personeel moet voldoende geschoold en bekwaam zijn. Ook moeten er personen zijn die een eind kunnen maken aan onnodige pijn, lijden, angst of blijvende schade die tijdens een dierproef bij een dier wordt veroorzaakt. Daarnaast zijn er personen die zorgen dat een project volgens deze vergunning wordt uitgevoerd en als dat niet mogelijk is zorgen dat er passende maatregelen worden getroffen.

In artikel 9 staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn. In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.

Voordat een dierproef die onderdeel uitmaakt van dit project start, moet volgens artikel 10a3 van de wet de uitvoering afgestemd worden met de instantie voor dierenwelzijn.

Pijnbestrijding en verdoving

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdoving wordt uitgevoerd tenzij dat niet mogelijk is, dan wel bij het verrichten van een dierproef worden pijnstillers toegediend of andere goede methoden gebruikt die de pijn, het lijden, de angst of de blijvende schade bij het dier tot een minimum beperken. Een dierproef die bij het dier gepaard gaat met zwaar letsel dat hevige pijn kan veroorzaken, wordt niet zonder verdoving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdoving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdoving onvereenigbaar is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn

Aanvraagnummer:
AVD401002017895

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 W17-11		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	documenten NTS2017896	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
1	Aanvraagformulier				x		x		
2	Projectvoorstel			x					
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage beschrijving dierproeven				x		x		
5	DEC-advies				x		x		
6	Ontvangstbevestiging				x		x		
7	Advies CCD		x						x
8	Beschikking en vergunning				x		x		

AVD 401002017 896

Aanvraag
Projectvergunning Dierproeven
Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in	40100
		<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	Stichting Wageningen Research
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]
		KvK-nummer	9098104

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	Akkermaalsbos 12
		Postbus	59 B
		Postcode en plaats	6700AW Wageningen
		Iban	NL10RABO0397066465
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Wageningen UR

1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker	(Titel) naam en voorletters	[REDACTED]
		Functie	[REDACTED]
		Afdeling	[REDACTED]
		Telefoonnummer	[REDACTED]
		Email adres	[REDACTED]

1.5 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) naam en voorletters	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
Functie	
Afdeling	
Telefoonnummer	
Email adres	

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	
Email adres	

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
 Wijziging 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 startdatum

1-8-2017

3.2 Wat is de einddatum van het project?

31-7-2022

3.3 Wat is de titel van het project?

Validatie van in vitro methoden voor aantonen van levende Toxoplasma parasieten in vlees met de muis bioassay.

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

Validatie van in vitro methoden voor aantonen van levende Toxoplasma parasieten in vlees met de muis bioassay.

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

Naam DEC

DEC Wageningen UR

Postadres

Droevendaalsesteeg 4, 6708 PB Wageningen

E-mailadres

dec@wur.nl

4 Betaalgegevens

4.1 Om welk type aanvraag gaat het?

Nieuwe aanvraag Projectvergunning €

1035,-

4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD

Wijziging €

Via een eenmalige incasso

Na ontvangst van de factuur

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.

5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

- Projectvoorstel + 1 appendix
 Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen, indien van toepassing

- Melding Machtiging
 Bestelorder WUR1055480

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:

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

- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
- dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierenwelzijn, 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.

Centrale Commissie
Dierproeven Postbus 20401
2500 EK Den Haag

- 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



Form Project proposal

- This form should be used to write the project proposal of animal procedures.
- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed
- For more information on the project proposal, see our website(www.zbo-ccd.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

- | | | |
|-----|--|--|
| 1.1 | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. | 40100 |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment. | Stichting Wageningen Research |
| 1.3 | Provide the title of the project. | Validatie van in vitro methoden voor aantonen van levende Toxoplasma parasieten in vlees met de muis bioassay. |

2 Categories

- | | | |
|-----|---|---|
| 2.1 | Please tick each of the following boxes that applies to your project. | <input type="checkbox"/> Basic Research
<input checked="" type="checkbox"/> Translational or applied research
<input type="checkbox"/> Regulatory use of routine production
<input type="checkbox"/> Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare dier
<input type="checkbox"/> Research aimed at preserving the species subjected to procedures |
|-----|---|---|

Higher education or training

Forensic enquiries

Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

3 General description of the project

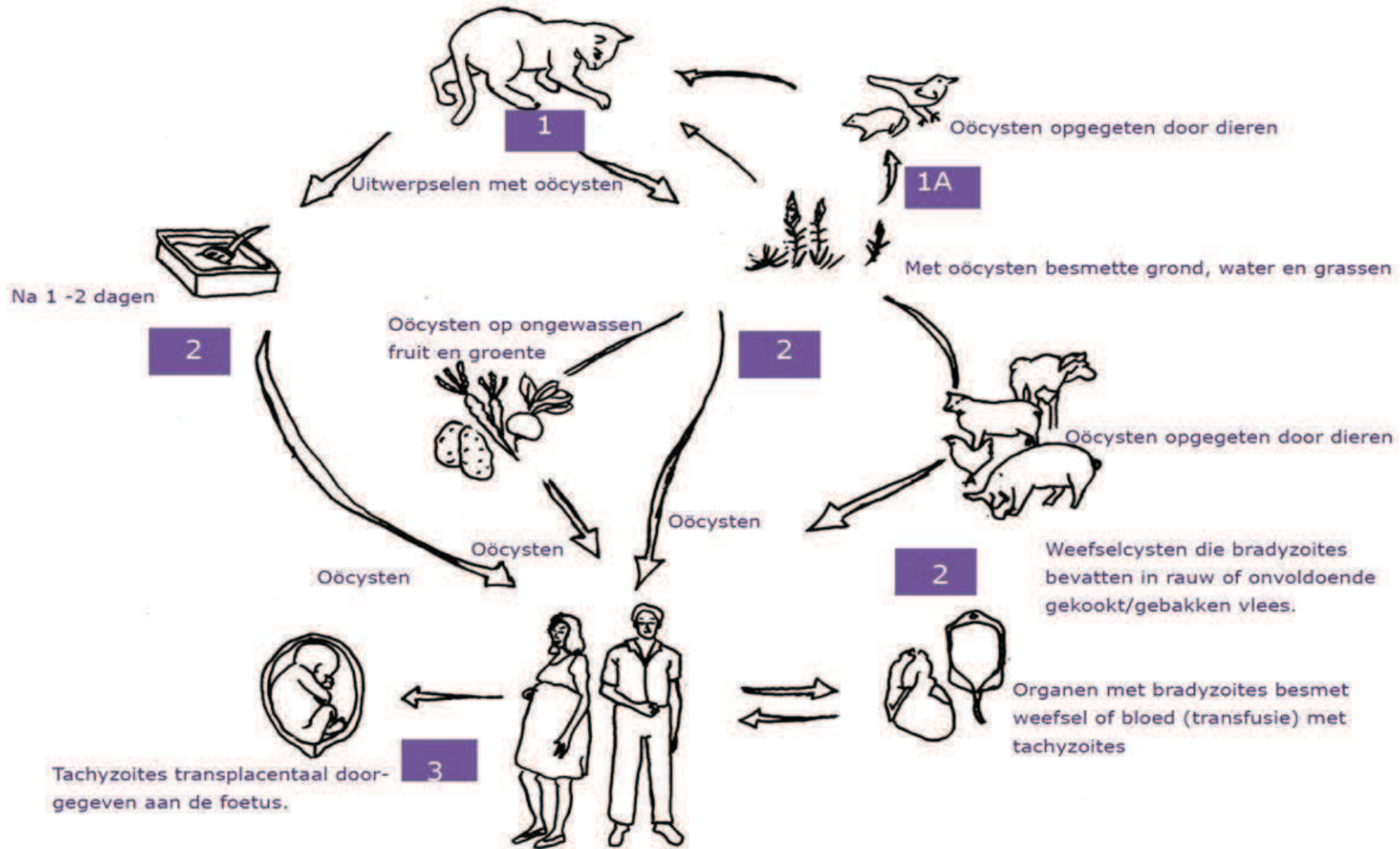
3.1 Background

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

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

Toxoplasma gondii is de verwekker van de parasitaire infectie toxoplasmose en is wereldwijd één van de meest voorkomende parasieten. *T. gondii* is in staat om alle warmbloedige vertebraten te infecteren. Naar schatting is ongeveer een derde van de wereldbevolking geïnfecteerd met de parasiet (Verma en Khanna, 2013). Zwangere vrouwen en immuun-gecompromitteerde mensen vormen de belangrijkste risicogroepen. Ook gezonde mensen kunnen geïnfecteerd worden, waarbij naast de meer zeldzame acute klachten zoals lymfklierzwellings en koorts, met name oogklachten voorkomen, die tot ernstige gezichtsstoornissen kunnen leiden. *T. gondii* is een voedselgerelateerde pathogeen met een zeer hoge ziektelast. De berekende ziektelast uitgedrukt in Disability-Adjusted Life-Years (DALY's) is in Nederland zelfs hoger dan die van een de andere belangrijke enteropathogeen Salmonella en ongeveer gelijk aan de ziektelast van Campylobacter (Havelaar et al. 2012).

De cyclus van Toxoplasma gondii



T. gondii kent verschillende levensstadia. Na opname van *T. gondii* weefselcysten uit vlees, zullen de bradyzoieten vrijkomen in de darmtractus en vervolgens zullen vanuit de bradyzoieten de tachyzoieten worden gevormd. Deze tachyzoieten verspreiden zich door het lichaam naar alle weefsels. Door de afweerreactie die in het lichaam optreedt, lopen deze tachyzoieten uiteindelijk ergens vast en ontstaan er weefselcysten met daarin bradyzoieten. Deze weefselcysten vermenigvuldigen zich niet meer en blijven op hun plek. Ze kunnen jaren, tot levenslang, overleven (Dubey, 2010).

De mens kan geïnfecteerd raken door opname van oöcysten uit de omgeving en die afkomstig zijn van kattenuitwerpselen. Infectie kan ook door consumptie van rauwe of onvoldoende verhit vlees en vleesproducten en levende weefselcysten bevat (Dubey, 2010). In Europa lijkt vlees de belangrijkste bron van infectie (Cook et al. 2000).

Om het relatieve belang van de verschillende vleesproducten in kaart te brengen heeft het RIVM een QMRA-model (kwantitatieve microbiologische risicobeoordeling) ontwikkeld (Opsteegh et al. 2011). In dit model wordt op basis van het vóórkomen van *T. gondii* infectie bij de verschillende diersoorten, de afdoding door bereiding en de consumptiegegevens, voor ieder vleesproduct het aantal humane infecties voorspeld. Uit dit model blijkt dat 41% van de voorspelde infecties is toe te schrijven aan onverhitte vleesproducten (cervelaat, salami, filet américain, runderrookvlees, Suçuk droge Turkse worst, bacon, ontbijtspek, rauwe ham en theeworst). Op basis daarvan is een van de belangrijkste adviezen van het RIVM om rauwe vleesproducten in te vriezen (Opsteegh et al. 2011). Doordat er slechts beperkt gegevens beschikbaar waren over de afdoding van *T. gondii* bij de bereiding van de vleesproducten zijn om die reden alleen de processtappen vriezen, verhitten en zouten opgenomen in het model. Het is zeer waarschijnlijk dat methodes als roken, zuren, fermenteren en het gebruik van additieven ook effect heeft op de levensvatbaarheid van *T. gondii*, en dus is het aantal voorspelde infecties voor bepaalde producten waarschijnlijk overschat. Het invriezen van vlees is in veel gevallen niet wenselijk (overmatig dripverlies), heeft een negatief effect op de kwaliteit (verkleuring) en heeft mogelijke bezwaren bij afnemers (structuurverlies en hogere kosten).

Momenteel is het alleen mogelijk om te bepalen of met *T. gondii* besmet vlees nog een besmettingsrisico vormt, door middel van een dierproef (muisbioassay) (Dubey, 2010), maar grootschalig gebruik van deze methode is niet wenselijk vanwege het gebruik van proefdieren, tijdrovend en kostbaar. De huidige dierproefvrije methodes voor het aantonen van *T. gondii* (PCR, real time PCR of ELISA) kunnen geen onderscheid maken tussen levende en dode parasieten waardoor er geen conclusies getrokken kunnen worden.

Het doel van het project is het ontwikkelen en evalueren van een methode om onderscheid te maken tussen levende (en dus infectieuze) en dode *T. gondii*, waarvoor geen proefdieren nodig zijn. Vervolgens zal deze methode ingezet worden om het effect van procesbereiding bij de productie van commerciële vleesproducten te evalueren. Er zullen drie verschillende levend/dood methoden worden geëvalueerd en vervolgens wordt de meest geschikte methode ingezet om te testen of de gebruikte bereidingsmethoden in huidige vorm of met eventuele kleine aanpassingen, effectief zijn in het afdoden van *T. gondii* om hierdoor het risico voor mensen op een *T. gondii* besmetting te verminderen.

Literatuur

Cook, A.J., Gilbert, R.E., Buffolano, W., Zufferey, J., Petersen, E., Jenum, P.A., Foulon, W., Semprini, A.E., Dunn, D.T., 2000. Sources of toxoplasma infection in pregnant women: European multicentre case-control study. European Research Network on Congenital Toxoplasmosis. *Bmj* 321, 142-147.

Dubey, J.P., 2010. Toxoplasmosis of Animals and Humans. Second edition. CRC Press; 2010 313 pages. ISBN 978-1-4200-9236-3.

Havelaar, A.H., Haagsma, J.A., Mangen, M.J., Kemmeren, J.M., Verhoef, L.P., Vijgen, S.M., Wilson, M., Friesema, I.H., Kortbeek, L.M., van Duynhoven, Y.T., van Pelt, W., 2012. Disease burden of foodborne pathogens in the Netherlands, 2009. *International journal of food microbiology* 156, 231-238.

Opsteegh, M., Prickaerts, S., Frankena, K., Evers, E.G., 2011. A quantitative microbial risk assessment for meatborne *Toxoplasma gondii* infection in The Netherlands. *International journal of food microbiology* 150, 103-114.

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?

De doelstelling van dit project is het ontwikkelen en valideren van snelle en effectieve proefdiervrije methoden om onderscheid te maken tussen dode en levende *T. gondii* parasieten afkomstig uit vlees of vleesproducten. Deze methode zal vervolgens ingezet worden om te onderzoeken of de huidige procesmaatregelen voor bereiding van vleesproducten voldoende zijn om *T. gondii* af te doden of te inactiveren. De methode kan ook worden ingezet om procesmaatregelen aan te passen, zodat er veilige vleesproducten met optimaal behoud van kwaliteit worden geproduceerd. De methode zal verstrekt worden aan de partners voor toepassing in de praktijk.

3.3 Relevance

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

Op dit moment is het lastig om te bepalen of vleesproducten die *T. gondii* bevatten, ook daadwerkelijk levende en dus infectieuze parasieten bevatten. De huidige detectiemethoden maken veelal gebruik van het aantonen van DNA van de parasiet en zijn daardoor niet in staat om onderscheid te maken tussen dode en levende parasieten. Er is wel een test beschikbaar voor het aantonen van infectieuze *T. gondii*, maar deze duurt lang en is duur. Bovendien zijn er proefdieren (muizen) voor nodig. Een proefdiervrije test die onderscheid kan maken tussen dode en levende *T. gondii* heeft als voordeel dat ze veel gemakkelijker dan de muizen bioassay kan worden ingezet om het effect van procesmaatregelen te controleren. Dit betekent wellicht dat het advies om rauwe vleesproducten in te vriezen of te bereiden met ingevroren vlees, beperkt kan worden tot de producten waarvoor vast staat dat de bereiding niet effectief *T. gondii* dood. Als het vlees niet ingevroren hoeft te worden, scheelt dat de branche energie kosten waardoor duurzamere producten ontstaan. Daarnaast heeft niet invriezen een positief effect op de kwaliteit van de vleesproducten. Verder is het voordeel van een proefdiervrije methode voor het aantonen van infectieuze *T. gondii* een besparing van het aantal benodigde proefdieren, dit is een zeer gewenste ontwikkeling voor twee van 'de drie V's' (Vermindering en Vervanging). Op wetenschappelijk vlak is een uitbreiding van de levend/dood technologie voor *T. gondii* ook van belang omdat de kennis op dit vlak nog vrij beperkt is voor Toxoplasma. Kennis en methoden die in dit project worden opgedaan kunnen, na eventuele bescherming, gepubliceerd worden. Bovendien kunnen ze toegepast worden bij ander onderzoek naar Toxoplasma.

3.4 Research Strategy

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

Het project bestaat uit drie delen.

1. Het eerste deel is gericht op het ontwikkelen van (een) goed werkende in vitro methode(n) om onderscheid te maken tussen levende en dode *T. gondii*. Hiervoor zullen drie potentiële vervangende methoden voor de huidige bioassay voor het aantonen van de levensvatbaarheid van *T. gondii*

worden onderzocht en er zal worden nagegaan welke methoden goed werken. Deze drie methoden zijn: weefselkweek, een real-time PCR methode die gebruik maakt van PMA (propidium monoazide) methode en microscopische RTV (Real Time Viability) methode die gebruik maakt van fluorescentie.

2. In het tweede deel van het project zullen tien verschillende procesmaatregelen voor de bereiding van vleesproducten geselecteerd worden. Deze maatregelen zullen getest worden op hun effectiviteit om *Toxoplasma* af te doden in vleesproducten met de nieuw ontwikkelde in vitro methoden.

3. Vervolgens zullen de resultaten verkregen in het eerste en tweede deel van de studie gevalideerd worden met de gouden standaard voor onderscheid tussen levende en dode *T. gondii*, een 6 weken durende muizen bioassay. Daarvoor zal de detectielimiet van de nieuw ontwikkelde methode(n) bepaald worden en vergeleken worden met de muizen bioassay. Verder zullen de resultaten van het onderzoek naar de effectiviteit van de procesmaatregelen om *Toxoplasma* af te doden in vleesproducten bevestigd worden met de muizen bioassay. Daartoe zullen drie van de meest effectieve procesmaatregelen geselecteerd worden en getest worden in de nieuw ontwikkelde testen en in de muizen bioassay.

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.

Overzicht van het onderzoek op hoofdlijnen:

1. Ontwikkeling van drie levend / dood methodes op tachyzoieten. In deze fase zal er geen muizen bioassay uitgevoerd worden.

2. Ontwikkeling en optimalisatie van deze drie methoden op weefselcysten (bradyzoieten). In deze fase zal er geen muizen bioassay uitgevoerd worden.

3. Bepaling van de effectiviteit van tien procesmaatregelen voor de bereiding van vleesproducten om *Toxoplasma* af te doden. In deze fase zal er geen muizen bioassay uitgevoerd worden.

4. Bepaling detectielimiet van de levend/dood methode(n) op een reeks van lage tot hoge hoeveelheid weefselcysten (bradyzoieten) in vleesmonsters in de in vitro test methoden en bepaling van de detectielimiet op dezelfde monsters in de muizen bioassay. Daarnaast bevestiging van de resultaten van drie meest effectieve procesmaatregelen voor het afdoden van *Toxoplasma* in vleesproducten in de muizen bioassay. De muizen bioassay wordt tegelijkertijd uitgevoerd voor beide doelen.

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

In het eerste drie delen van het project wordt de muizen bioassay nog niet gebruikt. Dit betreft de delen 1, 2 en 3 zoals beschreven in 3.4.2. Daarin worden de levend/dood testen ontwikkeld en geoptimaliseerd. Wanneer dit succesvol is afgerond komt in deel 3 de bepaling van de effectiviteit van 10 verschillende procesmaatregelen voor bereiding van vleesproducten. In het laatste deel (4) vindt een validatie plaats van de resultaten verkregen de drie voorgaande delen Voor de validatie zal de gouden standaard voor onderscheid tussen levende en dode *T. gondii*, de muizen bioassay gebruikt worden.

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	Bioassay op vleesmonsters gemengd met weefselcysten en met bradyzoieten en bioassay op vleesproducten bereid van Toxoplasma positief vlees.

Appendix
Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	40100				
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Wageningen Research				
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	<table border="1"> <thead> <tr> <th data-bbox="622 879 815 903">Serial number</th> <th data-bbox="1352 879 1697 903">Type of animal procedure</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="622 911 640 935">1</td> <td data-bbox="1352 911 2040 1034">Bioassay op vleesmonsters gemengd met weefselcysten en met bradyzoieten en bioassay op vleesproducten bereid van Toxoplasma positief vlees.</td> </tr> </tbody> </table>	Serial number	Type of animal procedure	1	Bioassay op vleesmonsters gemengd met weefselcysten en met bradyzoieten en bioassay op vleesproducten bereid van Toxoplasma positief vlees.
Serial number	Type of animal procedure					
1	Bioassay op vleesmonsters gemengd met weefselcysten en met bradyzoieten en bioassay op vleesproducten bereid van Toxoplasma positief vlees.					

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.

De muizenbioassay zal uitgevoerd worden zoals eerder uitgevoerd is voor het EFSA Toxoplasma project en beschreven is in het EFSA rapport van Opsteegh et al., 2016 in paragraaf 6.5 (Protocol of the mouse bioassay) blz. 151 (www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/995e). De muizen worden gehouden onder BSL-2 condities. Ieder te testen inoculum wordt verdeeld over 2 muizen. De muizen kunnen ernstig ziek worden, dat is vooral tussen 10 en 14 dagen na infectie . Ernstig zieke muizen worden op basis van humane eindpunten geëuthanaseerd. Na zes weken wordt de proef beëindigd en worden alle muizen geëuthanaseerd. Hersenen en bloed wordt verzameld. De hersenen van de muizen worden onderzocht op Toxoplasma DNA met PCR en het bloed op antilichamen. Aanwezigheid van Toxoplasma DNA in de hersenen is de primaire uitkomstparameter, aanwezigheid van een antilichaam titer is indicatief voor een Toxoplasma infectie (Opsteegh et al., 2016 EFSA rapport).

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

- Eén week gewenning na aankomst.
- Voorafgaand aan inoculatie bloedtappen.
- Inoculatie 1 ml weefseldigest intra peritoneaal.
- Twee keer daags klinisch controleren na infectie tussen dag 8 tot 21 dagen. Er voor en er na één keer per dag klinisch controleren.
- Na 6 weken muizen euthanaseren (cervicale dislocatie). Hersenen en bloed verzamelen.
- Zieke muizen euthanaseren (cervicale dislocatie). Bij euthanasie na 3 dagen maar binnen 14 dagen na inoculatie peritoneaal vocht verzamelen. Bij euthanasie na 14 dagen bloed afnemen en hersenen verzamelen.

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

Er worden twee muizen gebruikt per monster. Het inoculum wordt verdeeld over beide muizen. De keuze voor twee muizen is dat wanneer één muis om wat voor reden dood gaat dan er nog de andere muis om een resultaat van de analyse van het monster te verkrijgen.

B. The animals

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

Diersoorten: muizen. Zes weken oud bij aankomst. Vrouwelijke en mannelijke muizen.

Onderbouwing keuzes: deze werkwijze is beschreven in EFSA rapport Toxoplasma (Opsteegh et al., 2016).

Herkomst: ██████████

Type muis: gamma-interferon-knockout mice (GKO mice)

Inoculatie-route: i.p.

De bioassay bevat uit twee delen: in het eerste deel zal er een vergelijking plaatsvinden van de ontwikkelde in vitro test methoden en de bioassay op basis van een dosis-response curve. In het tweede deel zal de effectiviteit van procesmaatregelen voor afdoding van Toxoplasma in vleesproducten bepaald worden.

Bioassay (eerste deel): dosis response bradyzoiten en weefselcysten

Om de detectielimiet te bepalen wordt een dosis response studie uitgevoerd. Daarvoor wordt een reeks bradyzoiten bereid van laag tot hoog. Deze reeks wordt getest in twee (**van de drie**) *in vitro* methoden (de weefselweek en de PMA methode) en in de bioassay.

Er is gekozen voor een reeks van 10 tot 10.000 bradyzoiten. Uit literatuur blijkt dat de detectielimiet (voor stam ME-49) in Swiss Webster muizen ongeveer 400 bradyzoiten is (Guo et al. 2016).

Er is gekozen om de detectielimiet te bepalen in PBS en in twee verschillende vleesdigesten. De nieuw ontwikkelde in vitro test zal gebruikt worden om levende *T. gondii* te bepalen in vleesproducten. De invloed van de matrix op de detectielimiet zal daarom ook bepaald worden.

Bradyzoiten testen met weefselweek en PMA methode

Dosis / matrix	Aantal proefgroepen	Aantal muizen
PBS	1	2
10, 100, 1000, 10.000 levende bradyzoiten in PBS (in duplo)	8	16
Vleesdigest schaap zonder spike	1	2
10, 100, 1000, 10.000 levende bradyzoiten in vleesdigest schaap (in duplo)	8	16
Vleesdigest rund (of varken) zonder spike	1	2
10, 100, 1000, 10.000 levende bradyzoiten in vleesdigest rund (of varken) (in duplo)	8	16
Totaal	27	54

De derde in vitro testmethode is een Real Time Viability (RTV) methode. Daarmee kunnen de bradyzoiten niet aangetoond worden. Wel is het mogelijk om weefselcysten aan te tonen. Om de resultaten van de RTV methode te valideren worden levende en dode weefselcysten getest in de RTV methode en in de bioassay.

Weefselcysten testen met Real Time Viability

Levende weefselcysten: 10, 100	2	4
Afgedode weefselcysten: 10, 100	2	4
Totaal muizen	4	8

Bioassay (tweede deel): bevestiging van effectiviteit procesmaatregelen:

Er zal Toxoplasma geïnfecteerd vlees, Toxoplasma gespiked vlees (met weefselcysten) en Toxoplasma-negatief vlees worden gebruikt om vleesproducten te bereiden. Drie verschillende procesmaatregelen zullen worden gebruikt om de vleesproducten te bereiden. De vleesproducten zullen worden getest in de muizenbioassay en de in vitro- test(en).

Groepen / matrix	Aantal proefgroepen	Aantal muizen
Geïnfecteerd vlees verdelen in 100g porties:		
• 2 x 100g onbehandeld	2	4
• 2 x 100g proces A	2	4
• 2 x 100g proces B	2	4
• 2 x 100g proces C	2	4
Gespiked vlees verdelen in 100g porties:		
• 2 x 100g onbehandeld	2	4
• 2 x 100g proces A	2	4
• 2 x 100g proces B	2	4
• 2 x 100g proces C	2	4
Negatief vlees verdelen in 100g porties:		
• 1 x 100g onbehandeld	1	2
• 1 x 100g proces A	1	2
• 1 x 100g proces B	1	2
• 1 x 100g proces C	1	2
Totaal muizen	20	40

Reserve muizen

Muizen kunnen als gedurende de eerste drie dagen na inspuiten doodgaan. Meest waarschijnlijke oorzaak daarvoor is een bacteriele besmetting van het materiaal. Een periode van drie dagen is in de beginfase van de Toxoplasma infectie en nog te kort om deze te kunnen diagnosticeren. Om die reden wordt een andere muis met restant van hetzelfde monstermateriaal ingespoten. De kans dat muizen binnen 3 dagen doodgaan is relatief klein maar is niet uitgesloten. Om die reden wordt gekozen voor een aantal reserve muizen. Een aantal van 6 muizen wordt voldoende geacht. Het totale aantal muizen is $54+8+40+6 = 108$.

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.

Vervanging: De bioassay is nodig voor bepaling van het onderscheid tussen levende en dode Toxoplasma parasieten. De in vitro methoden die in dit onderzoek worden ontwikkeld maken het gebruik van de bioassay voor deze toepassing niet meer nodig. Vermindering: Twee muizen wordt als minimum gezien voor uitvoering van een bioassay. Voorafgaand aan het muizenexperiment wordt zowel de gevoeligheid van de in vitro methoden en de effectiviteit van de procesmaatregelen bepaald op basis van de in vitro methoden zelf. Op die manier wordt het aantal groepen in het validatie experiment met muizen beperkt tot doses rondom de detectielimiet en procesmaatregelen die effectief bleken op basis van de in vitro methode. Verfijning: De klinische verschijnselen worden genoteerd aan de hand van een gedifferentieerd scoringssysteem gericht op verandering van houding/gedrag en uiterlijk (conditie van de vacht). De humane eindpunten zijn daar ook op gebaseerd. Onnodig lijden wordt voorkomen door gebruik van dit scoringssysteem.

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

De gezondheid van de dieren wordt twee keer per dag (zie voor details onderdeel A) beoordeeld op basis van een score lijst. Houding/gedrag en conditie vacht wordt beoordeeld. Elk verschijnsel wordt beoordeeld met een score. De humane eindpunten zijn gebaseerd op deze scores.

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.

De dosis-response curve voor infectie van muizen met bradyzoiten van type II T. gondii is in verschillende eerdere experimenten bepaald en de gegevens uit de literatuur zijn worden geanalyseerd in Guo et al., 2015. Zij komen uit op een ID50 (d.w.z. dosis waarbij 50% van de muizen geïnfecteerd raakt) van 462 (exponentieel model) of 348 (beta-Poisson model) bradyzoiten. Het primaire doel van ons experiment is niet om de detectielimiet van de muizenbioassay opnieuw vast te stellen, wij willen de detectielimiet van de in vitro viability testen bepalen en vergelijken met de muizenbioassay. Voor een goede vergelijking kan niet worden volstaan met gegevens uit de literatuur, maar is het nodig de muizenbioassay parallel aan de in vitro testen uit te voeren.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

G. Location where the animals procedures are performed

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Het valt te verwachten dat de muizen pijn krijgen als gevolg van de infectie. Dit komt tot uiting in verandering van gedrag, houding en uiterlijk van de muis. De humane eindpunten zijn hierop gebaseerd.

Om pijn en angst te bestrijden zal buprenorphine (0.05 mg/kg muis) worden toegediend aan de muizen via het drinkwater. Toediening hiervan vermindert de angst en pijn maar niet de uitkomst van een acute Toxoplasma infectie (Lindsay et al., 2005, The Journal of parasitology 91, 1488-1490).

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Muizen kunnen na een ip infectie ascitis vormen in de buikholte als gevolg van groei van tachyzoieten. Muizen kunnen twee weken na infectie doodgaan als gevolg van pneumonie of een encephalitis. Daarna verdwijnt de parasiet uit de organen en manifesteert deze zich in de hersenen (Dubey 2010).

Explain why these effects may emerge.

Bij een peritonitis binnen 3 dagen na toediening kan er sprake zijn van een bacteriële infectie. Oorzaak hiervan is dat organen en weefsels bacteriologisch verontreinigd kunnen zijn. Als gevolg daarvan kunnen er ook bacterien in het weefseldigest aanwezig zijn. Infectie met Toxoplasma kan leiden tot een peritonitis, een pneumonie of een encephalitis.

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

Om bacteriële infecties te voorkomen wordt er een antibioticum-cocktail toegevoegd aan het weefseldigest, deze antibiotica (penicilline-streptomycine, amoxicilline) hebben geen effect op Toxoplasma. Als een muis binnen 3 dagen doodgaat dan is de kans het grootste dat dit is vanwege een bacteriële infectie. In dat geval zal met hetzelfde digest een andere muis geïnoculeerd worden. Zie ook paragraaf B over het gebruik van reservemuizen. Toepassing van humane eindpunten (zie hieronder).

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.

De muizen worden geëuthanaseerd bij uitzichtloos of ernstig lijden. Een coderingslijst voor HEP's wordt gebruikt zoals gebruikt voor het Toxoplasma EFSA project in 2015 en beschreven in het EFSA rapport van Opsteegh et al., 2016 (www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/995e) Muizen worden geëuthanaseerd als een muis een maximum score heeft bereikt in categorie A (score 2) of B (cumulatieve score 3) of als een muis totale score (A+B) van 3 heeft gedurende drie achtereenvolgende dagen. Categorie A (conditie vacht) 0 = gladde (aansluitende) glimmende vacht 1 = ruwe (opgezette) vacht 2 = stijve vacht, blijft opgezet Categorie B (houding/gedrag) 0 = alert en actief 1 = ineengedoken en bolle rug tijdens het lopen 1 = passief tijdens handelingen 1 = wankelende gang (incoördinatie)

Indicate the likely incidence.

50%

K. Classification of severity of procedures

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

Dit is een matig ongerief. Toepassen van HEP's zal ernstig ongerief voorkomen.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

Bloed en hersenen zullen verzameld worden. Deze zijn nodig voor diagnostiek van Toxoplasma.

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

Postbus 65 | 8200 AB Lelystad
Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Wageningen
University & Research

DATUM
23 mei 2017

ONDERWERP
aanvraag projectvergunning
AVD401002017896

ONS KENMERK
AVD401002017896

Geachte CCD,

Onderstaand het advies dat de DEC-WUR heeft gegeven aangaande het project
"Validatie van in vitro methoden voor aantonen van levende Toxoplasma parasieten
in vlees met de muis bioassay"

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: **AVD401002017896**
2. Titel van het project: Validatie van in vitro methoden voor aantonen van levende Toxoplasma parasieten in vlees met de muis bioassay
3. Titel van de NTS: Validatie van in vitro methoden voor aantonen van levende Toxoplasma parasieten in vlees met de muis bioassay
4. Type aanvraag: nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
DEC-WUR

6. Adviestraject
Ontvangen door DEC: 24-04-2017
Aanvraag compleet: 24-04-2017
In vergadering besproken: 15-05-2017
Termijnonderbreking(en) van / tot: geen
Aanpassing aanvraag: 17-05-2017
Advies aan CCD: zie datum brief
7. De Instantie voor Dierenwelzijn heeft een positief oordeel over de kwaliteit van de aanvraag uitgebracht en de DEC heeft dit in haar overweging betrokken.
9. Correspondentie met de aanvrager
De DEC heeft enkel 2 suggesties gedaan voor tekstuele aanpassingen.

INTERNET
www.wur.nl

KvK NUMMER
09098104

CONTACTPERSOON
ing. I.E. Leushuis-Kappers

TELEFOON
+31 (0)320-238170

E-MAIL
DEC@wur.nl

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. De DEC heeft vastgesteld dat het project vergunningplichtig is (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag is een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om over de aanvraag te adviseren vanuit het oogpunt van onafhankelijkheid, onpartijdigheid en beschikbare expertises.

C. Beoordeling (inhoud)

1. De DEC heeft vastgesteld dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.
2. De DEC heeft geen tegenstrijdige wetgeving, gericht op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort, gesignaleerd die het uitvoeren van de proef in de weg kan staan.
3. De DEC heeft vastgesteld dat de in de aanvraag aangekruiste doelcategorie in overeenstemming is met de hoofddoelstelling./ aangekruiste doelcategorieën in overeenstemming zijn met de hoofddoelstellingen.

Belangen en waarden

4. Het directe doel is het vergelijken van nieuwe (in vitro) methoden met een bestaande in vivo methode voor het detecteren van toxoplasma parasieten. Het uiteindelijke doel is de huidige testmethode waarbij muizen gebruikt worden te vervangen door een test die net zo goed is maar waar echter geen proefdieren voor nodig zijn. Met die nieuwe testmethode zullen huidige procesmaatregelen voor bereiding van vleesproducten geëvalueerd worden.
5. De belanghebbenden in het project en hun morele waarden zijn:
 - Toekomstige proefdieren: vermindering van hun aantal
 - Proefdieren: aantasting van welzijn en integriteit
 - Onderzoeker/CRO: economisch belang
 - Producent in vitro test: economische belang
 - Consument: voedselveiligheid en milieu
6. Voor zover de DEC dat kan inschatten is er geen aanleiding om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De DEC heeft vastgesteld dat de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven, afgaande op het geschreven voorstel en het oordeel van de IvD, voldoende gewaarborgd zijn.
8. De DEC heeft vastgesteld dat het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstelling. Het project is vooruitstrevend omdat naar vervangingsmethoden gezocht wordt. De gekozen strategie en experimentele aanpak kan in de ogen van de DEC leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.

Welzijn dieren

9. Er is geen sprake van de bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren.
10. De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen om bijlage III van richtlijn 2010/63/EU.
11. De DEC stelt vast dat een cumulatieve inschatting van ongerief als "matig" realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Ongerief in de experimenten zal bestaan uit: i.p.-toediening van parasieten en ziekteverschijnselen van toxoplasma-infectie. In essentie is er kans op ernstig ongerief maar de HEP's zijn goed gedefinieerd om dit te voorkomen. Verder wordt er standaard pijnbestrijding via het drinkwater gegeven.
12. Naast ongerief is er geen sprake van aantasting van integriteit van het dier, anders dan voortvloeiend uit de proefbehandeling.
13. De DEC heeft vastgesteld dat de criteria voor humane eindpunten goed en navolgbaar zijn gedefinieerd en dat goed in ingeschat welk percentage van de dieren een humaan eindpunt zal bereiken.

3 V's

14. De DEC heeft vastgesteld dat de onderzoeker voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen alternatieven zijn om de doelstelling van het project te realiseren. Voordat overgegaan wordt tot in vivo onderzoek wordt eerst een uitgebreide in vitro voorscreening gedaan. Verder is dit project juist gebaseerd op vervanging.
15. De DEC heeft vastgesteld dat dat de onderzoeker voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er optimaal tegemoet gekomen wordt aan de vereiste van vermindering van dierproeven.
16. De DEC heeft vastgesteld dat het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven. De DEC ziet geen extra mogelijkheden voor verfijning, anders dan die de onderzoeker nu toepast.

DATUM

23 mei 2017

ONS KENMERK

AVD401002017896

PAGINA

3 van 4

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. De dieren worden van beide geslachten in gelijke mate ingezet in de proeven.
19. De dieren worden gedood in het kader van het project. Dit is noodzakelijk voor behalen doelstellingen omdat men onderzoek aan bloed, hersenen en organen wil uitvoeren. De dieren worden gedood volgens een passende methode die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU.

NTS

21. De NTS is naar het oordeel van de DEC een evenwichtige weergave van het project, begrijpelijk geformuleerd en voldoet aan de vereisten in de herziene Wod Art. 10.a.1.7.

D. Ethische afweging

1. De centrale morele vraag van het project is: weegt het doen van onderzoek of toxoplasma parasieten gevonden kunnen worden m.b.v. in vitro alternatieven zodat uiteindelijk in vitro (i.p.v. in vivo) getest kan worden op voedselveiligheid voor de mens op tegen het gebruik van 108 muizen die maximaal matig ongerief ondervinden.
2. In de afweging heeft de DEC geconstateerd dat het hier gaat om een aanvraag met voldoende samenhang. De DEC heeft in haar afweging meegewogen dat als het onderzoek zijn uiteindelijke doel haalt het vervangen huidige in vivo assay kan vervangen door een net zo goed in vitro-alternatief. Hierdoor wordt proefdiergebruik verminderd. De DEC heeft dit gewogen als een reëel belang voor de toekomstige proefdieren. Daarnaast ziet de DEC hier een belang voor de maatschappij: het project draagt bij aan een breed gedragen wens om meer met minder proefdieren te doen. Aanvullend worden met de nieuwe methode ook procesmaatregelen geëvalueerd. De DEC heeft dit meegewogen dit als een reëel belang. De onderzoeker/CRO heeft een economisch belang. De DEC heeft deze economische waarde meegewogen als een beperkt belang. Als het in vitro model effectief en geïmplementeerd is, heeft de consument ook een voordeel. Dat is gerelateerd aan de waarden van voedselveiligheid en (een veilig) milieu. Ook producent hebben daarbij een belang. De DEC heeft deze belangen in het kader van dit project ingeschat als reëel.
Tot slot zijn de waarden van de proefdieren in het geding. Zij ervaren maximaal matig ongerief als gevolg van de handelingen binnen dit project. De integriteit wordt in dit project niet sterker aangetast dan gebruikelijk bij het uitvoeren van een dierproef.
3. Op basis van bovenstaande overwegingen is de DEC van mening dat het ethisch verantwoord is om onderzoek te doen naar het zoeken van een in vitro-alternatief voor een bestaande in vivo toxoplasma assay met maximaal matig ongerief voor maximaal 100 muizen.
De centrale morele vraag kan met "ja" beantwoord worden.

DATUM

23 mei 2017

ONS KENMERK

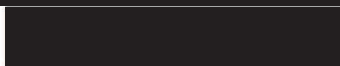
AVD401002017896

PAGINA

4 van 4

E. Advies

1. Advies aan de CCD:
 - De DEC adviseert de vergunning te verlenen.
2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.
3. Er zijn geen knelpunten/dilemma's naar voren gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies.





> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Wageningen Research

Postbus 59

6700 AB WAGENINGEN



**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
AVD401002017896

Bijlagen

2

Datum 25 april 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED],

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 24 april 2017. Het gaat om uw project "Validatie van in vitro methoden voor aantonen van levende Toxoplasma parasieten in vlees met de muis bioassay". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD401002017896. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

Datum:

25 april 2017

Aanvraagnummer:

AVD401002017896

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

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:

25 april 2017

Aanvraagnummer:

1002017896

Over uw project

Geplande startdatum:

1 augustus 2017

Geplande einddatum:

31 juli 2022

Titel project:

Validatie van in vitro methoden voor aantonen van levende Toxoplasma parasieten in vlees met de muis bioassy

Titel niet-technische samenvatting:

Validatie van in vitro methoden voor aantonen van levende Toxoplasma parasieten in vlees met de muis bioassy

Naam DEC:

DEC Wageningen UR

Postadres DEC:

Droevendaalsesteeg 4, 6708 PB Wageningen

E-mailadres DEC:

dec@wur.nl

Betaalgegevens

De leges bedragen:

€ 1035,-

De leges voldoet u:

na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen:

- Projectvoorstel
 Beschrijving Dierproeven
 Niet-technische samenvatting

Ondertekening

Naam:

[Redacted]

Functie:

[Redacted]

Plaats:

Wageningen

Datum:

25 april 2017



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Wageningen University and Research Concernstaf+
t.a.v. Crediteurenadministratie
Droevendaalsesteeg 4
6708 PB WAGENINGEN


**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
AVD401002017896
Bijlagen
2

Datum 25 april 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 25 april 2017
Vervaldatum: 25 mei 2017
Factuurnummer: 170896
Ordernummer: WUR1055480

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD401002017896	€ 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

Stichting Wageningen Research

Postbus 59

6700 AB WAGENINGEN



**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
AVD401002017896

Bijlagen

1

Datum 6 juni 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 24 april 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Validatie van in vitro methoden voor aantonen van levende Toxoplasma parasieten in vlees met de muis bioassy" met aanvraagnummer AVD401002017896. 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 "Validatie van in vitro methoden voor aantonen van levende Toxoplasma parasieten in vlees met de muis bioassy" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 augustus 2017 tot en met 31 juli 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Wij hebben advies gevraagd bij de Dierexperimentencommissie DEC Wageningen UR. Dit advies is opgesteld op 23 mei 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

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

Datum:
6 juni 2017
Aanvraagnummer:
AVD401002017896

Bezwaar

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen.

Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

Bij het indienen van een bezwaarschrift vragen we u in ieder geval de datum van de beslissing waartegen u bezwaar maakt en het aanvraagnummer te vermelden. U vindt deze nummers in de rechter kantlijn in deze brief.

Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige voorziening vragen bij de Voorzieningenrechter van de rechtbank in de woonplaats van de aanvrager. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisend belang.

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

Meer informatie

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

Centrale Commissie Dierproeven

Bijlagen:

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



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Stichting Wageningen Research

Adres: Postbus 59

Postcode en plaats: 6700 AB WAGENINGEN

Deelnemersnummer: 40100

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 augustus 2017 tot en met 31 juli 2022, voor het project "Validatie van in vitro methoden voor aantonen van levende Toxoplasma parasieten in vlees met de muis bioassy" met aanvraagnummer AVD401002017896, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Wageningen UR. 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 24 april 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 23 mei 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 23 mei 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 23 mei 2017, ontvangen op 23 mei 2017.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Bioassay op vleesmonsters gemengd met weefselcysten en met bradyzoieten en bioassay op vleesproducten bereid van Toxoplasma positief vlees.				
	Muizen (Mus musculus) / Gamma-interferon-knockout mice	108	100% Matig	

Voorwaarden

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

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

In artikel 10, lid 1 sub a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is.

Aanvraagnummer:
AVD401002017896

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:

AVD401002017896

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

Volgens artikel 10c van de Wet op de Dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g. Uit artikel 10b volgt dat de dierproeven zijn ingedeeld in de categorieën terminaal, licht, matig of ernstig. Als er wijzigingen in een dierproef plaatsvinden, moeten deze gemeld worden aan de Centrale Commissie Dierproeven. Hebben de wijzigingen negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn, dan moet volgens artikel 10a5 de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.

Artikel 10b schrijft voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister een ontheffing is verleend.

Verzorging

De fokker, leverancier en gebruiker moeten volgens artikel 13f van de wet over voldoende personeel beschikken en ervoor zorgen dat de dieren behoorlijk worden verzorgd, behandeld en gehuisvest. Er moeten ook personen zijn die toezicht houden op het welzijn en de verzorging van de dieren in de inrichting, personeel dat met de dieren omgaat moet toegang hebben tot informatie over de in de inrichting gehuisveste soorten en personeel moet voldoende geschoold en bekwaam zijn. Ook moeten er personen zijn die een eind kunnen maken aan onnodige pijn, lijden, angst of blijvende schade die tijdens een dierproef bij een dier wordt veroorzaakt. Daarnaast zijn er personen die zorgen dat een project volgens deze vergunning wordt uitgevoerd en als dat niet mogelijk is zorgen dat er passende maatregelen worden getroffen.

In artikel 9 staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn. In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.

Voordat een dierproef die onderdeel uitmaakt van dit project start, moet volgens artikel 10a3 van de wet de uitvoering afgestemd worden met de instantie voor dierenwelzijn.

Pijnbestrijding en verdoving

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdoving wordt uitgevoerd tenzij dat niet mogelijk is, dan wel bij het verrichten van een dierproef worden pijnstillers toegediend of andere goede methoden gebruikt die de pijn, het lijden, de angst of de blijvende schade bij het dier tot een minimum beperken. Een dierproef die bij het dier gepaard gaat met zwaar letsel dat hevige pijn kan veroorzaken, wordt niet zonder verdoving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdoving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdoving onvereenigbaar is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn

Aanvraagnummer:
AVD401002017896

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.