

Inventaris Wob-verzoek W22-03		wordt verstrekt				weigeringsgronden				
nr.	document NTS202115538	reeds openbaar	niet	geheel	deels	5.1, lid 1c	5.1, lid 2e	5.1, lid 2f	5.1, lid 2h	5.2, lid 1
1	aanvraag projectvergunning, d.d. 27 oktober 2021				x		x		x	
2	projectvoorstel (1)				x				x	
3	bijlage dierproeven 1 (1)				x				x	
4	bijlage dierproeven 2 (1)				x				x	
5	NTS	x								
6	DEC-advies, d.d. 13 december 2021				x				x	
7	projectvoorstel (2)				x				x	
8	bijlage dierproeven 1 (2)				x				x	
9	bijlage dierproeven 2 (2)				x				x	
10	conceptadviesnota aan ccd met opmerkingen, d.d. 17 december 2021				x		x		x	x
11	e-mail van CCD aan VGH met aanvullende vragen (1), d.d. 17 december 2021				x		x		x	
12	antwoorden aanvullende vragen van VGH (1)				x		x		x	
13	bijlage dierproeven 1 (3)				x				x	
14	bijlage dierproeven 2 (3)				x				x	
15	e-mail van CCD aan VGH met aanvullende vragen (2), d.d. 27 december 2021				x		x		x	
16	antwoorden aanvullende vragen van VGH (2)				x				x	
17	bijlage dierproeven 1 (4)				x				x	
18	bijlage dierproeven 2 (4)				x				x	
19	adviesnota aan CCD, d.d. 11 januari 2022				x		x		x	x
20	beschikking, d.d. 11 januari 2022				x		x		x	
21	terugkoppeling aan DEC, d.d. 17 januari 2022				x		x		x	



18 MRT 2022

1

5.1 lid2h

202115538

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 neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1

Gegevens aanvrager

1.1 Heeft u een deelnemernummer van de NVWA?

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

Ja > Vul uw deelnemernummer in

5.1 lid2h

Nee > U kunt geen aanvraag doen

1.2 Wat voor aanvraag doet u?

Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 1.3

Wijziging > Vul hiernaast het AVD nummer van uw vergunde project in en ga verder met vraag 2.1

Melding > Vul hiernaast het AVD nummer van uw vergunde project in en ga verder met vraag 2.2

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

Naam instelling of organisatie

5.1 lid2h

Titel, voorletters en achternaam van de portefeuillehouder

Titel Voorletters Achternaam

Dhr. Mw

5.1 lid2e

E-mailadres contactpersoon

5.1 lid2e

Titel, voorletters en achternaam van de diens gemachtigde (indien van toepassing)

Titel Voorletters Achternaam

Dhr. Mw

E-mailadres gemachtigde

5.1 lid2h

Vul de gegevens van het postadres in.

Straat en huisnummer

5.1 lid2h

Postcode en plaats

Postbus, postcode en plaats

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters

5.1 lid2e

Dhr. Mw.

Functie

Afdeling

5.1 lid2h

Telefoonnummer

1.5 (Indien van toepassing) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	E-mailadres	5.1 lid2e	
	(Titel) Naam en voorletters		<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
	Functie		
	Afdeling		
1.6 (Indien van toepassing) Vul hier de gegevens in van de persoon aan wie de portefeuillehouder de verantwoordelijkheid inzake de algemene uitvoering van het project en de overeenstemming daarvan met de projectvergunning heeft gedelegeerd.	E-mailadres		
	(Titel) Naam en voorletters		<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
	Functie		
	Afdeling		
1.7 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de Instantie voor Dierenwelzijn	Telefoonnummer		
	E-mailadres	5.1 lid2h	
1.8 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?	<input type="checkbox"/> Ja > Stuur dan het Ingevulde formulier Melding Machtiging mee met deze aanvraag		
	<input checked="" type="checkbox"/> Nee		

2 Over uw aanvraag

2.1 Gaat uw aanvraag over een wijziging op een vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn?	<input checked="" type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3
	<input type="checkbox"/> Ja > Geef hier onder kort de wijziging en de onderbouwing daarvan weer. Geef in de originele formulieren (niet-technische samenvatting, projectvoorstel en bijlage dierproeven) duidelijk aan (bij voorbeeld in een andere kleur) waar de projectaanvraag wijzigt. Ga daarna verder met vraag 6.
2.2 Gaat uw aanvraag over een melding op een vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn?	<input checked="" type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3
	<input type="checkbox"/> Ja > Geef hier onder weer wat deze melding inhoudt en ga verder met vraag 6

3 Over uw project

3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?	Startdatum	01 - 02 - 2022
	Einddatum (t/m)	5 jaar na werkelijke startdatum
3.2 Wat is de titel van het project?	Evaluatie van biodistributie, farmacokinetiek en farmacodynamiek van potentiële nieuwe geneesmiddelen	
3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Onderzoeken van de verdeling van potentiële nieuwe geneesmiddelen en hun effecten in het lichaam	
3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) van voorkeur?	Naam DEC	5.1 lid2h
	Postadres	
	E-mailadres	

18 MRT 2022

4 Factuurgegevens

4.1 (indien factuuradres afwijkt van de gegevens uit vraag 1.3) Vul de gegevens van het factuuradres in.

Naam:	Afdeling:	
Straat:	Huisnummer:	
Postcode:	Plaats:	
Postbus:	Postcode:	Plaats:
E-mail:		
Ordernummer:		

4.2 (optioneel) Vul hier het ordernummer van de instelling in.

5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

- Projectvoorstel Aantal bijlage(n) dierproeven 2
- 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 en per post naar de Centrale Commissie Dierproeven (voor adresgegevens zie website)

Ondertekening door de portefeuillehouder namens de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.8). 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 C 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

5.1 lid2e

Functie

Plaats

5.1 lid2h

Datum

27 -OCT- 2021

Handtekening

5.1 lid2e



Formulier Projectvoorstel dierproeven

- Dit formulier gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
- Bij dit formulier hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
- Meer informatie vindt u in de 'Toelichting op de te gebruiken formulieren voor de aanvraag van een projectvergunning' 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. 5.1 lid2h
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in. 5.1 lid2h
- 1.3 Vul de titel van het project in. Evaluatie van biodistributie, farmacokinetiek en farmacodynamiek van potentiële nieuwe geneesmiddelen

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 2.1 aangekruiste categorieën.

De ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen bestaat uit verschillende fases. In de eerste fases worden kandidaatstoffen geïdentificeerd met behulp van technieken als *in silico* chemie, bindingstudies, functionele biologische screening, *in vitro* en *ex vivo* assays met cel- of weefselcultuur. Alvorens een teststof (pre-)klinisch getest kan worden, is het van belang dat de biologische beschikbaarheid en effectiviteit ook in een *in vivo* systeem wordt bepaald. De *in vitro* systemen geven indicaties van de

werkzaamheid van de teststof, de *in vivo* systemen geven informatie over de werkelijke biologische beschikbaarheid van de teststof. Daarnaast kunnen *in vivo* ook potentiële onbedoelde negatieve effecten worden geïdentificeerd.

Onze instelling verzorgt 5.1 lid2h om farmaceutische bedrijven en academische instellingen inzicht te geven in de farmacologische eigenschappen van potentiële nieuwe geneesmiddelen tegen ziekten. Met behulp van verschillende methodes wordt binnen onze instelling de biodistributie, effectiviteit en werkingsmechanisme van teststoffen bestudeerd. Twee belangrijke pijlers daarbij zijn 1) het plaatsen van canules voor bemonstering uit verschillende weefsels, bloed en/of cerebrospinale vloeistof in ratten en muizen en 2) het toedienen van een teststof gevolgd door herhaalde (gedrags)observaties en microdissectie. Met de monsters en gegevens die we verzamelen kunnen farmacokinetische en farmacodynamische analyses uitgevoerd worden en *in vivo* effecten worden geëvalueerd. Op deze wijze wordt met gebruik van zo min mogelijk dieren zoveel mogelijk informatie verkregen.

Het hier aangevraagde project betreft het vervolg op een bestaand project binnen onze instelling. Onder projectvergunning AVD 5.1 lid2h) 5.1 lid2h ijn voor onze klanten de afgelopen vijf jaar veel potentiële geneesmiddelen bestudeerd. De canules zijn op verschillende perifere locaties geplaatst, eventueel gecombineerd met een satellietgroep ten behoeve van terminale bemonstering. De meest toegepaste gecanuleerde locaties zijn intra-tumor, subcutaan, vena jugularis, cisterna magna, intrathecaal en ruggenmerg. Daarnaast zijn iets minder frequent andere organen als long en lever gecanuleerd. In dergelijke studies is er met relatief weinig dieren veel informatie verkregen, en een relevante bijdrage geleverd aan het opstellen van farmacokinetische en farmacodynamische profielen van teststoffen. In deze vervolvergunning willen wij dit soort studies blijven uitvoeren om onze klanten inzicht te geven over de biodistributie en effecten van hun potentiële nieuwe geneesmiddelen.

Daarnaast hebben wij de afgelopen jaren geconstateerd dat de door klanten ontwikkelde potentiële nieuwe geneesmiddelen steeds vaker grotere moleculen en/of biologische teststoffen zijn. Deze teststoffen vereisen vaak een andere manier van doseren, bijvoorbeeld direct in de hersenen voor hersenaandoeningen. Het doseren van teststoffen via deze routes vergt expertise, juist ook voor het observeren van de dieren na toediening. Bovendien hebben deze moleculen vaak een langere biologische beschikbaarheid, en vaak ook een verlaat effect ten opzichte van de klassieke kleine moleculen. Naast de verschillende antilichaam- en celtherapieën zien we een toenemende rol voor gentherapieën als potentieel nieuw geneesmiddel, zeker als het (zeer) zeldzame erfelijke aandoeningen betreft. De afgelopen jaren hebben wij meerdere studies uitgevoerd met antilichamen, anti-sense-oligonucleotiden of adeno-associated-virussen. Hierbij zijn de dieren na dosering vaak langere tijd (longitudinaal) geobserveerd. Vervolgens zijn terminale weefselmonsters verzameld om de farmacologie van de teststof te bestuderen. Met behulp van microdissectie kunnen verschillende weefselmonsters (bijvoorbeeld individuele hersengebieden en/of subsecties van andere organen) worden geïsoleerd en apart van elkaar worden geanalyseerd. Hierdoor kan zowel de biodistributie van de teststof als de effecten van de teststof op specifieke organen of orgaan delen worden onderzocht.

In deze aanvraag willen wij de biodistributie, farmacokinetiek, en de farmacodynamiek van teststoffen in het lichaam bepalen. Dit doen wij door middel van het opstellen van een studieplan in overleg met de klant zodanig dat er met gebruik van zo min mogelijk dieren zo veel mogelijk informatie kan worden verkregen.

3.2 Doel

3.2.1 Beschrijf het directe en het uiteindelijke doel van het project. Beschrijf de bijdrage van het behalen van het directe doel aan het uiteindelijke doel.

- Indien het directe doel bestaat uit verschillende subdoelstellingen, benoem deze dan hier.

Doelstelling van het huidige project is het vergaren van kennis over de biodistributie en farmacologie van potentiële nieuwe geneesmiddelen in verschillende weefsels, de algehele circulatie (bloed) en/of de

cerebrospinale vloeistof. Afhankelijk van de al aanwezige informatie en specifieke vraagstelling kan dit middels twee verschillende routes:

- 1) Met behulp van herhaald bemonsteren worden specifiek farmacokinetische (biologische beschikbaarheid) en/of farmacodynamische (effectiviteit) eigenschappen van de te ontwikkelen potentiële nieuwe geneesmiddelen over de tijd in een doelorgaan of matrix bepaald.
- 2) Met herhaalde (gedrags)observaties, gevolgd door *post mortem* (micro)dissectie en analyse, kunnen achtereenvolgens *in vivo* effecten longitudinaal bepaald en *ex vivo* farmacokinetische en/of farmacodynamische eigenschappen van de stof gemeten worden.

In verschillende stadia van de geneesmiddelenontwikkeling kunnen dergelijke studies buitengewoon informatief en waardevol zijn om een goede translatie naar de humane situatie en uiteindelijk de kliniek mogelijk te maken. Bij mensen (patiënten dan wel proefpersonen) zijn vaak wel bloedmonsters beschikbaar, maar geen monsters uit de eigenlijke doelorganen. Doordat in onze dierstudies beide soorten bemonstering wel gecombineerd kunnen worden, is het in een volgend onderzoeksstadium mogelijk de biologische beschikbaarheid in het doelorgaan met grotere zekerheid te voorspellen aan de hand van gegevens uit de humane bloedmonsters. De gegenereerde informatie zal door onze klanten worden gebruikt voor de verdere ontwikkeling en mogelijke toekomstige registratie van het te testen potentiële geneesmiddel. Het preklinisch onderzoek dat wij uitvoeren (hoewel op zichzelf geen wettelijk vereist onderzoek) kan daarom onderdeel worden van een wettelijk verplicht pakket om deze kandidaatstoffen verder in de klinische fase te testen. De resultaten zullen dan door onze klant worden gebruikt voor het IND-rapport (IND= Investigational New Drug) om goedkeuring te krijgen voor first-in-human onderzoek.

Het directe doel is om kennis over de biodistributie, farmacokinetiek en farmacodynamiek van teststoffen en hun metabolieten te verkrijgen. De verzamelde data, inclusief de basale niveaus, worden door onze klanten gebruikt om besluiten te nemen over de verdere ontwikkeling van potentiële nieuwe geneesmiddelen.

Het uiteindelijke doel is om met de verkregen informatie ook translationeel de biologische beschikbaarheid en effectiviteit van het potentiële geneesmiddel met grotere zekerheid te kunnen voorspellen en daarmee bij te dragen aan efficiënte, effectieve en veilige geneesmiddelenontwikkeling. De fysiologische overeenkomsten van de verschillende compartimenten tussen deze knaagdieren en de mens zijn groot, waarmee translatie mogelijk is.

3.2.2 Hoe wordt de haalbaarheid van het directe doel gewaarborgd?

De vergunninghouder is een Nederlandse dochteronderneming van de in de **5.1 lid2h** Als **5.1 lid2h** heeft het bedrijf in Nederland een breed scala aan expertises van belang voor het ontwikkelen van nieuwe geneesmiddelen. Klanten zijn wereldwijd farmaceutische bedrijven en academische instellingen. De faciliteiten zijn AAALAC (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care) geaccrediteerd.

Binnen onze instelling hebben we uitgebreide ervaring met microchirurgie, microdialyse en microdissectie. Het herhaaldelijk afnemen van monsters, en het observeren van de dieren met zo min mogelijk handelen zorgt voor consistente data. Daarnaast heeft onze instelling veel expertise in het produceren van de benodigde canules (flexibele katheters, verstevigde canules en gespecialiseerde microdialyseprobes) voor het bemonsteren van de verschillende compartimenten en in de bioanalyse van de afgenomen monsters. Deze ervaring is van belang om de vraagstelling, of de te onderzoeken potentiële geneesmiddelen voldoende in het doelgebied komen en daar de gewenste effecten hebben, te kunnen beantwoorden.

De onderzoekers hebben ruime ervaring in verschillende aspecten van geneesmiddelenontwikkeling en kunnen klanten daarom deskundig advies geven over de planning en de opzet van de uit te voeren onderzoeken, en de interpretatie van de resultaten. De biotechnici die de diergerelateerde handelingen uitvoeren zijn bevoegd en bekwaam om deze uit te voeren. Deze vaardigheden worden getraind en onderhouden onder vergunning AVD **5.1 lid2i** 202114908.

Het is daarom haalbaar de aangevraagde meerdere studies uit te voeren binnen de termijn van 5 jaar.

De afgelopen jaren hebben we per jaar 15 tot 20 studies onder vergunning AVD **5.1 lid2h** uitgevoerd.

3.2.3 Is voor de uitvoering van dit project andere wet- en regelgeving van toepassing die een invloed zou kunnen hebben op het welzijn van de dieren en/of de haalbaarheid van het directe doel?

Nee

Ja > Geef aan welke wet-en regelgeving van toepassing is en beschrijf de effecten daarvan op het welzijn van de dieren en de haalbaarheid van het project.

Om de in dit projectvoorstel beschreven experimenten uit te kunnen voeren, is het van belang dat de instelling niet alleen aan de *Wet op de dierproeven* voldoet, maar ook aan het Besluit genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013, de *Opiumwet* en Regulation (EC) 1069/2009 betreffende dierlijke bijproducten. De bijbehorende vergunningen en ontheffingen zijn aanwezig.

3.3 Belang

3.3.1 Beschrijf het wetenschappelijk en/of maatschappelijk belang van de hierboven beschreven doelen.

De informatie verkregen in dit project levert een wetenschappelijke bijdrage door:

- het ophelderen van de onderliggende processen van verschillende ziektes
- het bepalen van de biodistributie en farmacokinetiek van teststoffen
- identificatie en kwantificering van biomarkers voor diagnostische doeleinden
- vergroten van het inzicht in complexe biologische interacties

Vanuit maatschappelijk oogpunt is het project van belang voor de ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen. Studies uitgevoerd onder dit project kunnen op een snelle en kostenefficiënte manier antwoord geven op uitdagingen in het (pre-)klinisch onderzoek naar nieuwe geneesmiddelen.

Het project levert een bijdrage door in een vroeg stadium in de ontwikkeling niet-werkzame stoffen, stoffen met ongewenste bijwerkingen/off-target effecten en stoffen die niet bij hun beoogde doel komen (door biologische barrières of metabolisering/uitscheiding) te identificeren en uit te sluiten, waardoor geen onnodige tijd en gelden worden besteed aan verdere ontwikkeling. Daarnaast levert het onderzoek zinvolle translationele informatie die van belang is bij het efficiënt uitvoeren van verder (pre-)klinisch onderzoek.

3.3.2 Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden wat hun belang is.

Binnen de huidige projectaanvraag zijn verschillende belanghebbenden.

De uit te voeren experimenten zijn bedoeld om voor onze **klanten** gegevens te genereren waarmee zij een selectie kunnen maken welke potentiële geneesmiddelen mogelijk tot verdere ontwikkeling in de klinische fase kunnen komen op basis van de farmacokinetische en farmacodynamische profielen.

De **proefdieren in dit projectvoorstel** zullen gehanteerd, geopereerd en behandeld worden door ervaren medewerkers. Daardoor blijft het ongerief voor deze dieren beperkt tot maximaal matig. Voor technieken waarbij de kans op ernstiger ongerief duidelijk aanwezig is (bijv. canulatie van lever), wordt ervoor gekozen om de bemonstering/het experiment terminaal (onder algehele anesthesie) uit te voeren in plaats van in het vrij bewegende dier. Door een zorgvuldig gekozen opzet van de proeven en door de herhaalde observaties en/of bemonstering, wordt het aantal benodigde dieren sterk gereduceerd ten opzichte van methodes waarbij voor elke observatie of meetpunt een groep dieren getermineerd moet worden.

De informatie die uit deze experimenten wordt afgeleid, wordt gebruikt om geschikte kandidaatstoffen te selecteren en hun toedieningsroute en dosis voor verder (pre)klinisch onderzoek te bepalen. Ongeschikte teststoffen worden uitgesloten van verdere ontwikkeling. Dit zal op zijn beurt het aantal **proefdieren** verminderen (wettelijke verplichting Wod) dat in toekomstige preklinische onderzoeken (wettelijk

verplichte veiligheidsstudies voor markttoelating) zal moeten worden ingezet. Zoals boven genoemd, kan het preklinisch onderzoek dat wij uitvoeren door onze klanten gebruikt worden als onderdeel voor het IND-rapport voor het potentiële geneesmiddel.

In de klinische fase is er een ethische plicht om mensen die als **proefpersoon** meewerken aan klinisch onderzoek te beschermen tegen vermijdbare schade of lijden. Om die reden eisen medisch-ethische commissies solide data uit preklinisch onderzoek voordat ze een klinische proef met een experimenteel geneesmiddel toestaan. De Europese richtlijnen verplichten daarom dat geneesmiddelen voor humaan gebruik worden getest in proefdieren.

Onze studies dragen bij aan het belang van de klant om hun kandidaatstof als geneesmiddel aan patiënten te kunnen verstrekken. Daarmee zijn de **patiënten** en hun familie en omgeving de uiteindelijke belanghebbenden.

3.4 Strategie

3.4.1 Geef een overzicht van de algemene opzet van het project. Besteed aandacht aan de eventuele fasering in de uitvoering en de samenhang. Vermeld eventuele mijlpalen, keuzemomenten en beslisriteria.

Om onze klanten inzicht te geven in de mogelijkheden en eigenschappen van potentiële nieuwe geneesmiddelen maken wij gebruik van herhaaldelijke monsterafname (met behulp van geïmplanteerde canules, katheters en/of de microdialysetechniek), en/of herhaaldelijke observatie, vaak gevolgd door terminale (micro)dissectie.

In overleg met de klant en gebruikmakend van onze expertise wordt een studie opgezet op basis van tot nu toe bekende informatie over en gefocust op de teststof en de beoogde therapeutische toepassing. De studies worden zodanig ontworpen dat een maximale hoeveelheid data met zo min mogelijk dieren gegenereerd kan worden. Waar mogelijk worden teststoffen in een studie gecombineerd om zo het gebruik van controlegroepen te reduceren. Het kan zijn dat er een groep wordt toegevoegd om de vergelijking met eerder door de klant gedane metingen mogelijk te maken. De IvD wordt te allen tijde nauw betrokken bij de keuze voor een studieopzet om een goede evaluatie mogelijk te maken.

Elke studie binnen het project onder bijlage 1 volgt in de basis de volgende opzet:

1. Gebruik van wildtype/gezonde dieren (ratten of muizen) en/of ziektemodellen (bijvoorbeeld muizen met een tumor) in een of meerdere behandelingsgroepen ingedeeld.
2. Het plaatsen/inbrengen van één of meerdere katheters, canules en/of microdialyseprobes.
3. Het toedienen van teststoffen en/of passende controles via een van verschillende mogelijke toedieningsroutes. In sommige gevallen dienen eerst de basaalwaarden te worden bepaald, dan zal deze stap worden overgeslagen.
4. Monsterafname uit een of meerdere weefsels/organen/cerebrospinale vloeistof/bloed gedurende minstens enkele uren.
5. Terminatie van het dier, collectie van terminale monsters (bijv. organen, cerebrospinale vloeistof, bloed, ander weefsel).
6. *Ex vivo*: bepaling van de toegediende teststof(fen) en/of (ziekte-gerelateerde) relevante biomarkers in verzamelde vloeistof- en weefselmonsters, dit kan zowel binnen onze instelling als bij de klant uitgevoerd worden.

Elke studie binnen het project onder bijlage 2 volgt in de basis de volgende opzet:

1. Gebruik van wildtype/gezonde dieren (ratten of muizen) en/of ziektemodellen in een of meerdere behandelingsgroepen ingedeeld.
2. Het toedienen van teststoffen en/of passende controles via een van verschillende mogelijke toedieningsroutes.

3. Observatie, eventueel met incidentele bloed collectie.
4. Terminatie van het dier, collectie van terminale monsters meestal met gebruikmaking van microdissectie.
5. *Ex vivo*: bepaling van de toegediende teststof(fen) en/of (ziekte-gerelateerde) relevante biomarkers in verzamelde vloeistof- en weefselmonsters, dit kan zowel binnen onze instelling als bij de klant uitgevoerd worden.

Binnen deze algemene opzet zullen verschillende parameters variëren tussen de verschillende studies of onderdelen. Daar deze studies of onderdelen door verschillende klanten in opdracht gegeven worden en per klant ook de karakterisering van verschillende teststoffen kunnen betreffen, zullen de exacte vraagstelling en daardoor ook de exacte onderzoeksopzet verschillen. Bij verschillende studies of onderdelen voor één teststof bouwen deze meestal op elkaar voort.

Voor het ontwerpen van de studieopzet gebruiken we onder meer de volgende informatie:

- beoogde toepassing en doelorgaan van de teststof;
- eigenschappen van de teststof;
- gewenste bepalingen: farmacokinetiek, farmacodynamiek, etc.;
- tot dan toe bekende informatie over de teststof, bijvoorbeeld *in vitro* data of eventuele beschikbare *in vivo* data;
- duur van de studie;
- benodigde aantal monsters, monstertypes en monstervolumina;
- benodigde aantal dieren, als dit niet binnen de standaard richtlijnen valt zal er een statistische evaluatie worden uitgevoerd om het aantal dieren te bepalen.

3.4.2 Onderbouw de gekozen strategie.

De beschreven experimenten dienen ertoe een bijdrage te leveren aan de kennis over de biodistributie, farmacokinetiek en farmacodynamiek van teststoffen en hun metabolieten. Door gebruik te maken van de expertise in onze faciliteit kunnen we longitudinale en translationele gegevens verzamelen omtrent de teststoffen.

De microchirurgische vaardigheden die bij onze faciliteit routinematig worden ingezet dragen bij aan een relevante vermindering van het aantal proefdieren ten opzichte van meer traditionele biodistributiestudies.

Daarbij maken de mogelijkheden van gelijktijdige canulatie van bijvoorbeeld de vena jugularis en de cisterna magna mogelijk dat de eigenschappen van de teststof in meerdere compartimenten en over tijd tegelijk geëvalueerd kunnen worden. Dit vermindert de variatie in de data en levert dus, met gebruik van minder proefdieren, beter voorspellende data. Tenslotte zijn de vaardigheden ook van toepassing voor meer specialistische toedieningsroutes als intracerebroventriculair en intra-cisterna-magna en de mogelijkheid tot accurate microdissectie.

Voor iedere individuele studie wordt vooraf de afweging gemaakt of de hierboven beschreven strategie passend is en daadwerkelijk van toegevoegde waarde voordat verdere keuzes en mogelijkheden ten aanzien van de studieopzet worden besproken.

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

Volgnummer	Titel bijlage Beschrijving dierproef
1	Biodistributie, farmacokinetiek en farmacodynamiek evaluatie met gebruikmaking van canulatie
2	Biodistributie, farmacokinetiek en farmacodynamiek evaluatie na acute toediening
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 in de 'Toelichting op de te gebruiken formulieren voor de aanvraag van een projectvergunning' 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.

5.1 lid2h

1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.

5.1 lid2h

1.3 Vul het volgnummer en de titel van de dierproef in.

Volgnummer	Titel dierproef
1	Biodistributie, farmacokinetiek en farmacodynamiek evaluatie met gebruikmaking van canulatie

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.3 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Experimentele aanpak:

De onderzoeksvraag van de klant is voor veel van de te onderzoeken teststoffen het bepalen van de biodistributie en/of farmacodynamiek over de tijd na dosering. Om herhaalde monsters te kunnen nemen zonder bij ieder tijdstip een groep dieren te moeten termineren is onze instelling gespecialiseerd in het operatief plaatsen van canules in verschillende weefsels, organen en vaten. Hierdoor kan bij ieder dier uit tot maximaal 3 compartimenten herhaald bemonsterd worden. In het vrij bewegende dier is dit met weinig bijkomend ongerief. Na het nemen van een aantal basale monsters wordt de teststof toegediend en daarna verder bemonsterd. De monsterintervallen en de totale tijdsspanne van bemonsteren zijn afhankelijk van de eigenschappen van de teststof en van de exacte klantvraag. Na afloop van het bemonsteren door de canule(s) worden de dieren getermineerd om a) de plaatsing van de canules te verifiëren en/of b) terminale monsters af te nemen.

Primaire uitkomstparameters:

De primaire uitkomstparameters zijn de verzamelde vloeistofmonsters: bloed (voor bijvoorbeeld plasma of serum), microdialysaat, cerebrospinale vloeistof, evenals (eventueel) verzamelde terminale monsters.

Secundaire uitkomstparameters zijn gemeten concentraties van bijvoorbeeld gedoseerde stoffen en/of metabolieten (farmacokinetiek) en biomarkers (farmacodynamiek) in de verzamelde monsters. Deze analyses worden met behulp van geavanceerde technieken, zoals massaspectrometrie of ELISA, uitgevoerd. Dit kan binnen onze instelling, bij de klant en/of een andere instelling zijn.

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

Tijdens het onderzoek kunnen de volgende handelingen worden uitgevoerd (* voor optionele handelingen):

Acclimatisatie

Na aankomst in het vivarium krijgen de dieren de tijd om gewend te raken aan hun nieuwe kooi, voeding en andere omgevingsfactoren. Dit bevordert zowel het dierenwelzijn als de reproduceerbaarheid van experimentele resultaten. De acclimatisatiefase duurt minimaal 7 dagen.

Inoculatie met tumorcellen / xeno-transplantaat *

Het meest relevante organisme om de biodistributie en/of farmacodynamiek voor oncologie-gerelateerde teststoffen in te bestuderen is een muis met tumorweefsel. Hiervoor worden geïnoculeerde dieren ofwel door een externe partij geleverd, of dieren worden in onze instelling geïnoculeerd met de tumor-celijn van interesse. Hiervoor wordt een tumorcelsuspensie onder lichte isofluraansedatie subcutaan in de flank geïnjecteerd waarna de groei van de tumor gevolgd wordt. Na enkele weken bereikt de tumor de optimale grootte (300-400 mm³) voor plaatsing van een canule in de tumor.

Operatie: plaatsen van de canule(s)

Het inbrengen van de canules vindt plaats onder algehele anesthesie. Het dier wordt door middel van isofluraaninhalatie onder diepe anesthesie gebracht. Tevens worden een systemisch analgeticum en topicale analgesie toegepast en het dier wordt subcutaan met 0.9% zoutoplossing behandeld om dehydratie te voorkomen. De operatie vindt plaats op een verwarmde ondergrond met individuele temperatuurcontrole. De microchirurgen werken volgens standaardprotocollen waarmee het risico op uitval door infecties wordt geminimaliseerd. Deze protocollen beschrijven zowel de voorbereidingen van het dier (zoals scheren en desinfecteren van de huid in het operatiegebied), de handelingen met chirurgische materialen (wat is op welke wijze gedesinfecteerd of gesteriliseerd) als de werkwijze tijdens de operatie (handschoenen/mondmasker/niet onnodig boven operatieveld komen/schone en vuile zijde).

Voor verschillende doelgebieden zijn verschillende canules ontwikkeld. Voor het afnemen van en/of het toedienen in lichaamsvloeistoffen worden flexibele katheters en verstevede canules gebruikt. Voor het afnemen van microdialysaat uit de extracellulaire vloeistof worden microdialyseprobes gebruikt, canules met (meestal) een semi-permeabel membraan. Er kan ook gekozen worden voor het plaatsen van een guide-canule. Dit is een speciaal ontworpen houder, waarin precies een dummy stilet of een microdialyseprobe past. Door het gebruik van deze houder ontstaat de flexibiliteit om een probe op een later tijdstip te plaatsen en/of tussentijds te vervangen.

- Cardiovasculair systeem: in de vena jugularis, vena femoralis of arteria femoralis van rat of muis wordt een katheter of een microdialyseprobe geplaatst.
- Cerebrospinale vloeistof: in de cisterna magna van rat of muis wordt een verstevede canule geplaatst.
- Subcutis / subdermis / subdermaal tumor (xeno-)transplantaat: een microdialyseprobe of guide-canule wordt bij rat of muis onder de huid geplaatst. Bij tumormodellen in muizen wordt het membraan van de microdialyseprobe in de tumor ingebracht.
- Ruggenmerg(vocht): bij ratten wordt een microdialyseprobe bij wervel T13 ingebracht of een microdialyseprobe of guide-canule intrathecaal via het atlanto-occipitaal-membraan.
- Longepitheel: bij ratten wordt een microdialyseprobe of guide-canule via de trachea ingebracht.
- Knie: bij ratten wordt een microdialyseprobe achter de patella geplaatst.
- Andere locaties waarvoor de canules en technieken al ontwikkeld zijn. Deze methodes worden op dit moment niet routinematig uitgevoerd, en de bevoegde medewerkers zullen daarom eerst een opfrustraining moeten uitvoeren onder AVD 5.1.11d21 202114908. Dit geldt bijvoorbeeld voor het beenmerg van de tibia van de rat en voor de lever van rat of muis.
- Andere locaties waarvoor de techniek nog (verder) ontwikkeld en vervolgens getraind moet worden (beide onder AVD 5.1.11d21 202114908): op het moment wordt de plaatsing van een microdialyseprobe in de nier van de rat verder ontwikkeld voor zowel de nierschors als het niermerg. Andere locaties kunnen ook gecanuleerd worden als de canule en techniek daarvoor ontwikkeld, verfijnd en getraind zijn. Zodra deze volledig ontwikkeld zijn, goedgekeurd zijn door de IvD en toegepast kunnen worden, zullen we dit via een melding doorgeven.

Gecombineerd kunnen bij muizen maximaal twee canules per dier geplaatst worden, bij ratten zijn dat er maximaal drie per dier. Afhankelijk van het aantal te plaatsen canules duurt de operatie per dier tussen 20 en 90 minuten.

Voor het plaatsen van alle soorten canules wordt eenzelfde soort stappenplan gevolgd.

1. Voorbereidende fase: Het doelgebied wordt vrijgeprepareerd en een lokaal analgeticum toegepast.
2. Inbrengen van canules: Vervolgens worden canules, katheters en/of microdialyseprobes/guides geplaatst. Waar mogelijk worden deze subcutaan getunneld naar de kop, waar deze met speciaal biocompatibele polymeer wordt vastgezet. De binding tussen de schedel en canule wordt versterkt door het bevestigen van een of meerdere schroefjes in de schedel.
3. Afrondende fase: Na het fixeren van de canule worden de incisie(s) gesloten, met hecht draad of weefsellijm.
4. Einde van de operatie: Het dier komt bij of kan meteen worden ingezet voor terminale bemonstering onder anesthesie gedurende maximaal 8 uur. Bij het bijkomen uit de anesthesie worden de dieren warm gehouden door middel van een warmtemat en geobserveerd op tekenen van ongerief. Wanneer de dieren volledig wakker zijn, worden ze individueel in experimentele kooien gehuisvest om beschadiging van elkaars canules te voorkomen. Waar mogelijk worden de dieren zodanig gehuisvest dat ze elkaar kunnen horen, zien, en ruiken; bij langer durende individuele huisvesting is dat tot de overbrenging in experimentele kooien zoveel mogelijk per paar in een kooi met een geperforeerde perspex scheidingswand voor beperkt contact zonder dat de canules kunnen worden beschadigd en daardoor het experiment gevaar kan lopen. Waar nodig krijgen de dieren extra verzorging (pamper care).

Voedselrestrictie *

Het kan in een enkel geval voorkomen dat de dieren bij orale toediening van de teststof "nuchter" moeten zijn. In deze gevallen zullen de dieren gedurende maximaal 8 uur voor toediening gevast worden. Aangezien de meeste toedieningen in de ochtend plaatsvinden, en de bemonstering daaropvolgend gedurende de dag, zal deze voedselrestrictie in de actieve periode van de dieren plaatsvinden. Er is gekozen voor een maximum van 8 uur omdat een vastenperiode van 6 tot 7 uur bij ratten en muizen vaak resulteert in een vergelijkbare maaglediging als bij langere vastenperiodes (bv. Prior et al., 2012; Hauff & Nebendahl, 2017). Hierbij wordt alleen het voer weggenomen, de dieren hebben *ad libitum* toegang tot drinkwater. Dit is, net als bij al toegelaten geneesmiddelen, afhankelijk van stofs specifieke eigenschappen en gebeurt alleen als er al gegevens over de teststof bekend zijn dat dit voor opname van de stof noodzakelijk is. Ter indicatie, in het verleden betrof dit hooguit 1 of 2 studies per periode van 5 jaar. De verwachting is dus, dat voedselrestrictie hoogstens maar bij enkele studies nodig zal zijn.

Toediening(en) van teststof *

Het individuele dier wordt één of meerdere keren (maximaal 60 keer in totaal, bijvoorbeeld 2 maanden dagelijks, of 1 maand tweemaal daags) een dosering van de teststof(fen) (teststof of vehikel, en/of referentiestof) toegediend. Als naast de teststof ook een bekende receptor (ant)agonist als referentiestof toegediend wordt, kan hiermee ook informatie over het werkingsmechanisme van de teststof verkregen worden.

Veelal zal de toediening van de teststof(fen) na een aantal basale monsters tijdens de microdialyse plaatsvinden om pre- met postdoseringsmonsters te kunnen vergelijken. Bij (sub)chronische toediening of als sprake is van langetermijneffecten kan toediening ook al voor de implantatie van de canule(s) aanvangen.

In enkele gevallen zal een basaal profiel van de relevante biomarkers door de tijd heen bepaald moeten worden (meestal als voorbereiding op een later farmacokinetiek/farmacodynamiek experiment). In deze gevallen zal geen toediening gedaan worden.

De volgende toedieningsroutes worden (in overleg met de klant over de geschiktheid/toepasbaarheid voor de specifieke vraagstelling en eigenschappen van de teststof) **bij voorkeur** gebruikt:

- Intraperitoneaal, subcutaan, oraal, intraveneus (eventueel via geplaatste katheter), lokaal door de canule of probe.

Daarnaast kan, indien de al bekende eigenschappen van de teststof hiertoe aanleiding geven, gebruik worden gemaakt van:

- Intramusculair, rectaal, intranasaal.

- Onder anesthesie (bij voorkeur tijdens de bovenbeschreven operatie, routes vooral relevant voor teststoffen zoals adeno-associated-virussen en antisense oligonucleotiden): intracerebroventriculair, intracerebraal, intrathecaal, toedieningen in specifieke organen.

De toediening zal in de meeste gevallen in de eerste uren van de lichtfase plaatsvinden. Indien de activiteit van het dier bepalend is voor de fysiologie van het mechanisme waar de teststof op aangrijpt en dus de transleerbaarheid naar de mens volgens ons in het gedrang komt, hebben we de mogelijkheid het dag-nacht-ritme van de dieren om te keren. In overleg met de klant beslist de onderzoeker over de noodzakelijkheid hiervan.

Klinische observaties

Na de operatie en na toediening van stoffen worden de dieren geobserveerd. Hierbij wordt gekeken naar algemene klinische verschijnselen die op effecten van de toediening van de stof en/of verminderd welzijn kunnen duiden. De dieren worden beoordeeld aan de hand van de door de IvD opgestelde beslisboom. De dieren worden standaard dagelijks gemonitord en eventuele bevindingen worden vastgelegd in het welzijnsdagboek van ieder individueel dier en de studie-overview.

Monsterafname

Na implantatie van de relevante canules en bijkomen uit de anesthesie kunnen vanaf de dag na de operatie tot maximaal 2 maanden de volgende soorten monsters genomen worden:

- **Bloedmonsters** Bloedafname voor en/of na toediening van de teststof gebeurt via de geplaatste katheter in de vena jugularis/femoralis, en kan ook uit de staartvene (voorkeur bij rat) of aangezichtsvene (voorkeur bij muis) gedaan worden. De afname van bloedmonsters is bij voorkeur beperkt tot maximaal 8 monsters van in totaal 10% van het totaal bloedvolume per 24 uur en tot een absoluut maximum van 15% van het totaal bloedvolume in 24 uur, waarbij boven de 10% vervangende vloeistof (fysiologische zoutoplossing) wordt gegeven volgens een door de IvD opgestelde richtlijn en met de klant wordt gesproken over de noodzaak van de overschrijding van 10% van het bloedvolume. Een absoluut maximum van 20%, met vervangende vloeistof, kan alleen verdeeld over verschillende dagen afgenomen worden. Eventuele herstelperiodes zijn 7 dagen voor 7,5 tot 10%, 14 dagen voor 10 tot 15% en 21 dagen voor 15 tot 20%. Bij de kortere experimenten zal er na het afnemen van deze volumina vaker sprake zijn van termineren dan van herstel van het dier. Als leidraad voor de interne richtlijnen is gekeken naar Diehl (2001).
- **Cerebrospinale vloeistof (CSF)** Deze monsters worden genomen door de geplaatste canule in de cisterna magna. De afname van CSF-monsters is beperkt tot 4 monsters van ongeveer 5-10 microliter van een muis en 8 monsters van ongeveer 15-30 microliter van een rat per 24 uur. Door de CSF-productie van 0.3 microliter per minuut in de muis en meer bij grotere diersoorten wordt de afgenomen vloeistof ruimschoots weer aangevuld (Pardridge, Expert Opin Drug Deliv 2016: 13, 963-975).
- **Microdialysaat** Bij wakkere dieren kan monsterafname vanaf de dag na de operatie starten; monsterafname onder anesthesie start direct aansluitend aan de operatie. De geplaatste microdialyseprobes worden via slangetjes verbonden met een microperfusiepompe. Er stroomt nu continu een iso-osmotische vloeistof door de probe, met een snelheid van 0,1 tot enkele microliters per minuut. De uitstromende vloeistof uit de outletslangetjes wordt per dier en per locatie opgevangen om tot bijvoorbeeld 10-, 15-, 30-, 60-, of 240-minutenmonsters te komen. Het principe van (micro)dialyse is dat er netto geen vloeistof aan het dier wordt onttrokken. De bemonsteringssnelheid is afhankelijk van de vraagstelling van de klant en van de al bekende eigenschappen van de teststoffen. Voordat de experimentele monsters verzameld worden, is er een stabilisatiefase van 1,5 tot 2 uur, waarin de dieren wennen aan de slangetjes en de niveaus van biomarkers in de opgevangen monsters stabiliseren.

Over het algemeen worden eerst alle monsters verzameld en opgeslagen en vervolgens met behulp van bijvoorbeeld high-performance liquid chromatography (HPLC) gevolgd door tandem-massaspectrometrie geanalyseerd.

Termineren

Aan het eind van het experiment zullen de dieren onder inhalatie-anesthesie worden getermineerd met een barbituraat-overdosis, zodat de relevante organen kunnen worden verwijderd om de plaatsing van de canule(s) te verifiëren. Dit gebeurt op een wijze in overeenstemming met bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Tevens kan er weefsel, terminaal bloed, en/of terminale cerebrospinale vloeistof worden uitgenomen voor verdere *ex vivo* bepalingen. Wanneer post-mortem weefsel zonder bloed moet worden uitgenomen, kan transcordiale perfusie onder inhalatie-anesthesie onderdeel uitmaken van het terminatieprotocol.

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

Op basis van power-analyse en statistische post-hoc analyse is in het verleden de benodigde groepsgrootte bepaald. Deze loopt uiteen van 4 tot 12 dieren per groep (afhankelijk van de variatie in de concentratie van de te bepalen biomarker of teststof).

- Voor farmacokinetische studies met behulp van een ultra langzame flow (in onze gepatenteerde **5.1 lid2h**) zijn data van minimaal 4 dieren nodig.
- Voor de meeste stabiele biomarkers zijn data van 5 tot 6 dieren per dosering voldoende.
- Voor biomarkers waarvan bekend is dat basale concentraties sterk variëren, zijn data van 7 tot 12 dieren nodig.

Voor niet eerder geteste of bestudeerde biomarkers zou op basis van een pilotstudie de bio-analytische variatie moeten worden bepaald alvorens een power-analyse kan worden uitgevoerd.

Op basis van onze ervaringen in het verleden ligt de uitval na operatie rond de 5% en 25% bij de meest complexe ingrepen (bijvoorbeeld de plaatsing van een microdialyseprobe in het ruggenmerg).

Tumormodellen hebben meer intrinsieke variatie, daarvoor worden extra dieren geïnoculeerd. Het met tumorcellen te inoculeren aantal dieren wordt in overleg met onze oncologie-collega's in **5.1 lid2h** besloten om de uiteindelijke aantallen te kunnen verkrijgen. Zij beschikken over een uitgebreide database met informatie over de groeikarakteristieken per tumorcellijn.

B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, levensstadia, geschatte aantallen per levensstadium, geslacht, genetische wijzigingen en, indien van belang voor het behalen van de doelstelling, de te gebruiken stam.

Volgnr.	Diersoort	Herkomst	Levensstadium	Aantal	Geslacht	Genetisch gewijzigd	Stam
1	Muis	1) dieren	Neonataal-volwassen	1000	m/v	nee	
2	Rat	gefokt voor		1500		nee	
3	Muis	onderzoek		500		ja	

Onderbouw de bovengenoemde keuzes.

Diersoort	Onze instelling heeft expertise in het toepassen van microchirurgie en bemonstering in muizen en ratten. Voor de verschillende onderzoeken wordt per klant en per studie bepaald welke diersoort het meest geschikt is voor het beantwoorden van de specifieke vraag, gecombineerd met het minste te verwachten lijden (in aantal en individueel ongerief). Verder zijn zoals hierboven beschreven sommige canulaties beperkt tot een van beide diersoorten. Als (vervolg)studies naar een teststof met een specifieke soort of model gepland of gedaan zijn, worden deze studies zoveel mogelijk in dieren van dezelfde soort gedaan.
Herkomst	Alle dieren zullen worden verkregen van erkende instellingen voor het fokken van proefdieren.

Levensstadia	<p>In de meeste studies worden (jong)volwassen dieren ingezet. Meestal is dit de relevante leeftijd voor de te onderzoeken teststof. Ook is er bij volwassen dieren meer ruimte op de schedel om de verschillende canules vast te zetten, waardoor bij meerdere te bemonsteren compartimenten het aantal dieren zo laag mogelijk gehouden kan worden. Daarom vinden de canulaties bij voorkeur bij (jong)volwassen dieren plaats, vanaf een leeftijd van 8 weken, bij een gewicht van ~250-350 gram voor ratten en ~20-25 gram voor muizen.</p> <p>Om aan veroudering gerelateerde ziektes te bestuderen worden soms ook oudere dieren ingezet, of juist pasgeboren dieren wanneer het gaat om een afwijking die vanaf de eerste levensdagen moet worden bestreden met een passende therapie. Wanneer dat voor de studie-opzet noodzakelijk is, kunnen dieren tot maximaal 18 maanden geopereerd worden. In het geval van pasgeboren dieren zal het gaan om toediening op of vanaf de vroeg postnatale leeftijd, terwijl de canule-plaatsing en de daaropvolgende bemonstering in het (jong)volwassen dier zullen plaatsvinden.</p>
Aantal	Uitgaande van 25 studies per jaar met gemiddeld 4 groepen met gemiddelde groepsgrootte 6, verwachten we 600 dieren per jaar, dus 3000 over een periode van 5 jaar in te zetten waarvan 1500 muizen en 1500 ratten.
Geslacht	Deze experimenten kunnen zowel in mannelijke als vrouwelijke dieren uitgevoerd worden. Bij het ontwerpen van de studie-opzet wordt met de klant het geslacht van de te testen dieren besproken en het wetenschappelijk belang van het onderzoeken van de effecten van potentiële geneesmiddelen in beide geslachten benadrukt. Voor de klant is het vaak belangrijk om de vergelijkbaarheid met eventueel voorafgaand uitgevoerde <i>in vivo</i> studies of opvolgende <i>in vivo</i> studies veilig te stellen. De klant zal in dat geval moeten aangeven dat een specifiek geslacht passender is in het totale ontwikkelingstraject.
Genetisch gewijzigd	<p>Volgnr. 1 & 2: niet van toepassing.</p> <p>Bij volgnr. 3: Voor tumorstudies met xenotransplantaties (bijvoorbeeld patient-derived-xenograft), zijn immuundeficiënte dieren nodig, om afstoting van de tumor te voorkomen. Een veelgebruikte genetisch gewijzigde muis voor tumorimplantatie is de NSG-muis (NOD.Cg-Prkdc^{scd} Il2rg^{tm1Wjl/SzJ}), maar ook andere dieren kunnen gebruikt worden voor specifieke tumormodellen.</p> <p>Deze GGO-muis heeft zowel een spontane mutatie als een targeted mutatie waardoor de dieren expressie van de genen <i>Prkdc</i> en <i>Il2rg</i> missen. Hierdoor zijn de dieren sterk immuundeficiënt en gevoelig voor infecties. NSG muizen zijn levensvatbaar, vruchtbaar, van normale grootte en vertonen geen sterke fysieke of gedragsafwijkingen.</p> <p>In het geval een klant een studie wil laten uitvoeren met een ander model, kunnen in overleg met de IvD ook andere sterk gelijkende modellen ingezet worden. In het geval van nieuwe modellen zullen we, na overleg met de IvD, een melding of aanvraag tot wijziging indienen.</p>
Stam	<p>De gebruikte stam wordt indien relevant gematcht aan die in andere onderzoeken van de klant.</p> <p>Als immuundeficiënte muizen nodig zijn voor tumorinoculatie met xeno-transplantaat, wordt ook de NMRI-Foxn1nu/nu stam (spontane mutatie, geen GGO) ingezet.</p>

C. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

Ja

Nee > 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.

Dieren worden voor aanvang van het experiment standaard gehuisvest volgens de richtlijnen 2010/63/EU. In bijzondere gevallen, waar bijvoorbeeld gevochten wordt binnen een kooi, kan ervoor gekozen worden om de dieren in kleinere groepen of individueel te huisvesten.

Na de operatie moeten de dieren individueel gehuisvest worden om beschadigingen van de geplaatste canule(s), en daardoor uitval uit het experiment, te vermijden. Ook tijdens de monsterafname via canules moeten de dieren alleen zitten. Bij veel experimenten vindt de monsterafname op de dag na de operatie (met overnacht herstel) plaats. In deze gevallen duurt de solitaire huisvesting doorgaans tussen de 24 en 36 uur (afhankelijk van het individuele tijdstip van operatie en de duur van het microdialyse-experiment. In de experimentele kooien kunnen de dieren elkaar goed horen, zien en ruiken.

Bij experimenten waarin de dieren na operatie langer dan 48 uur gevolgd en/of bemonsterd worden, worden de dieren na de operatie zoveel mogelijk gehuisvest in de eerder genoemde speciale kooien met een scheidingswand, waarbij de dieren maximaal interactie kunnen hebben met uitzondering van direct fysiek contact.

D. Pijn en welzijnsaantasting

Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?

Nee >

Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

Operaties vinden altijd onder diepe algehele anesthesie plaats. Vooral het vrijprepareren van het doelweefsel zou na bijkomen uit de anesthesie nog pijn kunnen veroorzaken bij de dieren. Pijnbestrijding vindt plaats door toediening van een langwerkend systemisch analgeticum voor aanvang van de operatieve ingreep en topicale analgesie op de plaats van incisie.

Na de operatie wordt optimale pijnbestrijding gecontroleerd op basis van uiterlijk en gedrag van de dieren. Extra pijnstilling wordt alleen gegeven als uiterlijk en gedrag van het dier daar aanleiding toe geven.

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

1. Bijkomen uit anesthesie is een bekende oorzaak van stress voor de dieren, hierbij spelen ook de invasiviteit en lengte van de uitgevoerde operatie een rol.
2. Tijdens de experimenten zelf worden de dieren individueel gehuisvest om te voorkomen dat zij elkaars canules beschadigen bij sociale interacties. Individuele huisvesting is een bekende vorm van verminderd dierenwelzijn en moet zo beperkt mogelijk worden ingezet.
3. Een andere bron van potentiële welzijnsaantasting zijn de te onderzoeken teststoffen, deze kunnen ondanks eerdere (veelal *in vitro*) testen nog onbekende bijwerkingen vertonen.
4. Bij gebruik van immuundeficiënte dieren kan er welzijnsaantasting zijn in de vorm van het vatbaarder zijn voor infecties.
5. Na het inoculeren met tumorcellen / xeno-transplantaat (alleen bij gebruik van tumormodellen) kan er welzijnsaantasting optreden.
6. Bij gebruik van oudere dieren is het ook van belang om rekening te houden met leeftijdsspecifieke aantasting van het welzijn (bijvoorbeeld (maar niet uitsluitend) het ontstaan van gezwellen in oudere dieren).

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

1. Oorzaken voor ongerief bij bijkomen uit anesthesie zijn gerelateerd aan de tijdelijk veranderde fysiologie van het lichaam, het lichaam heeft minimaal een aantal uren nodig om de homeostase te herstellen.
2. Het knagen aan geplaatste canules en onderling vechten hebben te maken met normaal sociaal gedrag van de dieren, dit is moeilijk anders tegen te gaan dan door individuele huisvesting.
3. Oorzaak voor het onbekend zijn van mogelijke bijwerkingen is dat de stoffen die getest zullen worden zich vaak nog in een vroeg stadium van de geneesmiddelenontwikkeling bevinden en daarom vaak nog niet eerder (uitgebreid) in dieren getest zijn. Hierdoor kan het zijn dat er onverwachte negatieve bijwerkingen optreden.
4. Dieren met een (gedeeltelijke) immuundeficiëntie hebben bij langdurige blootstelling aan de omgeving meer kans op infecties dan gewone dieren.
5. Bij gebruik van tumormodellen: specifiek ongerief door de groei van de tumor
6. Bij gebruik van oudere dieren: specifiek ongerief heeft meestal te maken met symptomen die ook bij oudere mensen worden waargenomen.

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

1. Om het ongerief bij het bijkomen uit anesthesie te minimaliseren komen de dieren bij in een rustige en verwarmde omgeving waar ze toegang hebben tot voedsel en water. De dieren krijgen voor de operatie een pijnstillertoegevend. De dieren worden regelmatig gecontroleerd tot ze fit genoeg zijn om in hun experimentele kooi te worden geplaatst.
2. Dieren in (sub)chronische experimenten worden per paar gehuisvest in een speciaal ontworpen sociale "individual-group-housing-cage" met scheidingswand. Deze huisvesting behoudt olfactorische, auditieve en visuele interacties aangaan, maar beperkt fysiek contact. Daarnaast wordt altijd kooiverrijking aangeboden aan de dieren.
3. Negatieve effecten veroorzaakt door de teststof worden op vier manieren geminimaliseerd:
 - a) Voorafgaand aan het ontwerpen van de experimentele opzet wordt informatie van de klant gevraagd om zoveel mogelijk over de teststof te weten te komen. Dit is inclusief informatie die kan wijzen op het ontstaan van potentieel ongerief bij de dieren.
 - b) Tijdens de experimenten worden de dieren geobserveerd voor tekenen van ongerief en onbedoelde bijwerkingen. Hierbij wordt het dierenwelzijn ingeschat met behulp van een interne beslisboom. Wanneer noodzakelijk en zinvol zal extra verzorging en/of additionele analgesie worden toegepast.
 - c) In het geval dat er effecten optreden die niet zijn voorzien en/of zijn beschreven in de beslisboom wordt in overleg met de IvD en dierenarts gekeken naar mogelijkheden om het ongerief te verminderen, of indien nodig de dieren te termineren.
 - d) Door een goede experimentele opzet kan ervoor worden gezorgd dat niet alle dieren gelijktijdig worden ingezet bij aanvang van de studie (randomisatie, pilot-experimenten, versprongen toediening).
4. Immuundeficiënte dieren worden tot de operatie in geautoclaveerde IVC-kooien gehouden, met gesteriliseerd voer en drinkwater, om blootstelling aan microbiologische organismen te minimaliseren.
5. Bij tumormodellen wordt na inoculatie tijdens de observaties gemonitord op tumorgrootheid en tumorspecifiek ongerief, bijvoorbeeld zelfverminking door voortdurend krabben, zweervorming, eventuele ectopische tumorgroei.
6. Bij gebruik van oudere dieren: de noodzaak van inzet van deze dieren wordt vooraf in detail met de sponsor besproken. Het gedrag van de dieren wordt tijdens en voor experimenten geobserveerd om vroegtijdig te kunnen ingrijpen bij eventueel ongerief.

E. 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 F.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Tijdens de operatie: bij niet meer zelfstandig ademen na een periode van ademhalingsondersteuning, of sterke bloedingen, wordt een humaan eindpunt toegepast.

Bij het plaatsen van een probe in het ruggenmerg: als tijdens het inbrengen van de canule de ademhaling onregelmatig wordt of zenuwen samentrekken.

Na de operatie en tijdens het experiment wordt een humaan eindpunt toegepast bij:

- het loskomen van probes, katheters of canules (tevens wetenschappelijk eindpunt);
- meerdere convulsies;
- gewichtsverlies (algemeen meer dan 15% gewichtsverlies, vlak na de operatie 20%);
- verlamingsverschijnselen

Bij algehele slechte conditie van het dier na operatie: combinatie van meerdere symptomen (op basis van parameters zoals vacht [zeer dof en ruw], veranderde oogkleur of huidskleur, lokale ontsteking, lichaamstemperatuur [met de hand voelbaar verhoogd of verlaagd]), zónder de bovengenoemde indicaties voor een humaan eindpunt, kan een experiment alleen doorgang vinden als het in dezelfde werkweek nog afgerond wordt en het dier getermineerd wordt, anders wordt een humaan eindpunt toegepast.

Voor tumormodellen geldt dat de tumor maximaal 10% van het normale lichaamsgewicht mag uitmaken en maximaal 2000 mm³ groot mag zijn. Indien er zweren optreden, mogen die maximaal 20% van het oppervlak van de tumor uitmaken. Als er in de te verwachten tijd na inoculatie nog geen tumor te zien is, wordt ook een humaan eindpunt toegepast (bijvoorbeeld 1 maand).

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

Muis	15%
Rat	10%

F. Classificatie van ongerief

Benoem de experiment gebonden factoren die bijdragen aan het ongerief en geef voor elk van deze factoren aan hoe het ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig'. Geef per diersoort en behandelgroep het cumulatieve ongerief aan in percentages van het totale aantal dieren.

Bij de dieren die we laten bijkomen uit de anesthesie is het cumulatieve ongerief voor de dieren als matig in te schatten. De volgende aspecten van deze experimenten zijn meegenomen in de overweging voor de ongeriefclassificatie:

- Bijkomen uit anesthesie (matig)
- Postoperatief ongemak (licht tot matig)
- Postoperatieve individuele huisvesting (licht bij kortdurende experimenten, ook licht bij langetermijn-experimenten door speciale kooien met een geperforeerde tussenwand)
- Hanteren ten behoeve van monsterafname (licht)
- Toedienen van een teststof of tumor/xeno-transplantaat (licht)
- Hebben van een tumor tot 2000 mm³ (licht)
- Hebben van een kleine zweer (matig)
- Toedienen van een barbituraat onder anesthesie (terminaal)

In het geval van terminale procedures met tumormodellen is het cumulatieve ongerief voor de dieren als matig in te schatten. De volgende aspecten van deze experimenten zijn meegenomen in de overweging voor de ongeriefclassificatie:

- Toedienen van een teststof of tumor/xeno-transplantaat (licht)
- Hebben van een tumor tot 2000 mm³ (licht)
- Hebben van een kleine zweer (matig)
- Toedienen van een barbituraat onder anesthesie (terminaal)

In het geval van terminale procedures met vooraf doseren is het cumulatieve ongerief voor de dieren als licht in te schatten. De volgende aspecten van deze experimenten zijn meegenomen in de overweging voor de ongeriefclassificatie:

- Toedienen van een teststof (licht)
- Toedienen van een barbituraat onder anesthesie (terminaal)

In het geval van terminale procedures: terminaal.

Percentages van het totale aantal dieren:

Matig	85%
Licht	5%
Terminaal	10%

G. 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	<p>Diervrije alternatieven zoals computermodellen, <i>in vitro</i> tests, <i>organ-on-a-chip</i> worden wel in het voortraject gebruikt, om verschillende eigenschappen van de teststoffen te onderzoeken. Vooralsnog kan geen van deze methodes de informatie geven die we in deze experimenten verzamelen, en die essentieel is voor de verdere ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen.</p> <p>Het uiteindelijke testen van een potentieel geneesmiddel moet vooralsnog in een intact organisme gebeuren, zodat de volledige fysiologie en ook potentiële bijwerkingen kunnen worden vastgesteld. De kinetiek van farmaca wordt in grote mate bepaald door de doorbloeding van de organen, bovendien kan het zijn dat de teststof in het lichaam een secundair (off-target) effect heeft, waardoor de <i>in vitro</i> gemeten reactie <i>in vivo</i> niet plaatsvindt of wordt geremd of juist versterkt. Alleen teststoffen die in <i>in vitro</i> testen veelbelovend zijn, worden ingezet in dierproeven.</p>
------------	--

Vermindering	<p>Door het gebruik van canules voor herhaalde bemonstering in plaats van alleen monsters te verzamelen na termineren, bereiken we een belangrijke vermindering van het aantal proefdieren. Bij bijvoorbeeld een studie met 6 meetpunten in 4 groepen met een groepsgrootte van 5, zijn in plaats van 120 dieren nog 20 dieren nodig, een reductie van ruim 80%.</p> <p>Daarbij kunnen gemeten waardes over de tijd en in de verschillende compartimenten binnen het dier met elkaar gecorreleerd worden. Bovendien zorgt het herhaald bemonsteren uit één dier voor een verminderde variatie in de data. Hierdoor zijn kleinere groepsgroottes nodig, wat leidt tot een verdere besparing.</p> <p>Ook zijn de operatietechnieken in de afgelopen jaren verder ontwikkeld waardoor meer canules per dier geplaatst kunnen worden en deze langer functioneel blijven. Tenslotte worden meetmethodes continu verbeterd om in de kleine monstervolumina steeds meer analyten te kunnen meten.</p>
Verfijning	<p>Microdialyse en canulatie zijn verfijnde methodes omdat na de plaatsing van de canules herhaalde monsters uit verschillende compartimenten genomen kunnen worden. Gedurende het hele experiment worden de dieren gemonitord op tekenen van ongerief. Alle handelingen aan de dieren, waaronder operaties, hanteren, monitoren, monsterafname, en termineren worden volgens vaststaande protocollen uitgevoerd door bevoegde en goed getrainde medewerkers.</p> <p>Specifiek voor teststoffen met een oncologisch oogmerk is een tumormodel het meest verfijnde model om farmacokinetische en farmacodynamische eigenschappen te onderzoeken. Bij de keuze voor het juiste tumormodel hebben wij te allen tijde ruggenspraak met oncologische experts op een zusterlocatie van onze 5.1 lid2h</p>

Zijn er nadelige milieueffecten te verwachten?

Nee

Ja > Benoem de te verwachten milieueffecten en geef aan welke maatregelen zijn genomen om deze tot een minimum te beperken.

H. Hergebruik

Worden er dieren ingezet die eerder in een andere dierproef zijn gebruikt?

Nee, ga verder met vraag I.

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

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

Nee

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

I. Herhaling

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

n.v.t.

J. Plaats waar de dierproef wordt uitgevoerd

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder Wod valt?

Nee > Ga verder met vraag K.

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?

K. Bestemming van de dieren bij einde experiment

Worden de dieren gedood?

Nee > Beschrijf de bestemming van de dieren.

Ja > Geef aan waarom de dieren worden gedood.

Om na te gaan of de canule in het juiste doelweefsel is geplaatst moet dit weefsel terminaal worden vrijgeprepareerd en uitgenomen om hiervan een macroscopische beoordeling te doen. Ook worden bij veel van de experimenten analyses van terminale monsters (organen, weefsels, bloed, cerebrospinale vloeistof) gepland.

Indien dieren worden gedood, wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van Richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja > Betreft het een dodingsmethode die alleen onder specifieke voorwaarden mag worden toegepast?

Nee > Beschrijf de dodingsmethode

(Jong)volwassen dieren worden meestal onder isofluraananesthesie gedood door middel van een intracardiale barbituraat-overdosis of intracardiale perfusie. In geval van een HEP worden neonatale dieren gedecapiteerd en kan bij (jong)volwassen muizen en niet-volwassen ratten (tot 150 g) ook cervicale dislocatie gebruikt worden.

Ja > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Indien dieren worden gedood, maar niet in het kader van de proef, geef aan of herplaatsing is overwogen en waarom hiervan is afgezien.



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 in de 'Toelichting op de te gebruiken formulieren voor de aanvraag van een projectvergunning' 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.

5.1 lid2f

1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.

5.1 lid2h

1.3 Vul het volgnummer en de titel van de dierproef in.

Volgnummer	Titel dierproef
2	Biodistributie, farmacokinetiek en farmacodynamiek evaluatie na acute toediening

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.3 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Experimentele aanpak:

De onderzoeksvraag van de klant is voor veel van de te onderzoeken teststoffen het bepalen van de biodistributie en/of farmacodynamiek over de tijd na dosering. Onze instelling is gespecialiseerd in het uitvoeren van preklinische testen van potentiële nieuwe geneesmiddelen gebruikmakend van micro-chirurgische technieken. De dieren worden gedoseerd en over een periode geobserveerd, eventueel met incidentele bloedafname. Vervolgens worden terminale (weefsel)monsters genomen, meestal met behulp van microdissectie.

Primaire uitkomstparameters:

De primaire uitkomstparameters zijn de verzamelde gegevens over lichaamsgewicht en gedrag- en welzijnscores, evenals de verzamelde monsters.

Secundaire uitkomstparameters zijn gemeten concentraties van bijvoorbeeld gedoseerde stoffen en/of metabolieten (farmacokinetiek) en biomarkers (farmacodynamiek) in de verzamelde monsters. De verzamelde weefsels worden meestal verder opgedeeld in bijvoorbeeld individuele hersengebieden, zodat effecten lokaal bestudeerd kunnen worden. Deze analyses worden met behulp van geavanceerde technieken, zoals massaspectrometrie, ELISA (multiplexing) of qPCR, uitgevoerd. Dit kan binnen onze instelling, bij de klant en/of een andere instelling zijn.

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

Tijdens het onderzoek kunnen de volgende handelingen worden uitgevoerd (* voor optionele handelingen):

Acclimatisatie

Na aankomst in het vivarium krijgen de dieren de tijd om gewend te raken aan hun nieuwe kooi, voeding en andere omgevingsfactoren. Dit bevordert zowel het dierenwelzijn als de reproduceerbaarheid van experimentele resultaten. De acclimatisatiefase duurt minimaal 7 dagen.

Toediening teststof

De volgende toedieningsroutes worden (in overleg met de klant over de geschiktheid/toepasbaarheid voor de specifieke vraagstelling en eigenschappen van de teststof) **bij voorkeur** gebruikt:

- Intraperitoneaal, subcutaan, oraal, intraveneus.

Daarnaast kan, indien de al bekende eigenschappen van de teststof hiertoe aanleiding geven, gebruik worden gemaakt van:

- Intramusculair, rectaal, intranasaal.

- Onder anesthesie (routes vooral relevant voor teststoffen zoals adeno-associated-virussen en antisense oligonucleotiden): intracerebroventriculair, intracerebraal, intrathecaal, intra-cisterna-magna.

Hiervoor volgt de toediening de volgende stappen:

1. Voorbereidende fase: Het doelgebied wordt vrijgeprepareerd en een lokaal analgeticum toegepast.
2. Toedienen van teststof: Door middel van het stereotactisch positioneren wordt de naald of canule in het gewenste gebied geplaatst, vervolgens wordt de teststof met een vastgestelde infusiesnelheid geïnjecteerd.
3. Afrondende fase: De naald of canule wordt verwijderd en vervolgens wordt de incisie gesloten met hechtdraad of weefselijm. Bij het bijkomen uit de anesthesie worden de dieren warm gehouden door middel van een warmtemat en geobserveerd op tekenen van ongerief. Wanneer het dier volledig wakker is, wordt het teruggeplaatst in de home-cage met soortgenoten.

Klinische observaties en datacollectie

Na de toediening van stoffen worden de dieren geobserveerd, en meestal ook gescoord ten behoeve van datacollectie. Dit kan over een periode van enkele uren tot enkele maanden zijn (afhankelijk van de eigenschappen van de teststof). Hierbij wordt gekeken naar algemene klinische verschijnselen die op effecten van de toediening van de stof en/of verminderd welzijn kunnen duiden. Daarnaast kan er naar teststof specifieke verschijnselen gekeken worden. De dieren worden beoordeeld aan de hand van de door de IvD opgestelde beslisboom. Bevindingen worden vastgelegd in het welzijnsdagboek van ieder individueel dier en de studie-overview.

Afname van bloedmonsters *

In enkele gevallen zal, om de experimentele vraag te beantwoorden, gekozen worden voor het verzamelen van bloedmonsters. Bloedafname voor en/of na toediening van de teststof gebeurt bij voorkeur uit de staartvene (bij rat) of aangezichtsvene (bij muis). De afname van bloedmonsters is bij voorkeur beperkt tot maximaal 8 monsters van in totaal 10% van het totaal bloedvolume per 24 uur en tot een absoluut maximum van 15% van het totaal bloedvolume in 24 uur, waarbij boven de 10% vervangende vloeistof (fysiologische zoutoplossing) wordt gegeven volgens een door de IvD opgestelde werkinstructie en met de klant wordt gesproken over de noodzaak van de overschrijding van 10% van het bloedvolume. Een absoluut maximum van 20%, met vervangende vloeistof, kan alleen verdeeld over verschillende dagen afgenomen worden. Herstelperiodes zijn 7 dagen voor 7,5 tot 10%, 14 dagen voor 10 tot 15% en 21 dagen voor 15 tot 20%. Als leidraad voor de interne richtlijnen is gekeken naar Diehl (2001).

Termineren en weefselcollectie

Aan het eind van het experiment zullen de dieren onder inhalatie-anesthesie worden getermineerd met een barbituraat-overdosis. Dit gebeurt op een wijze in overeenstemming met bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Tevens kan er weefsel, terminaal bloed, en/of terminaal CSF worden uitgenomen voor verdere *ex vivo* bepalingen. Wanneer post-mortem weefsel zonder bloed moet worden uitgenomen, kan transcandiale perfusie onder inhalatie-anesthesie onderdeel uitmaken van het terminatieprotocol. Vaak wordt er microdissectie gedaan op de hersenen. Hierdoor kunnen analyses worden uitgevoerd specifiek op individuele hersengebieden.

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

Op basis van power-analyse en statistische post-hoc analyse is in het verleden de benodigde groepsgrootte bepaald. Deze loopt over het algemeen uiteen van 2 tot 12 dieren per groep (afhankelijk van de variatie in de concentratie van de te bepalen biomarker of teststof).

- Voor het correleren van metingen aan data van eerdere studies zijn vaak 2 tot 4 dieren voldoende.
- Voor de meeste stabiele biomarkers zijn data van 5 tot 6 dieren per dosering voldoende.
- Voor biomarkers waarvan bekend is dat basale concentraties sterk variëren, zijn data van 7 tot 12 dieren nodig.

Voor niet eerder geteste of bestudeerde biomarkers zou op basis van een pilotstudie de bio-analytische variatie moeten worden bepaald alvorens een power-analyse kan worden uitgevoerd.

B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, levensstadia, geschatte aantallen per levensstadium, geslacht, genetische wijzigingen en, indien van belang voor het behalen van de doelstelling, de te gebruiken stam.

Volgnr.	Diersoort	Herkomst	Levensstadium	Aantal	Geslacht	Genetisch gewijzigd	Stam
1	Muis	1) dieren gefokt voor onderzoek	Neonataal-volwassen	3500	M/F	Nee	
2	Rat			2000		Nee	
3	Muis			500		Ja	

Onderbouw de bovengenoemde keuzes.

Diersoort	<p>Onze instelling heeft expertise in het toepassen van microchirurgie en microdissectie in muizen en ratten. Voor de verschillende onderzoeken wordt per klant en per studie bepaald welke diersoort het meest geschikt is voor het beantwoorden van de specifieke vraag, gecombineerd met het minste te verwachten lijden (in aantal en individueel ongerief).</p> <p>Als (vervolg)studies naar een teststof met een specifieke soort of model gepland of gedaan zijn, worden deze studies zoveel mogelijk in dieren van dezelfde soort gedaan.</p>
Herkomst	Alle dieren zullen worden verkregen van erkende instellingen voor het fokken van proefdieren.
Levensstadia	Over het algemeen worden er (jong)volwassen dieren ingezet. Meestal is dit de relevante leeftijd voor de te onderzoeken teststof. Daarnaast worden soms ook pasgeboren, of juist oudere dieren ingezet, wanneer het gaat bijvoorbeeld over afwijkingen die vanaf de eerste levensdagen moet worden bestreden met passende therapie, of juist later in het leven.
Aantal	Uitgaande van 12 studies per jaar met 10 groepen met groepsgrootte 10, verwachten we 1200 dieren per jaar, dus 6000 over een periode van 5 jaar in te zetten. Hiervan verwachten we 3500 muizen, 500 genetisch gewijzigde muizen en 2000 ratten.
Geslacht	Deze experimenten kunnen zowel in mannelijke als vrouwelijke dieren uitgevoerd worden. Bij het ontwerpen van de studie-opzet wordt met de klant het geslacht van de te testen dieren besproken en het wetenschappelijk belang van het onderzoeken van de effecten van potentiële geneesmiddelen in beide geslachten benadrukt. Voor de klant is het vaak belangrijk om de vergelijkbaarheid met eventueel voorafgaand uitgevoerde in vivo studies of opvolgende in vivo studies veilig te stellen. De klant zal in dat geval moeten aangeven dat een specifiek geslacht passender is in het totale ontwikkelingstraject.

Genetisch gewijzigd	<p>Volgnr. 1 & 2: niet van toepassing.</p> <p>Bij volgnr. 3: In sommige gevallen wordt de teststof onderzocht in een genetisch gemodificeerd model specifiek voor de afwijking. Het eventuele verminderde welzijn van deze dieren wordt altijd van tevoren beoordeeld in overleg met de IvD. Een voorbeeld van een zeldzame ziekte die op deze wijze onderzocht kan worden is de ziekte van Machado-Joseph, een neurodegeneratieve ziekte die zich op latere leeftijd openbaart. Hiervoor wordt gebruik gemaakt van bijvoorbeeld MJD84.2 dieren (B6;CBA-Tg(ATXN3)84.2Cce_Ibez), Cemal et al, Human Molecular Genetics 2002; 11: 1075-1094). Deze dieren worden ingezet voordat symptomen optreden, waarbij de behandeling erop gericht is om de genetische modificatie te herstellen en daarmee de symptomen te voorkomen. Deze genetisch gewijzigde muizen zijn op de jongere leeftijd waarop ze worden ingezet levensvatbaar, vruchtbaar, van normale grootte en vertonen geen sterke fysieke of gedragsafwijkingen.</p> <p>In het geval een klant een studie wil laten uitvoeren met een ander model, kunnen in overleg met de IvD ook andere sterk gelijkende modellen ingezet worden. In het geval van nieuwe modellen zullen we, na overleg met de IvD, een melding of aanvraag tot wijziging indienen.</p>
Stam	De gebruikte stam wordt indien relevant gematcht aan die in andere onderzoeken van de klant.

C. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

Ja

Nee > 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.

Dieren worden standaard gehuisvest volgens de richtlijnen 2010/63/EU. In bijzondere gevallen, waar bijvoorbeeld gevochten wordt binnen een kooi, kan ervoor gekozen worden om de dieren in kleinere groepen of in het uiterste geval individueel te huisvesten.

D. Pijn en welzijnsaantasting

Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?

Nee >

Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

Indien de toediening onder anesthesie plaatsvindt, wordt passende pijnbestrijding toegepast. Een langwerkend systemisch analgeticum wordt voor aanvang gegeven en topicale analgesie op de plaats van incisie.

Na het bijkomen wordt optimale pijnbestrijding gecontroleerd op basis van uiterlijk en gedrag van de dieren. Extra pijnstilling wordt alleen gegeven als uiterlijk en gedrag van het dier daar aanleiding toe geven.

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

1. Bijkomen uit anesthesie is een bekende oorzaak van stress voor de dieren.
2. De andere bron van potentiële welzijnsaantasting zijn de te onderzoeken teststoffen en dosis, deze kunnen ondanks eerdere (veelal *in vitro*) testen nog onbekende bijwerkingen vertonen.
3. Bij gebruik van oudere dieren is het ook van belang om rekening te houden met leeftijdsspecifieke aantasting van het welzijn (bijvoorbeeld (maar niet uitsluitend) het ontstaan van gezwellen in oudere dieren).
4. Bij gebruik van genetisch gemodificeerde dieren, kan er intrinsieke welzijnsaantasting zijn. Dit wordt altijd van te voren beoordeeld.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

1. Oorzaken voor ongerief bij bijkomen uit anesthesie zijn gerelateerd aan de tijdelijk veranderde fysiologie van het lichaam, het lichaam heeft minimaal een aantal uren nodig om de homeostase te herstellen.
2. Oorzaak voor het onbekend zijn van mogelijke bijwerkingen is dat de stoffen die getest zullen worden zich vaak nog in een vroeg stadium van de geneesmiddelenontwikkeling bevinden en daarom vaak nog niet eerder (uitgebreid) in dieren getest zijn. Hierdoor kan het zijn dat er onverwachte negatieve bijwerkingen optreden bij bepaalde dosis. Indien een stof in onze studies ernstige bijwerkingen vertoont, wordt deze uiteraard niet toegelaten tot verdere testen.
3. Bij gebruik van oudere dieren: specifiek ongerief heeft meestal te maken met symptomen die ook bij oudere mensen worden waargenomen.
4. Intrinsieke welzijnsaantasting, bijvoorbeeld een ziektemodel dat symptomen vertoont.

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

1. Om het ongerief bij het bijkomen uit anesthesie te minimaliseren komen de dieren bij in een rustige en verwarmde omgeving waar ze toegang hebben tot voedsel en water. De dieren krijgen voor de anesthesie een pijnstillertoegevend. De dieren worden regelmatig gecontroleerd tot ze fit genoeg zijn om terug in hun groepskooi te worden geplaatst.
2. Negatieve effecten veroorzaakt door de teststof worden op vier manieren geminimaliseerd:
 - a) Voorafgaand aan het ontwerpen van de experimentele opzet wordt informatie van de klant gevraagd om zoveel mogelijk over de teststof te weten te komen. Dit is inclusief informatie die kan wijzen op het ontstaan van potentieel ongerief bij de dieren.
 - b) Tijdens de experimenten worden de dieren geobserveerd voor tekenen van ongerief en onbedoelde bijwerkingen. Hierbij wordt het dierenwelzijn ingeschat met behulp van een interne beslisboom. Wanneer noodzakelijk en zinvol zal extra verzorging en/of additionele analgesie worden toegepast.
 - c) In het geval dat er effecten optreden die niet zijn voorzien en/of zijn beschreven in de beslisboom wordt in overleg met de IvD en dierenarts gekeken naar mogelijkheden om het ongerief te verminderen, of indien nodig de dieren te termineren.
 - d) Door een goede experimentele opzet kan ervoor worden gezorgd dat niet alle dieren gelijktijdig worden ingezet bij aanvang van de studie (randomisatie, pilot-experimenten, versprongen toediening, eerst een lagere dosis toedienen).
3. Bij gebruik van oudere dieren: de noodzaak van inzet van deze dieren wordt vooraf in detail met de sponsor besproken. Het gedrag van de dieren wordt tijdens en voor experimenten geobserveerd om vroegtijdig te kunnen ingrijpen bij eventueel ongerief.
4. Waar mogelijk worden de dieren op een leeftijd ingezet waarin deze nog geen symptomen vertonen. Daarnaast wordt er van te voren beoordeeld of de te verwachten intrinsieke welzijnsaantasting van het model niet meer dan 'licht' is.

E. 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 F.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Tijdens toedieningen onder anesthesie: bij niet meer zelfstandig ademen na een periode van ademhalingsondersteuning, of sterke bloedingen, wordt een humaan eindpunt toegepast.

Tijdens bijkomen uit anesthesie na doseren:

- meerdere convulsies
- gewichtsverlies (algemeen meer dan 15% gewichtsverlies);
- persistente neurologische verschijnselen

Bij algehele slechte conditie van het dier na toediening: combinatie van meerdere symptomen (op basis van parameters zoals vacht [zeer dof en ruw], veranderde oogkleur of huidskleur, lokale ontsteking, lichaamstemperatuur [met de hand voelbaar verhoogd of verlaagd]), zónder de bovengenoemde indicaties voor een humaan eindpunt, kan een experiment alleen doorgang vinden als het in dezelfde werkweek nog afgerond wordt en het dier getermineerd wordt, anders wordt een humaan eindpunt toegepast.

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

Muis 5%
Rat 5%

F. Classificatie van ongerief

Benoem de experiment gebonden factoren die bijdragen aan het ongerief en geef voor elk van deze factoren aan hoe het ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig'. Geef per diersoort en behandelgroep het cumulatieve ongerief aan in percentages van het totale aantal dieren.

Bij de dieren die onder anesthesie gedoseerd worden is het cumulatieve ongerief voor de dieren als matig in te schatten. De volgende aspecten van deze experimenten zijn meegenomen in de overweging voor de ongeriefclassificatie:

- Bijkomen uit anesthesie na toediening (matig)
- Hanteren ten behoeve van monsterafname (licht)
- Toedienen van een barbituraat onder anesthesie (terminaal)

Bij de dieren die zonder anesthesie gedoseerd worden, is het cumulatieve ongerief voor de dieren als licht in te schatten. De volgende aspecten van deze experimenten zijn meegenomen in de overweging voor de ongeriefclassificatie:

- Hanteren ten behoeve van monsterafname (licht)
- Toedienen van een teststof (licht)
- Toedienen van een barbituraat onder anesthesie (terminaal)

Percentages van het totale aantal dieren:

Matig 70%
Licht 30%

G. 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	<p>Diervrije alternatieven zoals computermodellen, <i>in vitro</i> tests, <i>organ-on-a-chip</i> worden wel in het voortraject gebruikt, om verschillende eigenschappen van de teststoffen te onderzoeken. Vooralsnog kan geen van deze methodes de informatie geven die we in deze experimenten verzamelen, en die essentieel is voor de verdere ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen.</p> <p>Het uiteindelijke testen van een potentieel geneesmiddel moet vooralsnog in een intact organisme gebeuren, zodat de volledige fysiologie en ook potentiële bijwerkingen kunnen worden vastgesteld. De kinetiek van farmaca wordt in grote mate bepaald door de doorbloeding van de organen, bovendien kan het zijn dat de teststof in het lichaam een secundair (off-target) effect heeft, waardoor de <i>in vitro</i> gemeten reactie <i>in vivo</i> niet plaatsvindt of wordt geremd of juist versterkt. Alleen teststoffen die in <i>in vitro</i> testen veelbelovend zijn, worden ingezet in dierproeven.</p>
------------	--

Vermindering	<p>Bij de opzet van elke studie worden de groepen en groepsgroottes, eventuele bloedmonsters, teststofdosages en doseringsschema's zorgvuldig gekozen om uit zo min mogelijk dieren alle benodigde informatie te verkrijgen. Door in de experimentele opzet randomisatie, pilotgroepen en verspringende administraties toe te passen, is het vaak mogelijk om eventuele uitval op te vangen zonder dat we gegevens missen voor bepaalde tijdstippen. Daarbij kan, specifiek voor studies waarin antisense oligonucleotiden getest worden, een stapsgewijze dosisverhoging worden geïncorporeerd. Het combineren van een dergelijke pilot met de uiteindelijke monsterverzameling biedt de mogelijkheid om de groep met de optimale dosis aan te vullen in plaats van een heel nieuw experiment te starten. Dit resulteert in een vermindering van 50% tot 75% van de dieren per dosisgroep. Waar mogelijk wordt bij studies met meerdere teststoffen hetzelfde vehikel voor alle teststoffen gebruikt waardoor het aantal groepen gereduceerd wordt.</p> <p>De verzamelde gegevens over tijd (longitudinale observaties) en de gemeten waarden in de verschillende compartimenten, eventueel door microdissectie verkregen, kunnen binnen het dier met elkaar gecorreleerd worden.</p> <p>Verder worden meetmethodes continu verbeterd om in de kleine monsters steeds meer analyten te kunnen meten.</p>
Verfijning	<p>Gedurende het hele experiment worden de dieren gemonitord op tekenen van ongerief. Alle handelingen aan de dieren, waaronder operaties/toedieningen, hanteren, monitoren, monsterafname, en termineren worden volgens vaststaande protocollen uitgevoerd door bevoegde en goed getrainde medewerkers.</p> <p>Het scoren en monitoren van de dieren gebeurt zoveel mogelijk in de groepskooi met soortgenoten.</p>

Zijn er nadelige milieueffecten te verwachten?

Nee

Ja > Benoem de te verwachten milieueffecten en geef aan welke maatregelen zijn genomen om deze tot een minimum te beperken.

H. Hergebruik

Worden er dieren ingezet die eerder in een andere dierproef zijn gebruikt?

Nee, ga verder met vraag I.

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

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

Nee

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

I. Herhaling

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

n.v.t.

J. Plaats waar de dierproef wordt uitgevoerd

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 K.

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?

K. Bestemming van de dieren bij einde experiment

Worden de dieren gedood?

Nee > Beschrijf de bestemming van de dieren.

Ja > Geef aan waarom de dieren worden gedood.

Verzamelen van weefsels is essentieel om de werkzaamheid van de test stof en de aanwezigheid van de teststof te kunnen analyseren

Indien dieren worden gedood, wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van Richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja > Betreft het een dodingsmethode die alleen onder specifieke voorwaarden mag worden toegepast?

Nee > Beschrijf de dodingsmethode

(Jong)volwassen dieren worden meestal onder isofluraanesthesie gedood door middel van een intracardiale barbituraat-overdosis of intracardiale perfusie. In geval van een HEP worden neonatale dieren gedecapiteerd en kan bij (jong)volwassen muizen en niet-volwassen ratten (tot 150 g) ook cervicale dislocatie gebruikt worden.

Ja > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Indien dieren worden gedood, maar niet in het kader van de proef, geef aan of herplaatsing is overwogen en waarom hiervan is afgezien.

NIET-TECHNISCHE PROJECTSAMENVATTING

Naam van het project	Onderzoeken van de verdeling van potentiële nieuwe geneesmiddelen en hun effecten in het lichaam
NTS-identificatiecode	NTS-NL-430248 v.1, 25-01-2022
Land	Nederland
Taal	nl
Duur van het project, uitgedrukt in maanden.	60
Trefwoorden	distributie en effectiviteit farmacokinetiek farmacodynamiek
Doel(en) van het project	Omzettinggericht en toegepast onderzoek: Kanker bij de mens Omzettinggericht en toegepast onderzoek: Besmettelijke ziekten van de mens Omzettinggericht en toegepast onderzoek: Cardiovasculaire aandoeningen bij de mens Omzettinggericht en toegepast onderzoek: Zenuwziekten en psychische aandoeningen van de mens Omzettinggericht en toegepast onderzoek: Respiratoire aandoeningen bij de mens Omzettinggericht en toegepast onderzoek: Gastro-intestinale en leveraandoeningen bij de mens Omzettinggericht en toegepast onderzoek: Spier- en botaandoeningen bij de mens Omzettinggericht en toegepast onderzoek: Verstoringen van het immuunstelsel bij de mens Omzettinggericht en toegepast onderzoek: Aandoeningen van het urogenitaal / voortplantingsstelsel bij de mens Omzettinggericht en toegepast onderzoek: Aandoeningen van zintuigorganen (huid, ogen en oren) bij de mens Omzettinggericht en toegepast onderzoek: Endocriene en metabolismestoringen bij de mens Omzettinggericht en toegepast onderzoek: Andere aandoeningen van de mens Omzettinggericht en toegepast onderzoek: Diagnose van ziekten

5

DOELSTELLINGEN EN VERWACHTE VOORDELEN VAN HET PROJECT

Beschrijf de doelstellingen van het project (bijvoorbeeld het aanpakken van bepaalde wetenschappelijke onduidelijkheden, of wetenschappelijke of klinische behoeften).	<p>Veel ziektes bij mensen zijn nog niet goed te behandelen of te genezen. Efficiënte ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen blijft dus nodig. Binnen onze instelling doen wij onderzoek om onze opdrachtgevers te ondersteunen bij de ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen. Hierbij kan het gaan om potentiële geneesmiddelen tegen bijvoorbeeld een bepaalde soort kanker, tegen een hersenziekte of een immuunziekte, maar ook tegen andere ziektes. In ons onderzoek testen we stoffen om uit te zoeken of deze een nieuw geneesmiddel kunnen worden. Daarbij zijn belangrijke resultaten of een teststof op de juiste plek in het lichaam komt en of de teststof daar de gewenste effecten heeft. Onder deze projectaanvraag willen we informatie verzamelen over de verdeling van de teststof in het lichaam (bio-distributie en/of farmacokinetiek) en over de werkzaamheid van de teststof (farmacodynamiek). Daarnaast kan kennis verkregen worden van eventuele ongewenste effecten.</p> <p>Een voorbeeld van een studie die we onder deze projectaanvraag voor onze opdrachtgevers kunnen doen, is om te onderzoeken of een teststof tegen tumorgroei als die via de mond ingenomen wordt (door te slikken, de voorkeursweg voor het toedienen van medicijnen) daadwerkelijk in tumorweefsel terechtkomt. Het direct toedienen in de tumor is in patiënten vaak niet mogelijk, maar het nieuwe geneesmiddel zal hier wel moeten kunnen komen om de tumorgroei af te remmen of terug te dringen. Een ander voorbeeld is of een teststof die direct in de hersenen toegediend wordt, in de hersenen werkzaam is en blijft, of dat de teststof in een ander orgaan als bijvoorbeeld de lever terechtkomt.</p> <p>De door ons onderzoek vergaarde kennis is voor onze opdrachtgevers essentieel om weloverwogen beslissingen te nemen over verdere ontwikkeling van hun teststoffen tot nieuwe geneesmiddelen.</p>
Welke potentiële voordelen kan dit project opleveren? Leg uit	Informatie die we in dit project verzamelen, helpt onze opdrachtgevers om te besluiten welke potentiële nieuwe geneesmiddelen te selecteren en hoe deze verder te ontwikkelen. Deze informatie

hoe de wetenschap vooruit kan worden geholpen of mensen, dieren of het milieu uiteindelijk voordeel kunnen hebben bij het project. Maak, waar van toepassing, een onderscheid tussen voordelen op korte termijn (binnen de looptijd van het project) en voordelen op lange termijn (die mogelijk pas worden bereikt nadat het project is afgerond).

is van belang als eerste stap in de uiteindelijke toelating van nieuwe geneesmiddelen op de markt. Door dit onderzoek kan het daaropvolgende en voor registratie wettelijk vereist onderzoek doelgerichter en met minder dieren worden uitgevoerd.

VOORSPELDE SCHADE

<p>In welke procedures worden de dieren gewoonlijk gebruikt (bijvoorbeeld injecties, chirurgische procedures)? Vermeld het aantal en de duur van deze procedures.</p>	<p>De procedures in dit project zijn opgesplitst in twee varianten: 1 Het verzamelen van kleine hoeveelheden vloeistof (monsters) over tijd met behulp van buisjes: de dieren gaan onder verdoving voor het plaatsen van de buisjes. Soms worden er voorafgaand cellen onder de huid geplaatst voor tumormodellen. De dieren krijgen een of meerdere keren een teststof toegediend. Via de buisjes worden gedurende een dag tot maximaal twee maanden verschillende vloeistofmonsters verzameld. 2 Het observeren over langere tijd om effecten van teststoffen te bepalen: de dieren krijgen al dan niet onder verdoving een teststof toegediend en worden voor maximaal vijf maanden gevolgd. In die tijd worden de dieren regelmatig geobserveerd op welzijn en gedrag.</p>																						
<p>Wat zijn de verwachte gevolgen/nadelige effecten voor de dieren, bijvoorbeeld pijn, gewichtsverlies, inactiviteit/verminderde mobiliteit, stress, abnormaal gedrag, en wat is de duur van die effecten?</p>	<p>Tijdens de operatie wordt geen ongerief verwacht, want deze wordt onder algehele verdoving en met passende pijnstilling uitgevoerd. Daarna zal er door het bijkomen sprake zijn van matig ongerief. Na het plaatsen van buisjes kunnen de dieren hiervan licht tot matig ongerief ondervinden. Om de buisjes zoveel mogelijk intact te houden, moeten de dieren na de operatie individueel gehuisvest worden. De toediening van de teststof en het verzamelen van kleine hoeveelheden vloeistof kunnen licht ongerief veroorzaken. Dieren met een tumor ondervinden daar in principe geen extra ongerief van. In uitzonderlijke gevallen kan de bewegingsvrijheid beperkt zijn door de grootte van de tumor en zal er licht ongerief optreden.</p>																						
<p>Welke soorten en aantallen dieren zullen naar verwachting worden gebruikt? Wat zijn de verwachte ernstgraden en de aantallen dieren in elke ernstcategorie (per soort)?</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Soort:</th> <th rowspan="2">Totaal aantal</th> <th colspan="4">Geraamde aantallen naar ernstgraad</th> </tr> <tr> <th>Terminaal</th> <th>Licht</th> <th>Matig</th> <th>Ernstig</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Muizen (<i>Mus musculus</i>)</td> <td>5500</td> <td>150</td> <td>1275</td> <td>4075</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>)</td> <td>3500</td> <td>150</td> <td>675</td> <td>2675</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>	Soort:	Totaal aantal	Geraamde aantallen naar ernstgraad				Terminaal	Licht	Matig	Ernstig	Muizen (<i>Mus musculus</i>)	5500	150	1275	4075	0	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>)	3500	150	675	2675	0
Soort:	Totaal aantal			Geraamde aantallen naar ernstgraad																			
		Terminaal	Licht	Matig	Ernstig																		
Muizen (<i>Mus musculus</i>)	5500	150	1275	4075	0																		
Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>)	3500	150	675	2675	0																		
<p>Wat gebeurt er met de dieren die aan het einde van de procedure in leven worden gehouden?</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Soort:</th> <th colspan="3">Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren</th> </tr> <tr> <th>Hergebruikt</th> <th>Teruggeplaatst</th> <th>Geadopteerd</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td> </td> <td> </td> <td> </td> <td> </td> </tr> </tbody> </table>	Soort:	Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren			Hergebruikt	Teruggeplaatst	Geadopteerd															
Soort:	Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren																						
	Hergebruikt	Teruggeplaatst	Geadopteerd																				
<p>Geef de redenen voor het geplande lot van de dieren na de procedure.</p>	<p>Na afloop van de studies zullen de dieren onder verdoving gedood worden. Verschillende organen, weefsels en/of bloed worden verzameld om het gehalte en/of de effecten van de teststof daar te bepalen. Als een buisje was geplaatst, wordt de locatie van de buisjes bevestigd.</p>																						

TOEPASSING VAN DE DRIE V'S

<p>1. Vervanging Beschrijf welke diervrije alternatieven op dit gebied voorhanden zijn en waarom zij niet voor het project kunnen worden gebruikt.</p>	<p>Diervrije alternatieven worden wel gebruikt om verschillende eigenschappen van de teststoffen te onderzoeken. Op het moment kan nog geen van deze methodes de informatie geven die we in deze experimenten verzamelen en die essentieel is voor de verdere ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen.</p> <p>Om te onderzoeken hoe een stof zich door het lichaam verdeelt en welke effecten op verschillende plekken in het lichaam te zien zijn, kunnen deze tests alleen in een levend dier gedaan worden. De te meten waarden en effecten worden namelijk bepaald en beïnvloed door de doorbloeding van de organen en wisselwerkingen tussen de verschillende organen.</p>
<p>2. Vermindering Leg uit hoe de aantallen dieren voor dit project zijn bepaald. Beschrijf de stappen die zijn genomen om het aantal te gebruiken dieren te verminderen en de beginselen die zijn gebruikt bij het opzetten van de studies. Beschrijf, waar van toepassing, de praktijken die gedurende het hele project zullen worden toegepast om het aantal dieren die in overeenstemming met de wetenschappelijke doelstellingen werden gebruikt, tot een minimum te beperken. Deze praktijken kunnen bijvoorbeeld bestaan uit proefprojecten, computermodellen, het delen van weefsel en hergebruik.</p>	<p>Bij de opzet van elke studie wordt de groepsgrootte zorgvuldig uitgekozen, om uit zo min mogelijk dieren de benodigde informatie te verkrijgen.</p> <p>Door middel van de resultaten uit eerdere studies en resultaten bijvoorbeeld verkregen door proeven zonder gebruikmaking van dieren worden er beslissingen gemaakt zodat er bij de dierproeven minder groepen getest hoeven worden.</p> <p>Door het gebruik van buisjes voor herhaalde verzameling van kleine hoeveelheden vloeistof in plaats van deze alleen te verzamelen na opofferen, bereiken we een belangrijke vermindering van het aantal proefdieren.</p> <p>Tenslotte worden meetmethodes continu verbeterd om in de kleine hoeveelheden verzamelde vloeistof steeds meer gegevens te kunnen bepalen.</p>
<p>3. Verfijning Geef voorbeelden van de specifieke maatregelen (bv. verscherpte monitoring, postoperatieve behandeling, pijnbestrijding, training van dieren) die in verband met de procedures moeten worden genomen om de welzijnskosten (schade) voor de dieren tot een minimum te beperken. Beschrijf de mechanismen om gedurende de looptijd van het project nieuwe verfijningstechnieken in gebruik te nemen.</p>	<p>De operaties worden onder algehele verdoving en met passende pijnstilling uitgevoerd. Er is nazorg voor het herstellende dier. De geopereerde dieren worden zoveel mogelijk samen gehuisvest en als dat niet mogelijk is, zodanig dat ze elkaar kunnen horen, zien, en ruiken.</p> <p>Er wordt gebruik gemaakt van een werkvoorschrift voor herkenning en beoordeling van ongerief, waar nodig wordt op passende wijze ingegrepen om verder ongerief te voorkomen. De vaardigheid in het uitvoeren van biotechnische handelingen en chirurgische ingrepen wordt goed getraind en bijgehouden.</p> <p>Bij afname via een buisje hoeven de dieren niet meerdere keren aangeprikt te worden om meerdere keren kleine hoeveelheden vloeistof te verzamelen.</p>
<p>Licht de keuze van de soorten en de bijbehorende levensstadia toe</p>	<p>Muizen en ratten hebben een met mensen vergelijkbare fysiologie en zijn daarom geschikt om de verdeling en effecten van potentiële nieuwe geneesmiddelen te onderzoeken. Per teststof, doelziekte en vraagstelling wordt steeds bekeken welke van de diersoorten op welke leeftijd het best passende antwoord kan geven op de onderzoeksvraag. Zo treden sommige ziektes al heel vroeg in het leven op, zijn grotere dieren beter geschikt voor het plaatsen van meerdere buisjes, en is er soms al vooronderzoek gedaan of vervolgonderzoek gepland met een specifieke diersoort.</p>

VOOR EEN BEOORDELING ACHTERAF GESELECTEERD PROJECT

Project geselecteerd voor BA?	nee
Termijn voor BA	
Reden voor de beoordeling achteraf	
Bevat ernstige procedures	
Maakt gebruik van niet-menselijke primaten	
Andere reden	
Toelichting van de andere reden voor de beoordeling achteraf	

AANVULLENDE VELDEN

Link naar de eerdere versie van de NTS buiten het EC-systeem	
--	--

Advies 5.1 lid2h

A. Algemene gegevens over de procedure

1. **Aanvraagnummer:** AVD 5.1 lid2h 2021 15538
2. **Titel van het project:** Evaluatie van biodistributie, farmacokinetiek en farmacodynamiek van potentiële nieuwe geneesmiddelen
3. **Titel van de NTS:** Onderzoeken van de verdeling van potentiële nieuwe geneesmiddelen en hun effecten in het lichaam
4. **Type aanvraag:**
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
 - wijziging van vergunning met nummer
5. **Contactgegevens DEC:**
 - naam DEC: 5.1 lid2h
 - telefoonnummer contactpersoon: 5.1 lid2h
 - e-mailadres contactpersoon: 5.1 lid2h
6. **Adviestraject (data dd-mm-jjjj):**
 - ontvangen door DEC: 28/10/21
 - aanvraag compleet: 28/10/21
 - in vergadering besproken: 10/11/21
 - anderszins behandeld:
 - termijnonderbreking(en) van 15/11/21-26/11/21 en 5/12/21-8/12/21
 - besluit CCD tot verlenging adviestermijn met max. 15 werkdagen: n.v.t.
 - aanpassing aanvraag: 26/11/21 en 8/12/21
 - advies aan CCD: 13/12/21
7. **Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.** De aanvraag is afgestemd met, en heeft instemming van de IvD.
8. **Eventueel horen van aanvrager:** N.v.t.
 - Datum:
 - Plaats:
 - Aantal aanwezige DEC-leden:
 - Aanwezige (namens) aanvrager:
 - Gestelde vraag/vragen:
 - Verstrekt(e) antwoord(en):
 - Het horen van de aanvrager heeft wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag
9. **Correspondentie met de aanvrager**
 - Datum: 15/11/21 en 5/12/21
 - Gestelde vraag/vragen: zie beneden, tweede ronde gemarkeerd met geel
 - Datum antwoord: zie beneden
 - Verstrekt(e) antwoord(en): zie beneden
 - 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

Vragen en antwoorden:

Zwart = vraag; blauw = antwoord; geel = tweede ronde vragen (doorvragen op vragen)

Projectvoorstel

1. Het huidige voorstel is een vervolg op de vergunning AVD 5.1 lid2h . Kunt u aangeven hoeveel experimenten en hoeveel dieren er in de voorgaande vergunning zijn gebruikt in relatie tot het aantal aangevraagde dieren, en wat het ongerief was van de gebruikte dieren (percentages per klasse ongerief/diersoort)? Indien het ongerief afwijkt van de vergunning zou u dit dan willen toelichten?

De dieraantallen en ongeriefsscores worden elk jaar teruggekoppeld aan de CCD en gerapporteerd aan de NVWA. De afgelopen jaren hebben we per jaar 15 tot 20 studies onder AVD 5.1 lid2h uitgevoerd. In deze vergunning zijn momenteel ongeveer 90% van de aangevraagde dieren gebruikt. De percentages ongerief per diersoort staan in onderstaande tabel. De 0.5 – 1% van de dieren waarbij de categorie matig werd overschreden hadden als ongeriefsscore 'ernstig'.

score	1	2	3	4
muis	2%	33%	65%	1%
rat	4%	58%	38%	0.5%

1: vanwege HEP of overlijden onder anesthesie tijdens operatie, zonder ongerief

4: vanwege HEP of overlijden tijdens experiment en niet aantoonbaar zonder lijden

2. U geeft aan studies te verrichten voor klanten. Hanteert u toegangscriteria waaraan een voorstel moet voldoen om door u uitgevoerd te worden (bijv. data van voorgaande studies)? In relatie daarmee: hoe kunt u voorkomen dat dieren ernstig ongerief door mogelijke bijwerkingen ondergaan?
De onderzoeker stemt de vraagstellingen met de klant af en stelt een studie-opzet voor. Daarbij worden de al bekende eigenschappen van de teststof en beschikbare achtergrondinformatie in aanmerking genomen. Doses van de teststof worden gekozen op basis van de beoogde therapeutische dosis en eventueel al beschikbare farmacodynamische informatie om te voorkomen dat er bijwerkingen optreden. Als er in een eerder stadium door de klant al farmacokinetische studies zijn gedaan, worden deze gegevens ook meegenomen. De opzet van iedere studie wordt in samenspraak tussen onderzoeker en klant vastgesteld. De onderzoeker zal daarbij de klant informeren over de haalbaarheid van een studieontwerp. Als de klant akkoord is met het door de onderzoeker ontworpen studievoorstel dan zal het voorstel aan de IvD worden voorgelegd. Deze zal beoordelen of het voorstel past binnen de vergunning en zal het toetsen op basis van de wet op de dierproeven (art 10.1.3). Als de IvD van mening is dat het voorstel niet past binnen de toetsingskaders, dan zal de onderzoeker de vraag van de klant afwijzen

of aangeven hoe een studie op basis van de vergunning wel kan worden uitgevoerd. Het advies van de IvD is doorslaggevend of een studie kan worden uitgevoerd of moet worden aangepast.

3. U schrijft dat "er met weinig dieren veel resultaten zijn bereikt". De DEC vraagt zich af of u/uw bedrijf de reductie van proefdiergebruik belangrijker vindt dan vermindering van ongerief. Het gaat voor de DEC om een afweging van Vermindering versus Verfijning. Er is daardoor een spanningsveld tussen die 2 V's. Kunt u aangeven hoe u omgaat met dit dilemma?

Zowel het verminderen van het aantal dieren als het verminderen van ongerief heeft in elke studie-opzet onze gelijke aandacht. Afhankelijk van de vraagstelling wordt er gekozen voor canulatie om meerdere kleine monsters te verzamelen (bijlage 1), of geen canulatie en enkele monsters afnemen (bijlage 2).

De canulaties en microdialyse dragen niet alleen bij aan vermindering maar ook aan verfijning. Door het uitvoeren van een operatie en het bijkomen uit de anesthesie hebben de dieren weliswaar direct een matig ongerief. Deze operaties worden uitgevoerd door goed getraind personeel, extra mogelijkheden tot verfijning worden hier ook opgemerkt en toegepast. Door een katheter in een bloedvat vermijden we een groot deel van het ongerief door telkens hanteren, (mild) fixeren en aanprikken voor de afname van de bloedmonsters. Ook tijdens de microdialyse worden (doorlopend) monsters genomen in het vrij bewegende dier zonder dat het dier daarvoor telkens gehanteerd en aangeprikt moet worden. Naar onze mening is een canulatie bij meer dan enkele monsters al een ongeriefbesparende ingreep.

4. Bij het wetenschappelijk belang (3.3) noemt u een aantal opbrengsten van het project waarvan voor de DEC niet duidelijk is hoe deze voor u verkregen kunnen worden uit de beschreven experimenten in dit voorstel. Het gaat om het verkrijgen van 'inzicht in onderliggende ziekteprocessen' en 'inzicht in complexe biologische interacties'. Kunt u dit toelichten?

In studies waarin de teststof ook een bekende receptor (ant)agonist als referentiestof toegediend wordt, kan hiermee informatie over het werkingsmechanisme van de teststof verkregen worden. Door middel van het meten van biomarkers en interacties tussen biomarkers, krijgen we inzicht in de onderliggende (ziekte-)processen.

5. U noemt in het projectvoorstel verschillende ziektemodellen. De DEC leest in de bijlagen tumormodellen terug. Kunt u bevestigen dat het voor de geïnduceerde modellen alleen om de in bijlage 1 vermelde tumormodellen gaat?

In bijlage 1 gaat het momenteel inderdaad om tumormodellen als geïnduceerde modellen. Eventuele andere toekomstige ziektemodellen hangen af van de vraagstelling van onze klanten. Afhankelijk van het gevraagde model zal, na overleg met de IvD, een melding worden gedaan of een wijziging worden aangevraagd. Zoals bij D. punt 4 beschreven, zal de te verwachten intrinsieke welzijnsaantasting van een te introduceren model niet meer dan 'licht' mogen zijn.

6. In bijlage 2 noemt u genetisch gemodificeerde muizen die kennelijk door de genetische wijziging model staan voor bepaalde ziekten. U dient een opsomming te geven van typen ziektemodellen en aan te geven wanneer een ziektemodel

gepaard gaat met ziekteverschijnselen. Is er sprake van ziekteverschijnselen: wat is het bijbehorend ongerief en verwacht u dat daar HEP's bij toegepast moeten worden? Zo ja, dan dient u de criteria daarvoor nog toe te voegen.

Voor bijlage 2 vragen we nu alleen het gebruik van MJD84.2 dieren (de ziekte van Machado-Joseph) aan. Zoals onder 2B in de tabel aangegeven: Deze dieren worden ingezet voordat symptomen optreden, waarbij de behandeling erop gericht is om **de genetische modificatie te herstellen** en daarmee de symptomen te voorkomen. Deze genetisch gewijzigde muizen zijn op de jongere leeftijd waarop ze worden ingezet levensvatbaar, vruchtbaar, van normale grootte en vertonen geen sterke fysieke of gedragsafwijkingen. Daardoor is in dit model, voordat symptomen optreden, geen intrinsiek ongerief te verwachten en zijn geen modelspecifieke HEPs gedefinieerd.

Eventuele andere toekomstige ziektemodellen hangen net als bij vraag 5 af van de vraagstelling van onze klanten. Afhankelijk van het gevraagde model zal, na overleg met de IvD, een melding worden gedaan of een wijziging worden aangevraagd. Zoals bij D. punt 4 beschreven, zal de te verwachten intrinsieke welzijnsaantasting van een te introduceren model niet meer dan 'licht' mogen zijn. **Het lijkt de DEC onmogelijk om op deze wijze de genetische modificatie te herstellen. Bedoelt u dat u de symptomen geassocieerd met de genetische modificatie denkt te kunnen voorkomen? Zou u een eventuele onjuistheid uit de bijlagetekst kunnen halen en kunnen corrigeren?**

Inderdaad is het doel om de symptomen geassocieerd met de genetische modificatie te voorkomen. Dit is nu aangepast in de tekst van bijlage 2.

Bijlage 1

7. U schrijft bij 2.A: "Hierdoor kan bij ieder dier tot maximaal 3 compartimenten herhaald bemonsterd worden. In het vrij bewegende dier is dit met weinig bijkomend ongerief." Voor het ongerief maakt het uit welke compartimenten dat zijn. Een combinatie van het afnemen van ruggenmergsvocht en levermateriaal zal meer dan licht ongerief veroorzaken. Kunt u dit verhelderen?

Het is hierbij belangrijk om het onderscheid tussen het afnemen van vloeistofmonsters door een canule of katheter en de monsters die met microdialyse verzameld worden. In het eerste geval wordt inderdaad vloeistof aan het dier onttrokken. Het principe van (micro)dialyse is dat er netto juist geen vloeistof wordt onttrokken. Een iso-osmotische vloeistof wordt met tot enkele microliters per minuut de probe ingevoerd en komt daar ook weer uit om als monster opgevangen te worden. Onderweg vindt molecuuluitwisseling met de extracellulaire vloeistof in/rond het weefsel plaats waarin de probe geplaatst is. De openingen in het membraan (of eventueel de canule) worden zo gekozen dat de moleculen die we willen meten (variërend van kleine moleculen tot grote eiwitten) het membraan kunnen passeren, maar cellen niet. Bij microdialyse in bijvoorbeeld ruggenmerg of lever wordt dus geen ruggenmergsvocht of levermateriaal afgenomen. Het plaatsen van de canule/probe is invasief, microdialyse zelf is dat nauwelijks: *minimally-invasive*.

Daarom blijven wij bij onze ongeriefinschatting.

Bedankt voor de toevoeging. Wij denken u te begrijpen. Echter, de formulering in de bijlage is nog niet nog niet voldoende duidelijk. Kunt u deze aanpassen en uitsluiten dat een dier bijvoorbeeld 3 verschillende canules of probes zou kunnen dragen?

De tekst bij 2.A. is nu aangevuld. Zoals op bladzijde 3 van bijlage 1 genoemd: Bij muizen kunnen maximaal twee canules per dier geplaatst worden, bij ratten zijn dat er maximaal drie per dier.

8. Bij inoculatie met tumorcellen:

a) U noemt de muis het meest *relevante* organisme, maar de DEC vermoedt dat u bedoelt dat dit het meest geschikte model is? Zo niet, kunt u dan toelichten waarom de muis het meest relevante organisme is voor onderzoek van humane medicijnen?

Inderdaad, de muis is het meest geschikte model. Dit is aangepast in de tekst.

b) De DEC vermoedt dat het hier uitsluitend gaat over humane tumoren. Kunt u dit toelichten?

Onder deze aanvraag kunnen zowel studies met humane tumoren als met syngenetische (muizen-) tumoren uitgevoerd worden.

c) Geïnoculeerde dieren kunnen door een externe partij worden geleverd. Kunt u uitleggen hoe u weet dat de uitvoerende partij voldoende kennis en kunde bezit?

Deze externe partij is onze zusterlocatie in **5.1 lid 2H** met oncologische experts die verderop in de bijlage ook genoemd wordt. Dit hebben we nu in de tekst toegevoegd.

9. U beschrijft dat er opfrustrainingen gedaan zullen worden als de technieken niet routinematig worden uitgevoerd. Ook voor de benoemde canuleroutes geldt dat er met 25 van dit soort operaties per jaar per route niet echt routine opgebouwd wordt. In hoeverre gelden de opfriscursussen ook voor de 'routine'-routes?

Voor aanvang van elke studie wordt bekeken welke biotechnici beschikbaar zijn voor de operaties en of deze voldoende routine met de benodigde operatietechniek(en) hebben. Is dit onvoldoende het geval, dan wordt de bewuste procedure inderdaad onder AVD **5.1 lid 2H** 202114908 eerst getraind op een of enkele dieren. Algemeen worden enkele trainingssessies per jaar gepland om operatietechnieken die niet regelmatig (gedurende het jaar) uitgevoerd worden, te onderhouden. Hieronder vallen ook de 'routine-routes'. Sommige van de operatietechnieken binnen deze aanvraag (bijvoorbeeld canulatie van de vena jugularis of cisterna magna) worden ook in andere projectvergunningen toegepast, en daardoor is de routine van de biotechnici niet alleen afhankelijk van studies binnen de huidige projectaanvraag.

10. U schrijft: "andere locaties kunnen ook gecannuleerd worden en deze zullen als een 'Melding' worden doorgegeven". De DEC neemt aan dat u hiermee een melding aan de CCD bedoeld i.v.m. een gewijzigde route. De DEC merkt op dat u niet aangeeft welke andere routes dit zouden kunnen zijn. Indien u een "andere locatie" zou willen gebruiken, mag deze nieuwe locatie geen ernstig ongerief veroorzaken omdat er dan een wijziging noodzakelijk is. Inderdaad is hier een melding aan de CCD bedoeld. Een melding is uiteraard alleen van toepassing als de nieuwe operatietechniek volgens onze IvD niet meer ongerief oplevert dan binnen deze aanvraag past (matig). Daarom is de tekst nu aangepast: "Zodra deze volledig ontwikkeld zijn, goedgekeurd zijn door de IvD en toegepast kunnen worden, *zullen we na overleg met de IvD, een melding of aanvraag tot wijziging indienen om de nieuwe operatietechniek toe te voegen.*"

11. Op pg.3, punt 4 schrijft u "Waar mogelijk." De omschrijving is vaag en laat veel mogelijkheden open. Waar zou het niet mogelijk zijn?

Op pagina 3, punt 4 gaat het erover dat de dieren na operatie en canulatie weliswaar individueel (om beschadiging van elkaars canules te voorkomen) maar zoveel mogelijk zodanig gehuisvest worden dat ze elkaar kunnen horen, zien en ruiken. Inderdaad is dit onze standaard, en hebben we dit in de tekst aangepast.

12. Op pg.4, klinische observatie. Kunt u toevoegen wat de observatiefrequentie zal zijn?

De observatiefrequentie varieert tussen individuele studies en is daarom niet in de tekst opgenomen. De frequentie is onder andere afhankelijk van de vraagstelling van de klant, de monsterfrequentie en de bekende eigenschappen van de teststof. Bij een microdialyse-studie met 30-minuten monsters zullen de dieren minstens ieder half uur gezien worden, terwijl bij een studie waarbij het gewicht van belang is de dieren meerdere keren per week gewogen kunnen worden. Deze observaties komen bovenop de standaard dagelijkse monitoring van alle dieren.

Hoe past u de observatiefrequentie ook aan na chirurgische ingrepen? Kunt u hierover duidelijkheid geven, niet alleen hier, maar ook in de bijlage?

Nadat de dieren uit de anesthesie zijn bijgekomen en in de experimentele kooien gehuisvest zijn, worden ze op de dag van de operatie nog minstens een keer geobserveerd.

Afhankelijk van de ingreep en de daarbij behorende analgesieprocedure stemmen wij onze observatiefrequentie af. Bij een ingreep waarbij de analgesie langer duurt dan een dag, worden de dieren 's ochtends, 's middags en 's avonds geobserveerd om het dierenwelzijn te waarborgen. Omdat we de chirurgische ingrepen volgens standaardprocedures uitvoeren, is in bijna alle gevallen verdere observatie niet nodig.

Dit is ook toegevoegd in de tekst van bijlage 1.

13. De DEC kan het ongerief door de bloedafnames niet goed genoeg inschatten. U geeft aan naast de katheters ook de aangezichtsvene bij de muis te gebruiken. Tevens geeft u aan maximaal 8 maal per 24 uur bloed af te nemen. Kunt u toelichten welke route u gebruikt bij 8 bloedafnames per dag?

Bij 8 bloedafnames per dag wordt er een katheter geplaatst.

De DEC vindt dit nog steeds te vaag, en het is niet aangepast in de bijlage. Wat doet u dan bij bijvoorbeeld 6 of 7 bloedafnames per dag? Kunt u dit heel duidelijk inkaderen en vermelden in de bijlage?

De wijze van bloedafname wordt per studie in de ontwerpfase beoordeeld, en is gebaseerd op het minimaliseren van het ongerief voor de dieren. Factoren die in de overweging meegenomen worden zijn de geplande duur van de studie, het aantal monsters gedurende de hele studie en per dag en tenslotte de aanwezigheid van eventuele andere canules.

Omdat alle bovengenoemde aspecten meegenomen worden in onze afweging, is uw vraag om dit heel duidelijk in te kaderen niet eenduidig te beantwoorden. Bij alle studieontwerpen zijn de richtlijnen van Diehl leidend, zoals ook vermeld in de bijlagen.

Bij bijvoorbeeld 6 of 7 bloedafnames na een acute orale toediening en termineren aan het einde van de studie op dezelfde dag, zal er geen operatie voor een katheter worden uitgevoerd. Het ongerief van de operatie zou hier groter zijn dan het ongerief ten gevolge van het bemonsteren.

Bij bijvoorbeeld 6 of 7 bloedafnames op één dag tijdens een microdialyse-experiment zal er wel een katheter geplaatst worden, aangezien dit gecombineerd kan worden met de plaatsing van de microdialyseprobe en dus geen extra ongerief oplevert, terwijl het ongerief door het hanteren tijdens het bemonsteren vervalt.

14. U geeft aan dat in sommige experimenten de bloedafname kan afwijken van de richtlijnen in Diehl (2001). In principe gaat de DEC ervan uit dat Diehl leidend zal zijn. Zij zal dat ook in het advies opnemen, tenzij u kunt aangeven in maximaal hoeveel dieren u hiervan af zult wijken. Kunt u ook bij onderdeel F beter beschrijven hoe het ongerief van de bloedafname in dat geval ingeschat moet worden (mogelijk matig)?

Inderdaad is Diehl leidend. Volgens Diehl kan tot 20% van het bloedvolume afgenomen worden "without significant disturbance to an animal's normal physiology". Volgens onze interne richtlijn blijven we bij voorkeur onder de 10%, met een absoluut maximum van 15% per 24 uur en van 20% over verschillende dagen verdeeld. Een afwijking (verfijning: vermindering van het ongerief) ten opzichte van Diehl is dat we in gevallen waar het afgenomen volume de 10% overschrijdt, wij wél vervangende vloeistof geven om het ongerief voor het dier te verminderen. Herstelperiodes zoals door onze IvD opgesteld zijn zoals aangegeven (in de rechterkolom van) Tabel 4 van Diehl. In overeenstemming met Diehl heeft het onze voorkeur om herhaalde afnames via een katheter te doen. Daarom blijven wij bij onze ongeriefinschatting.

15. Bij afname van 10-20 % bloed en substitutie door een andere vloeistof (bijv. fysiologisch zout) zal de hematocriet flink wijzigen. Heeft dat invloed op de bloedparameters die u in die periode zult bepalen?

Als eerste willen we opmerken dat de bloedafnames bij verreweg de meeste studies onder de 10% van het bloedvolume blijven. Indien het nodig is in de opzet van de studie, kan 10-20% van het bloedvolume afgenomen worden. In deze gevallen wordt dit met de klant besproken en ook of dit van invloed op de te meten parameters zal zijn.

16. Bij de statistische methoden schrijft u: "Op basis van onze ervaringen in het verleden ligt de uitval na operatie rond de 5% en 25% bij de meest complexe ingrepen (bijvoorbeeld de plaatsing van een microdialyseprobe in het ruggenmerg)." De DEC vindt dit een hoog percentage, zeker na zoveel jaren ervaring. Kunt u toelichten wat de reden is? Is dit vergelijkbaar met de praktijk bij anderen? En worden dieren direct bij de operatie gedood of komen dieren bij en worden ze later gedood? Calculeert u deze uitval in? Wat gebeurt er met de dieren die niet gebruikt worden als de uitval meevalt? Waarom kiest u voor deze werkwijze als het percentage niet verlaagd kan worden? Weegt deze uitval op tegen het gebruik van dieren zonder deze canules op meerdere tijdstippen (qua aantal en ongerief)? Ook met ervaring blijft het risico op beschadiging van het ruggenmerg aanwezig. Wat anders is dan bij veel andere locaties, betekent het bij de ruggenmerg-probe direct een HEP i.v.m.

verlamming. Als het voor het beantwoorden van de wetenschappelijke vraag niet nodig is om monsters af te nemen uit een wakker en vrij bewegend dier, dan wordt er bemonsterd onder anesthesie en is deze uitval er niet. Voor zover ons bekend zijn wij de enige groep die de T13-microdialyseprobe in het vrij bewegende dier kunnen toepassen. Als de onderzoekers en/of biotechnici een potentieel nieuwe aanpak hebben voor het plaatsen van deze probe waarmee de uitval verminderd zou kunnen worden, dan wordt deze techniek eerst in de ontwikkelvergunning AVD ^{5.1 lid 2f} 202114908 geverifieerd.

Als tijdens het inbrengen van de canule de ademhaling onregelmatig wordt of zenuwen samentrekken is dit een indicatie dat het ruggenmerg beschadigd is en wordt een humaan eindpunt toegepast. Soms treden verlamningsverschijnselen op zonder deze indicatie tijdens het inbrengen van de canule. Deze kunnen dan pas na het bijkomen uit de anesthesie geobserveerd worden en in deze gevallen zal het humane eindpunt pas na het bijkomen toegepast kunnen worden. Aangezien de meeste verlamningsverschijnselen tijdens de operatie al kunnen worden geobserveerd, levert dit geen ongerief op en worden deze dieren als 'terminaal' gescoord.

Bij de dierbestelling wordt met uitval rekening gehouden. Dieren die niet gebruikt worden, kunnen ingezet worden in andere studies. Daarnaast kunnen de dieren worden gebruikt om technieken te trainen, onderhouden of ontwikkelen onder AVD ^{5.1 lid 2f} 202114908.

Als 75% van de dieren goed bijkomt na de operatie, zonder verlamningsverschijnselen, kunnen er monsters worden verkregen waarmee informatie vergaard kan worden die niet op een andere manier kan worden verkregen. Daarbij worden door middel van microdialyse meerdere monsters uit hetzelfde dier genomen, waarin ieder dier zijn eigen controle is door middel van basale monsters.

17. Bij pg.6, levensstadia: canuleplaatsing bij jongvolwassen dieren kan door de verdere uitgroei van het dier tot problemen leiden doordat de canule niet meegroeit. Kunt u hierover kort uitweiden?

Het merendeel van de microdialysestudies in bijlage 1 duurt enkele dagen. Microdialysebemonstering start meestal de dag na de plaatsing van de canule(s). Mocht er op latere tijdstippen monsterafname middels microdialyse gepland zijn uit bijvoorbeeld een tumor, dan wordt hiervoor een guide met dummy-stilet in plaats van direct een microdialyseprobe geplaatst.

Door canules in de vena jugularis of cisterna magna, kan in veel gevallen tot wel 2 maanden (de maximumtijd die we hier aanvragen) bemonsterd worden. Daarbij zien we maar weinig impact op de werking van de canule door de groei van de dieren. Deze worden dan ook meestal vanaf een leeftijd van 8 weken, bij voorkeur bij een gewicht van ~250-350 gram voor ratten en ~20-25 gram voor muizen geopereerd.

Kunt u kort uitleggen wat een "guide met dummy-stilet" is en waar deze toe dient?

Een guide-canule is een speciaal ontworpen houder, waarin precies een dummy stilet of een microdialyseprobe past. Door het gebruik van deze houder ontstaat de flexibiliteit om een probe op een later tijdstip te plaatsen en/of tussentijds te vervangen. De dummy-stilet wordt in de guide geplaatst zolang er geen probe in de guide zit, om de doorgang naar het weefsel af te sluiten.

18. Bij pg.6, levensstadia schrijft u: "...of juist pasgeboren dieren wanneer het gaat om een afwijking die vanaf de eerste levensdagen moet worden bestreden met een passende therapie." Dit betekent dat dieren worden gebruikt met een onderliggende ziekte. De DEC vindt hier niets van terug in de aanvraag: om welke ziektemodellen gaat het, wat is het te verwachten ongerief?

Deze pasgeboren dieren hoeven niet meteen een ziektemodel te zijn, om bijvoorbeeld de biodistributie van een teststof in pasgeboren dieren te bepalen. Het enige model dat we op dit moment aanvragen, is het gebruik van MJD84.2 dieren (de ziekte van Machado-Joseph) in bijlage 2.

Eventuele andere toekomstige ziektemodellen hangen net als bij vraag 5 af van de vraagstelling van onze klanten. Afhankelijk van het gevraagde model zal, na overleg met de IvD, een melding worden gedaan of een wijziging worden aangevraagd. Zoals bij D. punt 4 beschreven, zal de te verwachten intrinsieke welzijnsaantasting van een te introduceren model niet meer dan 'licht' mogen zijn.

19. Bij pg.6, geslacht: "De klant zal in dit geval moeten aangeven en onderbouwen..." Kunt u aangeven wat voor u doorslaggevende argumenten zijn om met één geslacht te werken en welke niet?

Geldige redenen om (in deze studies vroeg in het ontwikkelingstraject van kandidaatgeneesmiddelen) met één geslacht te werken zijn voor ons bijvoorbeeld om de vergelijkbaarheid met andere studies naar de teststof of in het werkveld veilig te stellen, bijvoorbeeld om de hormooncyclus te vermijden. Bij pasgeboren dieren worden in principe beide geslachten gebruikt, zodat het hele nest gebruikt kan worden. Voor tumorstudies worden over het algemeen vrouwelijke dieren gebruikt.

Dit geldt voor zowel bijlage 1 als bijlage 2.

Hoe gaat u om met de wetenschap dat de meeste medicaties voor menselijke vrouwen en mannen ingezet zullen worden? Waarom worden voor tumorstudies over het algemeen vrouwelijke dieren gebruikt? Is het feit dat is zo is, voldoende argumentatie voor u om hiermee door te gaan?

Omdat het bij alle studies die onder deze projectvergunning uitgevoerd zullen worden, gaat om "studies vroeg in het ontwikkelingstraject van kandidaatgeneesmiddelen", is de belangrijkste overweging vaak "om de vergelijkbaarheid met andere studies naar de teststof of in het werkveld veilig te stellen". Voor elke studie (inclusief tumorstudies) wordt vooraf altijd met de klant besproken wat de therapeutische indicatie is en of het meest passend is om mannelijke en/of vrouwelijke dieren in te zetten.

20. Bij statistische methoden: U geeft aan dat u uit het verleden ervaring heeft opgedaan met de benodigde groepsgroottes op basis van power-analyse en post-hoc-analyse. Kunt u toelichten of u dit blijft doen in de toekomstige studies? Zult u uw groepsgrootteberekeningen blijven toetsen met een poweranalyse op de meest recente/geschikte data?

Voor verschillende studie-parameters (bv. stabiele biomarkers) is de verwachte variatie bekend en is voor standaardstudies de benodigde groepsgrootte bepaald middels power-analyse. Bij deze parameters monitoren we of een nieuwe power-analyse noodzakelijk zou zijn.

Mocht een klant andere parameters willen meten, dan kunnen we met behulp met eventuele post-hoc analyse op historische data de groepsgrootte bepalen. Mochten er geen historische data beschikbaar zijn, dan kan eventueel een pilot-studie worden uitgevoerd om de variatie te bepalen voor een power-analyse.

Zou een dergelijke pilot-studie binnen deze aanvraag vallen?

Een pilotstudie om variatie in bv. biomarkers te bepalen in monsters die verkregen zijn uit dieren die volgens de procedures in deze aanvraag behandeld zijn, als voorbereiding op een studie binnen deze aanvraag, zou ook binnen deze aanvraag vallen. Zulke pilotstudies zullen zo opgezet worden dat eventuele uitbreiding mogelijk is en geen volledig nieuwe studie meer noodzakelijk zal zijn.

21. Bij pg.8, bullet 5: kunnen de geïnoculeerde tumoren ook metastaseren?

De geïnoculeerde tumoren zijn in principe solide tumoren, maar kunnen ook metastaseren. Deze aspecten worden per tumor beoordeeld samen met de experts in 5.1 lid2h

Zou ik in dit geval maar meer informatie willen toevoegen (hier en in de bijlage) over het metastaseren, zoals hoe u de dieren volgt en wat de welzijnsaantastingen en humane eindpunten zijn?

Hoewel een intrinsieke eigenschap van tumoren is dat ze kunnen metastaseren, varieert het metastatisch potentieel sterk tussen verschillende tumorlijnen. De groeikarakteristieken van de tumorlijnen die we gebruiken zijn bekend voordat we met het experiment beginnen.

Bovendien is de optimale tumorgrootte voor plaatsing van een canule 300-400 mm³ (blz. 2), wat voor de meeste tumoren het begin van de exponentiële groeifase is. Na plaatsing van de canule(s) worden de meeste experimenten met tumormodellen de volgende dag afgerond. Eventuele metastases worden in deze tijdsperiode niet verwacht.

Het ingeschatte ongerief van het hebben van een tumor staat bij F. Classificatie van ongerief (blz. 10). Bij E. Humane eindpunten hebben we toegevoegd: Mocht er gezwelvorming op een andere locatie dan de geïnoculeerde locatie gedetecteerd worden, wordt een humaan eindpunt toegepast.

22. Bij pg.9, na de operatie, 1e bullet: wat bedoelt u met "tevens wetenschappelijk eindpunt"?

Een dier waarvan na de operatie de probes, katheters of canules loskomen bereikt een HEP. Tevens is dit ook een wetenschappelijk HEP, er kunnen immers geen monsters meer verzameld worden, zelfs al zou het dier van het loskomen geen ongerief lijken te hebben.

23. Bij pg.9 schrijft u: "Bij een slechte conditie van het dier... in dezelfde week wordt afgerond."

Dit betekent dat een dier met mogelijk ernstig ongerief blijft zitten. Wat is de resterende waarde van het dier voor het onderzoek, gegeven dat de pathofysiologie de resultaten van de samples twijfelachtig maakt? Zal het dier frequenter worden geobserveerd bij aanwezigheid van deze verschijnselen?

Er wordt een HEP toegepast als de ongeriefscore meer dan 'matig' is. Daardoor zullen dieren met 'ernstig' ongerief nooit blijven zitten. Er worden hier alleen dieren bedoeld met meerdere symptomen welke in combinatie matig niet overschrijden. Dieren met zulke symptomen worden behandeld volgens het "pamper protocol".

Kunt u kort toelichten wat het "pamper protocol" inhoudt?

Met het “pamper protocol” wordt hetzelfde bedoeld als met “pamper care” op bladzijde 3 na de operatie: *Waar nodig krijgen de dieren extra verzorging (pamper care)*. In het kort bestaat deze extra verzorging uit handelingen om herstel te bevorderen en de inname van voer en water te stimuleren. De handelingen worden afgestemd op de toestand van het dier en kunnen de volgende zijn:

- de kooi wordt gedeeltelijk op een warmtemat geplaatst bij dieren met een lage lichaamstemperatuur of bijvoorbeeld een lage mobiliteit;
- weekvoer met suiker wordt aangeboden aan zwakke dieren of bij gewichtsverlies 10-20% vlak na de operatie (20% gewichtsverlies is zoals beschreven altijd een HEP);
- 0.9% zoutoplossing wordt subcutaan gegeven aan dieren / solid drink in de kooi geplaatst bij dehydratie, gewichtsverlies, pilo-erectie.

24. Pg.11: U geeft hier een voorbeeld van de vermindering van het aantal dieren “bij bijvoorbeeld... 80%”. Hoe weegt u verfijning af versus reductie?
Zie antwoord bij vraag 3.

Bijlage 2:

25. De tekst in deze bijlage komt sterk overeen met Bijlage 1. Indien bovenstaande vragen ook van toepassing zijn op bijlage 2, wilt u deze dan ook hier aanpassen, en als er verschillen zijn in de antwoorden deze verschillen benoemen?
Zie antwoord bij vraag 12-15, 18-20 en 23.
26. Bij 2B, pg. 3: op welke aannames is het aantal dieren in de tabel gebaseerd? Waarop zijn de 10 groepen gebaseerd? Kan informatie worden gegeven middels een standaardtest? De verwachte aantallen zijn gebaseerd op historische gegevens van onze voor klanten uitgevoerde studies. Dit is zoals vermeld een verwachting omdat er geen standaardtest voorhanden is.
27. Bij pg.6: kunt u aangeven waarop u baseert dat 5% een HEP haalt?
De 5% HEP was gebaseerd op de hoogste uitval die we in dergelijke studies hebben gezien. Zuiverder zou misschien zijn om 1-5% aan te geven. Dit hebben we nu aangepast.

NTS

28. Bij *Objectives*: begrippen als farmacodynamiek en farmacokinetiek zijn moeilijke begrippen voor een leek. Deze graag verduidelijken.
De tekst in de NTS is nu aangepast naar: Belangrijke informatie is de verdeling van de teststof in het lichaam (*farmacokinetiek*). Ook willen we informatie verzamelen over de werkzaamheid van de teststof (*farmacodynamiek*). Daarnaast kan er ook kennis verkregen worden van eventuele ongewenste effecten. Deze zogenaamde bio-distributie, farmacokinetiek en de farmacodynamiek van de teststoffen zijn voor onze klanten essentieel om weloverwogen beslissingen te nemen over verdere ontwikkeling van hun teststoffen.

29. Eveneens bij *Objectives*: Het valt de DEC op dat deze studie bijdraagt aan zeer veel verschillende doelen, terwijl deze humane ziekten niet genoemd zijn in het projectvoorstel. Kunt u dit in overeenstemming brengen?
Bij Purposes of the project zijn alle ziektes aangegeven (en "other diseases") waarvoor of de afgelopen jaren teststoffen getest zijn, of waarvoor het waarschijnlijk is dat we de komende jaren teststoffen te testen zullen krijgen. In het projectvoorstel kan alleen "Translationeel of toegepast onderzoek" aangevinkt worden.
Bij 3.1 Achtergrond hebben we nu toegevoegd: Dit kunnen geneesmiddelen tegen uiteenlopende humane ziekten zijn. Zo hebben we de afgelopen jaren teststoffen voor toepassing bij bijvoorbeeld verschillende kankersoorten, zenuwaandoeningen en spierziektes onderzocht.
30. Bij veld 22: bij bullet 2 wordt niet duidelijk gemaakt waarom dit gedaan wordt.
De tekst in veld 22, bullet 2 is nu aangepast: Het observeren over langere tijd *om effecten van teststoffen te bepalen*.
31. Bij veld 24: u benoemt niet dat het aanbrengen en hebben van de canules ongerief met zich meebrengt.
Bij veld 24: Expected impacts/adverse effects, hebben we de volgende tekst toegevoegd: "*Na het plaatsen van canules kunnen de dieren hiervan licht tot matig ongerief ondervinden.*"
32. Bij veld 33: Reduction versus Refinement; kunt u aangeven hoe u hier mee omgaat?
Zie antwoord bij vraag 3.
In veld 36 is toegevoegd: Bij afname door een canule hoeven de dieren niet meerdere keren aangeprikt te worden om meerdere monsters te verzamelen.

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. **Is het project vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)? Indien van toepassing, licht toe waarom het project niet vergunningplichtig is en of daar discussie over geweest is. Indien niet vergunningplichtig, ga verder met onderdeel E. Advies.** Het project is vergunningplichtig. Het gaat om dierproeven in de zin der wet.
2. **De aanvraag betreft** een nieuwe aanvraag.
3. **Is de DEC competent om hierover te adviseren?** De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. **Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom.** Er zijn geen DEC-leden uitgesloten van behandeling van de aanvraag. Wel is een selectie gemaakt uit het totale aantal leden op grond van de wettelijk en ethisch benodigde expertises voor een goede afweging. Deze werkwijze (een extra brede DEC met een passende selectie van leden per dossier) is afgestemd met de CCD.

C. Beoordeling (inhoud)

- 1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.**
 De DEC heeft veel aanvullende vragen gesteld en is van mening dat de aanvraag met de aanpassingen toetsbaar is en voldoende samenhang heeft. De aanvraag beschrijft de ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen, die uit verschillende fases bestaat. In de aanvraag worden de diverse fases duidelijk omschreven en ook met welke technieken de selecties plaatsvinden. De beschreven *in vivo*-systemen geven informatie over de werkelijke biologische beschikbaarheid van de teststof en kunnen de potentiële onbedoelde negatieve effecten identificeren. Er zijn toelatingscriteria op grond waarvan de vergunninghouder een opdracht accepteert. Er is een onderscheid gemaakt tussen acute en chronische toedieningen.
- 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 het welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort (bijvoorbeeld Wet dieren en Wet Natuurbescherming).**
 Er is geen tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de proef in de weg staat.
- 3. Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Nevendoelstellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel.** De in de aanvraag aangekruiste categorie sluit aan bij de doelstelling. Het gaat om translationeel/toegepast onderzoek.

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 is de bepaling van biodistributie, farmacokinetiek en farmacodynamiek van potentiële farmaca in het lichaam. Het gaat om **5.1 lid2h** om farmaceutische bedrijven en academische instellingen inzicht te geven in de farmacologische eigenschappen van potentiële nieuwe geneesmiddelen tegen ziekten. Het uiteindelijke doel is de ontwikkeling van nieuwe medicijnen door de opdrachtgever.
- 5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden.**

Wij geven hierbij een overzicht van de belangen, nog zonder weging.

Morele waarden > Belanghebbenden V	Welzijn	Autonomie	Rechtvaardigheid
Patiënten	Geen pijn Geen stress Gezondheid Geluk	Zelfstandig leven Bewegingsvrijheid	Behandelingsopties
Proefdieren	Geen pijn Geen stress Gezondheid Geluk	Natuurlijk gedrag Bewegingsvrijheid	Intrinsieke waarde Integriteit Geen instrument zijn
Vergunninghouder onderzoekers	Economisch belang	Onderzoek doen	Concurrentiepositie

Samenleving	Weinig ziekte Goede economie Geluk		
-------------	--	--	--

6. **Is er aanleiding voor de DEC om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken?** Er worden geen effecten op het milieu verwacht.

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 is voldoende gewaarborgd. De onderzoekers en de instelling als geheel hebben jarenlange ervaring met het ontwikkelen van nieuwe geneesmiddelen en hebben uitgebreide ervaring met microchirurgie, microdialyse en microdissectie. Het herhaaldelijk afnemen van monsters, en het observeren van de dieren met zo min mogelijk handelen zorgt voor consistente data.
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.** Het project is goed opgezet, en studies worden samen met de opdrachtgever zodanig ontworpen dat een maximale hoeveelheid data met zo min mogelijk dieren gegenereerd kan worden. Waar mogelijk worden teststoffen in een studie gecombineerd om zo het gebruik van controlegroepen te reduceren. Het kan zijn dat er een groep wordt toegevoegd om de vergelijking met eerder door de klant gedane metingen mogelijk te maken. De IvD wordt te allen tijde nauw betrokken bij de keuze voor een studieopzet, mede om een goede evaluatie mogelijk te maken.

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.** Er is geen sprake van een bijzondere categorie dierproeven.

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

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

worden in principe verzorgd en gehuisvest op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. Maar in bijzondere gevallen, waar bijvoorbeeld gevochten wordt binnen een kooi, kan ervoor gekozen worden om de dieren in kleinere groepen of individueel te huisvesten.

11. **Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe.** Het cumulatieve ongerief is goed ingeschat op basis het ongerief van de verschillende handelingen tezamen die nodig zijn om het onderzoek uit te voeren. De DEC heeft gediscussieerd over de praktijk van een 24-uurs kinetiekstudie van bijv. een oraal gegeven farmacon, waarbij het een gegeven is dat altijd de meeste bloedmonsters kort na dosering afgenomen worden om het piekeffect en de eerste uitwasfase te kunnen meten; de latere meetpunten (bijv. 9, 16 en 24 na dosering) liggen dus op flinke afstanden van elkaar. Maar het spreekt voor zich dat de eerste monsters via dezelfde katheter afgenomen worden. Dit had wat beter uitgelegd kunnen worden, maar de DEC accepteert dit, omdat de onderzoeksinstelling over alle specialistische ervaring terzake beschikt en er vertrouwen is in het toezicht van de IvD.
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 proefdieren is aangetast in die zin dat zij als proefdieren worden gehouden en gebruikt. De integriteit wordt bovendien aangetast door het inbrengen van canule(s) onder anesthesie, het toedienen van teststoffen met nog onbekende bijwerkingen, het afnemen van bloedmonsters, de inductie van bepaalde ziekten (bijv. tumorcellen om kanker op te wekken) en uiteindelijk de dood. Bij gebruik van immuundeficiënte dieren kan er aantasting zijn in die zin dat de dieren vatbaarder worden gemaakt voor infecties.
13. **Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. Licht uw beoordeling toe.** De humane eindpunten zijn na vragen van de DEC helder en concreet beschreven, bij genetisch gemodificeerde dieren wordt bijvoorbeeld een leeftijdsgrens aangehouden om te voorkomen dat een fenotype met ernstig ongerief ontstaat.

3V's
14. **Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Licht uw beoordeling toe.** Dierproefvrije methoden worden waar mogelijk al ingezet om verschillende eigenschappen van de teststoffen te evalueren, maar om de biodistributie van de te onderzoeken teststoffen te onderzoeken is (nog) een proefdier noodzakelijk. Dit is voldoende beargumenteerd.
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.** Het aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en mede gebaseerd op de resultaten uit de *in vitro*-experimenten. Door de dieren te voorzien van canules is herhaalde bemonstering mogelijk en de vergunninghouder heeft methoden voor micro-sampling en analyse, waardoor met kleine aantallen dieren kan worden gewerkt. Indien namelijk geen microsampling kan worden toegepast (dus grote bloedvolume) zijn meer (satelliet-) dieren noodzakelijk. De DEC heeft doorgevraagd op het dilemma Vermindering versus Verfijning (vragen 3 en 32).
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 dierproeven zijn verfijnd doordat de ingrepen onder algehele anesthesie worden uitgevoerd en waar nodig passende pijnbestrijding wordt toegepast. De biotechnici zijn getraind om de ingrepen zo verfijnd mogelijk uit te voeren. Het gebruik van canules laat meerdere bloedafnamen toe zonder pijnlijke ingreep (het inbrengen van een naald of vergelijkbaar). De DEC heeft o.a. doorgevraagd op het dilemma Vermindering versus Verfijning (vragen 3 en 32) en op diverse details van Verfijning (vragen 12 t/m 17).

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 principe worden dieren van beide geslachten in gelijke mate worden ingezet. Bij het ontwerpen van de studie-opzet wordt met de opdrachtgever het geslacht van de te testen dieren besproken en het wetenschappelijk belang van het onderzoeken van de effecten van potentiële geneesmiddelen in beide geslachten benadrukt. Voor de opdrachtgever is het vaak belangrijk om de vergelijkbaarheid met eventueel voorafgaand uitgevoerde *in vivo*-studies of opvolgende *in vivo*-studies veilig te stellen. De opdrachtgever zal in dat geval moeten rechtvaardigen dat een specifiek geslacht passender is in het totale ontwikkelingstraject. (Zie ook onze vraag 19.)
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.** De dieren worden in het kader van de proef gedood om daarna biologisch materiaal te kunnen verzamelen voor verder onderzoek. Het doden gebeurt volgens de richtlijn.
20. **Indien dieren worden gedood om niet-wetenschappelijke redenen, is herplaatsing of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is. N.v.t.**

NTS

21. **Is de niet-technische samenvatting een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd?** De NTS is een evenwichtige weergave van het project en is begrijpelijk geformuleerd. Dit is het geval nadat de DEC een aantal vragen ter verduidelijking heeft gesteld (vragen 28 t/m 32).

D. Ethische afweging

1. **Benoem de centrale morele vraag. De centrale morele vraag is:** rechtvaardigt

het directe doel namelijk de bepaling van de biodistributie, farmacokinetiek en farmacodynamiek van potentiële farmaca in het lichaam om uiteindelijk geneesmiddelen te kunnen ontwikkelen, het ongerief van 150 muizen met terminaal, 1.275 met licht en 4.075 met matig ongerief en 150 ratten met terminaal, 675 met licht en 2.675 met matig ongerief?

2. **Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoetgekomen 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 belangrijkste belanghebbenden zijn de proefdieren die deels onder anesthesie worden gedood en deels een aantasting van welzijn (met bovengenoemd ongerief) en integriteit ondergaan, hetgeen een groot belang is.

Daartegenover staan de volgende belanghebbenden:

- de vergunninghouder die de experimenten in opdracht uitvoert met een economisch belang, maar de DEC kent daar een zeer geringe waarde aan toe;
- de opdrachtgever die met de verkregen data geschikte kandidaat-stoffen kan selecteren en hun toedieningsroute en dosis voor verder (pre)klinisch onderzoek kan bepalen, waaraan de DEC *op zichzelf* een geringe waarde aan toekent;
- de onderzoekers van de opdrachtgevers die hun kennis over de stoffen kunnen vergroten, en mogelijk gaan publiceren, belangen met een geringe waarde;
- de toekomstige patiënten waarvoor mogelijk een nieuwe of verbeterde behandeling mogelijk is. De DEC acht dit belang in dit stadium nog gering, maar als het onderzoek tot positieve gevolgen leidt, groot. Deze toekomstige patiënten zijn potentieel zeer groot in aantal, en daarmee raakt hun belang ook aan een substantieel belang van de samenleving.

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.**

De DEC heeft laten meewegen dat de vergunninghouder zeer ervaren is in opzet en uitvoering van de uit te voeren experimenten, en is overtuigd van de meerwaarde van het uitbesteden van dit type onderzoek aan een gespecialiseerd onderzoeksbedrijf door de gestandaardiseerde en gevalideerde proefopzet. De DEC acht het toekomstige belang voor patiënten groot, en is daarom mede op grond van het bovenstaande van oordeel dat de bepaling van biodistributie, farmacokinetiek, en farmacodynamiek van potentiële farmaca in het lichaam om uiteindelijk geneesmiddelen te kunnen ontwikkelen een groot belang vertegenwoordigt en dat dit grote belang opweegt tegen de aantasting van het welzijn en de integriteit van de proefdieren. Het gebruik van de proefdieren zoals beschreven in de aanvraag is daarmee gerechtvaardigd.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

- De DEC adviseert de vergunning te verlenen.
- De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
 - 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 advies is unaniem tot stand gekomen.

3. Omschrijf de knelpunten/dilemma's die naar voren zijn gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies zowel binnen als buiten de context van het project. De volgende knelpunten of dilemma's zijn naar voren gekomen: de DEC heeft uitgebreid bediscussieerd in hoeverre het uiteindelijke doel beter gespecificeerd zou moeten worden dan nu het geval is. Dit is het ontwikkelen van nieuwe geneesmiddelen, maar het is voor het bedrijf onmogelijk te voorzien wélke geneesmiddelen. Na doorvragen heeft de DEC hier begrip voor gekregen en heeft zij er vertrouwen in dat er voldoende waarborgen zijn voor een goede omgang met deze handelingsruimte, door de toegelichte werkwijze bij nieuwe opdrachten en de betrokkenheid van de IvD. Zie bijvoorbeeld onze vragen 2 en 5 hierover.



Formulier Projectvoorstel dierproeven

- Dit formulier gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
- Bij dit formulier hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
- Meer informatie vindt u in de 'Toelichting op de te gebruiken formulieren voor de aanvraag van een projectvergunning' 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. 5.1 lid2f
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in. 5.1 lid2h
- 1.3 Vul de titel van het project in. Evaluatie van biodistributie, farmacokinetiek en farmacodynamiek van potentiële nieuwe geneesmiddelen

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 2.1 aangekruiste categorieën.

De ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen bestaat uit verschillende fases. In de eerste fases worden kandidaatstoffen geïdentificeerd met behulp van technieken als *in silico* chemie, bindingstudies, functionele biologische screening, *in vitro* en *ex vivo* assays met cel- of weefselcultuur. Alvorens een teststof (pre-)klinisch getest kan worden, is het van belang dat de biologische beschikbaarheid en

effectiviteit ook in een *in vivo* systeem wordt bepaald. De *in vitro* systemen geven indicaties van de werkzaamheid van de teststof, de *in vivo* systemen geven informatie over de werkelijke biologische beschikbaarheid van de teststof. Daarnaast kunnen *in vivo* ook potentiële onbedoelde negatieve effecten worden geïdentificeerd.

Onze instelling verzorgt 5.1 lid2h om farmaceutische bedrijven en academische instellingen inzicht te geven in de farmacologische eigenschappen van potentiële nieuwe geneesmiddelen tegen ziekten. Met behulp van verschillende methodes wordt binnen onze instelling de biodistributie, effectiviteit en werkingsmechanisme van teststoffen bestudeerd. Twee belangrijke pijlers daarbij zijn 1) het plaatsen van canules voor bemonstering uit verschillende weefsels, bloed en/of cerebrospinale vloeistof in ratten en muizen en 2) het toedienen van een teststof gevolgd door herhaalde (gedrags)observaties en microdissectie. Met de monsters en gegevens die we verzamelen kunnen farmacokinetische en farmacodynamische analyses uitgevoerd worden en *in vivo* effecten worden geëvalueerd. Op deze wijze wordt met gebruik van zo min mogelijk dieren zoveel mogelijk informatie verkregen.

Het hier aangevraagde project betreft het vervolg op een bestaand project binnen onze instelling. Onder projectvergunning AVD 5.1 lid2h 5.1 lid2h zijn voor onze klanten de afgelopen vijf jaar veel potentiële geneesmiddelen bestudeerd. De canules zijn op verschillende perifere locaties geplaatst, eventueel gecombineerd met een satellietgroep ten behoeve van terminale bemonstering. De meest toegepaste gecanuleerde locaties zijn intra-tumor, subcutaan, vena jugularis, cisterna magna, intrathecaal en ruggenmerg. Daarnaast zijn iets minder frequent andere organen als long en lever gecanuleerd. In dergelijke studies is er met relatief weinig dieren veel informatie verkregen, en een relevante bijdrage geleverd aan het opstellen van farmacokinetische en farmacodynamische profielen van teststoffen. In deze vervolgvergunning willen wij dit soort studies blijven uitvoeren om onze klanten inzicht te geven over de biodistributie en effecten van hun potentiële nieuwe geneesmiddelen. Dit kunnen geneesmiddelen tegen uiteenlopende humane ziekten zijn. Zo hebben we de afgelopen jaren teststoffen voor toepassing bij bijvoorbeeld verschillende kankersoorten, zenuwaandoeningen en spierziekten onderzocht.

Daarnaast hebben wij de afgelopen jaren geconstateerd dat de door klanten ontwikkelde potentiële nieuwe geneesmiddelen steeds vaker grotere moleculen en/of biologische teststoffen zijn. Deze teststoffen vereisen vaak een andere manier van doseren, bijvoorbeeld direct in de hersenen voor hersenaandoeningen. Het doseren van teststoffen via deze routes vergt expertise, juist ook voor het observeren van de dieren na toediening. Bovendien hebben deze moleculen vaak een langere biologische beschikbaarheid, en vaak ook een verlaat effect ten opzichte van de klassieke kleine moleculen. Naast de verschillende antilichaam- en celtherapieën zien we een toenemende rol voor gentherapieën als potentieel nieuw geneesmiddel, zeker als het (zeer) zeldzame erfelijke aandoeningen betreft. De afgelopen jaren hebben wij meerdere studies uitgevoerd met antilichamen, anti-sense-oligonucleotiden of adeno-associated-virussen. Hierbij zijn de dieren na dosering vaak langere tijd (longitudinaal) geobserveerd. Vervolgens zijn terminale weefselmonsters verzameld om de farmacologie van de teststof te bestuderen. Met behulp van microdissectie kunnen verschillende weefselmonsters (bijvoorbeeld individuele hersengebieden en/of subsecties van andere organen) worden geïsoleerd en apart van elkaar worden geanalyseerd. Hierdoor kan zowel de biodistributie van de teststof als de effecten van de teststof op specifieke organen of orgaan delen worden onderzocht.

In deze aanvraag willen wij de biodistributie, farmacokinetiek, en de farmacodynamiek van teststoffen in het lichaam bepalen. Dit doen wij door middel van het opstellen van een studieplan in overleg met de klant zodanig dat er met gebruik van zo min mogelijk dieren zo veel mogelijk informatie kan worden verkregen.

3.2 Doel

3.2.1 Beschrijf het directe en het uiteindelijke doel van het project. Beschrijf de bijdrage van het behalen van het directe doel aan het uiteindelijke doel.

- Indien het directe doel bestaat uit verschillende subdoelstellingen, benoem deze dan hier.

Doelstelling van het huidige project is het vergaren van kennis over de biodistributie en farmacologie van potentiële nieuwe geneesmiddelen in verschillende weefsels, de algehele circulatie (bloed) en/of de cerebrospinale vloeistof. Afhankelijk van de al aanwezige informatie en specifieke vraagstelling kan dit middels twee verschillende routes:

- 1) Met behulp van herhaald bemonsteren worden specifiek farmacokinetische (biologische beschikbaarheid) en/of farmacodynamische (effectiviteit) eigenschappen van de te ontwikkelen potentiële nieuwe geneesmiddelen over de tijd in een doelorgaan of matrix bepaald.
- 2) Met herhaalde (gedrags)observaties, gevolgd door *post mortem* (micro)dissectie en analyse, kunnen achtereenvolgens *in vivo* effecten longitudinaal bepaald en *ex vivo* farmacokinetische en/of farmacodynamische eigenschappen van de stof gemeten worden.

In verschillende stadia van de geneesmiddelenontwikkeling kunnen dergelijke studies buitengewoon informatief en waardevol zijn om een goede translatie naar de humane situatie en uiteindelijk de kliniek mogelijk te maken. Bij mensen (patiënten dan wel proefpersonen) zijn vaak wel bloedmonsters beschikbaar, maar geen monsters uit de eigenlijke doelorganen. Doordat in onze dierstudies beide soorten bemonstering wel gecombineerd kunnen worden, is het in een volgend onderzoeksstadium mogelijk de biologische beschikbaarheid in het doelorgaan met grotere zekerheid te voorspellen aan de hand van gegevens uit de humane bloedmonsters. De gegenereerde informatie zal door onze klanten worden gebruikt voor de verdere ontwikkeling en mogelijke toekomstige registratie van het te testen potentiële geneesmiddel. Het preklinisch onderzoek dat wij uitvoeren (hoewel op zichzelf geen wettelijk vereist onderzoek) kan daarom onderdeel worden van een wettelijk verplicht pakket om deze kandidaatstoffen verder in de klinische fase te testen. De resultaten zullen dan door onze klant worden gebruikt voor het IND-rapport (IND= Investigational New Drug) om goedkeuring te krijgen voor first-in-human onderzoek.

Het directe doel is om kennis over de biodistributie, farmacokinetiek en farmacodynamiek van teststoffen en hun metabolieten te verkrijgen. De verzamelde data, inclusief de basale niveaus, worden door onze klanten gebruikt om besluiten te nemen over de verdere ontwikkeling van potentiële nieuwe geneesmiddelen.

Het uiteindelijke doel is om met de verkregen informatie ook translationeel de biologische beschikbaarheid en effectiviteit van het potentiële geneesmiddel met grotere zekerheid te kunnen voorspellen en daarmee bij te dragen aan efficiënte, effectieve en veilige geneesmiddelenontwikkeling. De fysiologische overeenkomsten van de verschillende compartimenten tussen deze knaagdieren en de mens zijn groot, waarmee translatie mogelijk is.

3.2.2 Hoe wordt de haalbaarheid van het directe doel gewaarborgd?

De vergunninghouder is een Nederlandse dochteronderneming van de in de **5.1 lid 2h** heeft het bedrijf in Nederland een breed scala aan expertises van belang voor het ontwikkelen van nieuwe geneesmiddelen. Klanten zijn wereldwijd farmaceutische bedrijven en academische instellingen. De faciliteiten zijn AAALAC (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care) geaccrediteerd.

Binnen onze instelling hebben we uitgebreide ervaring met microchirurgie, microdialyse en microdissectie. Het herhaaldelijk afnemen van monsters, en het observeren van de dieren met zo min mogelijk handelen zorgt voor consistente data. Daarnaast heeft onze instelling veel expertise in het produceren van de benodigde canules (flexibele katheters, verstevigde canules en gespecialiseerde microdialyseprobes) voor het bemonsteren van de verschillende compartimenten en in de bioanalyse van de afgenomen monsters. Deze ervaring is van belang om de vraagstelling, of de te onderzoeken potentiële geneesmiddelen voldoende in het doelgebied komen en daar de gewenste effecten hebben, te kunnen beantwoorden.

De onderzoekers hebben ruime ervaring in verschillende aspecten van geneesmiddelenontwikkeling en kunnen klanten daarom deskundig advies geven over de planning en de opzet van de uit te voeren onderzoeken, en de interpretatie van de resultaten. De biotechnici die de diergerelateerde handelingen

uitvoeren zijn bevoegd en bekwaam om deze uit te voeren. Deze vaardigheden worden getraind en onderhouden onder vergunning AVD^{5.1 lid2h} 202114908.

Het is daarom haalbaar de aangevraagde meerdere studies uit te voeren binnen de termijn van 5 jaar. De afgelopen jaren hebben we per jaar 15 tot 20 studies onder vergunning AVD^{5.1 lid2h} uitgevoerd.

3.2.3 Is voor de uitvoering van dit project andere wet- en regelgeving van toepassing die een invloed zou kunnen hebben op het welzijn van de dieren en/of de haalbaarheid van het directe doel?

Nee

Ja > Geef aan welke wet-en regelgeving van toepassing is en beschrijf de effecten daarvan op het welzijn van de dieren en de haalbaarheid van het project.

Om de in dit projectvoorstel beschreven experimenten uit te kunnen voeren, is het van belang dat de instelling niet alleen aan de *Wet op de dierproeven* voldoet, maar ook aan het Besluit genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013, de *Opiumwet* en Regulation (EC) 1069/2009 betreffende dierlijke bijproducten. De bijbehorende vergunningen en ontheffingen zijn aanwezig.

3.3 Belang

3.3.1 Beschrijf het wetenschappelijk en/of maatschappelijk belang van de hierboven beschreven doelen.

De informatie verkregen in dit project levert een wetenschappelijke bijdrage door:

- het ophelderen van de onderliggende processen van verschillende ziektes
- het bepalen van de biodistributie en farmacokinetiek van teststoffen
- identificatie en kwantificering van biomarkers voor diagnostische doeleinden
- vergroten van het inzicht in complexe biologische interacties

Vanuit maatschappelijk oogpunt is het project van belang voor de ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen. Studies uitgevoerd onder dit project kunnen op een snelle en kostenefficiënte manier antwoord geven op uitdagingen in het (pre-)klinisch onderzoek naar nieuwe geneesmiddelen.

Het project levert een bijdrage door in een vroeg stadium in de ontwikkeling niet-werkzame stoffen, stoffen met ongewenste bijwerkingen/off-target effecten en stoffen die niet bij hun beoogde doel komen (door biologische barrières of metabolisering/uitscheiding) te identificeren en uit te sluiten, waardoor geen onnodige tijd en gelden worden besteed aan verdere ontwikkeling. Daarnaast levert het onderzoek zinvolle translationele informatie die van belang is bij het efficiënt uitvoeren van verder (pre-)klinisch onderzoek.

3.3.2 Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden wat hun belang is.

Binnen de huidige projectaanvraag zijn verschillende belanghebbenden.

De uit te voeren experimenten zijn bedoeld om voor onze **klanten** gegevens te genereren waarmee zij een selectie kunnen maken welke potentiële geneesmiddelen mogelijk tot verdere ontwikkeling in de klinische fase kunnen komen op basis van de farmacokinetische en farmacodynamische profielen.

De **proefdieren in dit projectvoorstel** zullen gehanteerd, geopereerd en behandeld worden door ervaren medewerkers. Daardoor blijft het ongerief voor deze dieren beperkt tot maximaal matig. Voor technieken waarbij de kans op ernstiger ongerief duidelijk aanwezig is (bijv. canulatie van lever), wordt ervoor gekozen om de bemonstering/het experiment terminaal (onder algehele anesthesie) uit te voeren in plaats van in het vrij bewegende dier. Door een zorgvuldig gekozen opzet van de proeven en door de herhaalde observaties en/of bemonstering, wordt het aantal benodigde dieren sterk gereduceerd ten opzichte van methodes waarbij voor elke observatie of meetpunt een groep dieren getermineerd moet worden.

De informatie die uit deze experimenten wordt afgeleid, wordt gebruikt om geschikte kandidaatstoffen te selecteren en hun toedieningsroute en dosis voor verder (pre)klinisch onderzoek te bepalen. Ongeschikte teststoffen worden uitgesloten van verdere ontwikkeling. Dit zal op zijn beurt het aantal **proefdieren** verminderen (wettelijke verplichting Wod) dat in toekomstige preklinische onderzoeken (wettelijk verplichte veiligheidsstudies voor markttoelating) zal moeten worden ingezet. Zoals boven genoemd, kan het preklinisch onderzoek dat wij uitvoeren door onze klanten gebruikt worden als onderdeel voor het IND-rapport voor het potentiële geneesmiddel.

In de klinische fase is er een ethische plicht om mensen die als **proefpersoon** meewerken aan klinisch onderzoek te beschermen tegen vermijdbare schade of lijden. Om die reden eisen medisch-ethische commissies solide data uit preklinisch onderzoek voordat ze een klinische proef met een experimenteel geneesmiddel toestaan. De Europese richtlijnen verplichten daarom dat geneesmiddelen voor humaan gebruik worden getest in proefdieren.

Onze studies dragen bij aan het belang van de klant om hun kandidaatstof als geneesmiddel aan patiënten te kunnen verstrekken. Daarmee zijn de **patiënten** en hun familie en omgeving de uiteindelijke belanghebbenden.

3.4 Strategie

3.4.1 Geef een overzicht van de algemene opzet van het project. Besteed aandacht aan de eventuele fasering in de uitvoering en de samenhang. Vermeld eventuele mijlpalen, keuzemomenten en beslisriteria.

Om onze klanten inzicht te geven in de mogelijkheden en eigenschappen van potentiële nieuwe geneesmiddelen maken wij gebruik van herhaaldelijke monsterafname (met behulp van geïmplanteerde canules, katheters en/of de microdialysetechniek), en/of herhaaldelijke observatie, vaak gevolgd door terminale (micro)dissectie.

In overleg met de klant en gebruikmakend van onze expertise wordt een studie opgezet op basis van tot nu toe bekende informatie over en gefocust op de teststof en de beoogde therapeutische toepassing. De studies worden zodanig ontworpen dat een maximale hoeveelheid data met zo min mogelijk dieren gegenereerd kan worden. Waar mogelijk worden teststoffen in een studie gecombineerd om zo het gebruik van controlegroepen te reduceren. Het kan zijn dat er een groep wordt toegevoegd om de vergelijking met eerder door de klant gedane metingen mogelijk te maken. De IvD wordt te allen tijde nauw betrokken bij de keuze voor een studieopzet om een goede evaluatie mogelijk te maken.

Elke studie binnen het project onder bijlage 1 volgt in de basis de volgende opzet:

1. Gebruik van wildtype/gezonde dieren (ratten of muizen) en/of ziektemodellen (bijvoorbeeld muizen met een tumor) in een of meerdere behandelingsgroepen ingedeeld.
2. Het plaatsen/inbrengen van één of meerdere katheters, canules en/of microdialyseprobes.
3. Het toedienen van teststoffen en/of passende controles via een van verschillende mogelijke toedieningsroutes. In sommige gevallen dienen eerst de basaalwaarden te worden bepaald, dan zal deze stap worden overgeslagen.
4. Monsterafname uit een of meerdere weefsels/organen/cerebrospinale vloeistof/bloed gedurende minstens enkele uren.
5. Terminatie van het dier, collectie van terminale monsters (bijv. organen, cerebrospinale vloeistof, bloed, ander weefsel).
6. *Ex vivo*: bepaling van de toegediende teststof(fen) en/of (ziekte-gerelateerde) relevante biomarkers in verzamelde vloeistof- en weefselmonsters, dit kan zowel binnen onze instelling als bij de klant uitgevoerd worden.

Elke studie binnen het project onder bijlage 2 volgt in de basis de volgende opzet:

1. Gebruik van wildtype/gezonde dieren (ratten of muizen) en/of ziektemodellen in een of meerdere behandelingsgroepen ingedeeld.
2. Het toedienen van teststoffen en/of passende controles via een van verschillende mogelijke toedieningsroutes.
3. Observatie, eventueel met incidentele bloed collectie.
4. Terminatie van het dier, collectie van terminale monsters meestal met gebruikmaking van microdissectie.
5. *Ex vivo*: bepaling van de toegediende teststof(fen) en/of (ziekte-gerelateerde) relevante biomarkers in verzamelde vloeistof- en weefselmonsters, dit kan zowel binnen onze instelling als bij de klant uitgevoerd worden.

Binnen deze algemene opzet zullen verschillende parameters variëren tussen de verschillende studies of onderdelen. Daar deze studies of onderdelen door verschillende klanten in opdracht gegeven worden en per klant ook de karakterisering van verschillende teststoffen kunnen betreffen, zullen de exacte vraagstelling en daardoor ook de exacte onderzoeksopzet verschillen. Bij verschillende studies of onderdelen voor één teststof bouwen deze meestal op elkaar voort.

Voor het ontwerpen van de studieopzet gebruiken we onder meer de volgende informatie:

- beoogde toepassing en doelorgaan van de teststof;
- eigenschappen van de teststof;
- gewenste bepalingen: farmacokinetiek, farmacodynamiek, etc.;
- tot dan toe bekende informatie over de teststof, bijvoorbeeld *in vitro* data of eventuele beschikbare *in vivo* data;
- duur van de studie;
- benodigde aantal monsters, monstertypes en monstervolumina;
- benodigde aantal dieren, als dit niet binnen de standaard richtlijnen valt zal er een statistische evaluatie worden uitgevoerd om het aantal dieren te bepalen.

3.4.2 Onderbouw de gekozen strategie.

De beschreven experimenten dienen ertoe een bijdrage te leveren aan de kennis over de biodistributie, farmacokinetiek en farmacodynamiek van teststoffen en hun metabolieten. Door gebruik te maken van de expertise in onze faciliteit kunnen we longitudinale en translationele gegevens verzamelen omtrent de teststoffen.

De microchirurgische vaardigheden die bij onze faciliteit routinematig worden ingezet dragen bij aan een relevante vermindering van het aantal proefdieren ten opzichte van meer traditionele biodistributiestudies.

Daarbij maken de mogelijkheden van gelijktijdige canulatie van bijvoorbeeld de vena jugularis en de cisterna magna mogelijk dat de eigenschappen van de teststof in meerdere compartimenten en over tijd tegelijk geëvalueerd kunnen worden. Dit vermindert de variatie in de data en levert dus, met gebruik van minder proefdieren, beter voorspellende data. Tenslotte zijn de vaardigheden ook van toepassing voor meer specialistische toedieningsroutes als intracerebroventriculair en intra-cisterna-magna en de mogelijkheid tot accurate microdissectie.

Voor iedere individuele studie wordt vooraf de afweging gemaakt of de hierboven beschreven strategie passend is en daadwerkelijk van toegevoegde waarde voordat verdere keuzes en mogelijkheden ten aanzien van de studieopzet worden besproken.

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

Volgnummer	Titel bijlage Beschrijving dierproef
1	Biodistributie, farmacokinetiek en farmacodynamiek evaluatie met gebruikmaking van canulatie
2	Biodistributie, farmacokinetiek en farmacodynamiek evaluatie na acute toediening

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 in de 'Toelichting op de te gebruiken formulieren voor de aanvraag van een projectvergunning' 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.

5.1 lid2h

1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.

5.1 lid2h

1.3 Vul het volgnummer en de titel van de dierproef in.

Volgnummer	Titel dierproef
1	Biodistributie, farmacokinetiek en farmacodynamiek evaluatie met gebruikmaking van canulatie

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.3 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Experimentele aanpak:

De onderzoeksvraag van de klant is voor veel van de te onderzoeken teststoffen het bepalen van de biodistributie en/of farmacodynamiek over de tijd na dosering. Om herhaalde monsters te kunnen nemen zonder bij ieder tijdstip een groep dieren te moeten termineren is onze instelling gespecialiseerd in het operatief plaatsen van canules in verschillende weefsels, organen en vaten. Bij muizen kunnen maximaal twee canules per dier geplaatst worden, bij ratten zijn dat er maximaal drie per dier. Hierdoor kan bij ieder dier uit tot maximaal 3 compartimenten herhaald bemonsterd worden. In het vrij bewegende dier is dit met weinig bijkomend ongerief. Na het nemen van een aantal basale monsters wordt de teststof toegediend en daarna verder bemonsterd. De monsterintervallen en de totale tijdsspanne van bemonsteren zijn afhankelijk van de eigenschappen van de teststof en van de exacte klantvraag. Na afloop van het bemonsteren door de canule(s) worden de dieren getermineerd om a) de plaatsing van de canules te verifiëren en/of b) terminale monsters af te nemen.

Primaire uitkomstparameters:

De primaire uitkomstparameters zijn de verzamelde vloeistofmonsters: bloed (voor bijvoorbeeld plasma of serum), microdialysaat, cerebrospinale vloeistof, evenals (eventueel) verzamelde terminale monsters.

Secundaire uitkomstparameters zijn gemeten concentraties van bijvoorbeeld gedoseerde stoffen en/of metabolieten (farmacokinetiek) en biomarkers (farmacodynamiek) in de verzamelde monsters. Deze analyses worden met behulp van geavanceerde technieken, zoals massaspectrometrie of ELISA, uitgevoerd. Dit kan binnen onze instelling, bij de klant en/of een andere instelling zijn.

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

Tijdens het onderzoek kunnen de volgende handelingen worden uitgevoerd (* voor optionele handelingen):

Acclimatisatie

Na aankomst in het vivarium krijgen de dieren de tijd om gewend te raken aan hun nieuwe kooi, voeding en andere omgevingsfactoren. Dit bevordert zowel het dierenwelzijn als de reproduceerbaarheid van experimentele resultaten. De acclimatisatiefase duurt minimaal 7 dagen.

Inoculatie met tumorcellen / xeno-transplantaat *

Het meest geschikte model om de biodistributie en/of farmacodynamiek voor oncologie-gerelateerde teststoffen in te bestuderen is een muis met tumorweefsel. Hiervoor worden geïnoculeerde dieren ofwel door een externe partij (onze zusterlocatie in 5.1 lid 2f met oncologische experts) geleverd, of dieren worden in onze instelling geïnoculeerd met de tumor-celijn van interesse. Hiervoor wordt een tumorcelsuspensie onder lichte isofluraansedatie subcutaan in de flank geïnjecteerd waarna de groei van de tumor gevolgd wordt. Na enkele weken bereikt de tumor de optimale grootte (300-400 mm³) voor plaatsing van een canule in de tumor.

Operatie: plaatsen van de canule(s)

Het inbrengen van de canules vindt plaats onder algehele anesthesie. Het dier wordt door middel van isofluraaninhalatie onder diepe anesthesie gebracht. Tevens worden een systemisch analgeticum en topicale analgesie toegepast en het dier wordt subcutaan met 0.9% zoutoplossing behandeld om dehydratie te voorkomen. De operatie vindt plaats op een verwarmde ondergrond met individuele temperatuurcontrole. De microchirurgen werken volgens standaardprotocollen waarmee het risico op uitval door infecties wordt geminimaliseerd. Deze protocollen beschrijven zowel de voorbereidingen van het dier (zoals scheren en desinfecteren van de huid in het operatiegebied), de handelingen met chirurgische materialen (wat is op welke wijze gedesinfecteerd of gesteriliseerd) als de werkwijze tijdens de operatie (handschoenen/mondmasker/niet onnodig boven operatieveld komen/schone en vuile zijde).

Voor verschillende doelgebieden zijn verschillende canules ontwikkeld. Voor het afnemen van en/of het toedienen in lichaamsvloeistoffen worden flexibele katheters en verstevigde canules gebruikt. Voor het afnemen van microdialysaat uit de extracellulaire vloeistof worden microdialyseprobes gebruikt, canules met (meestal) een semi-permeabel membraan. Er kan ook gekozen worden voor het plaatsen van een guide-canule. Dit is een speciaal ontworpen houder, waarin precies een dummy stilet of een microdialyseprobe past. Door het gebruik van deze houder ontstaat de flexibiliteit om een probe op een later tijdstip te plaatsen en/of tussentijds te vervangen.

- Cardiovasculair systeem: in de vena jugularis, vena femoralis of arteria femoralis van rat of muis wordt een katheter of een microdialyseprobe geplaatst.
- Cerebrospinale vloeistof: in de cisterna magna van rat of muis wordt een verstevigde canule geplaatst.
- Subcutis / subdermis / subdermaal tumor (xeno-)transplantaat: een microdialyseprobe of guide-canule wordt bij rat of muis onder de huid geplaatst. Bij tumormodellen in muizen wordt het membraan van de microdialyseprobe in de tumor ingebracht.
- Ruggenmerg(vocht): bij ratten wordt een microdialyseprobe bij wervel T13 ingebracht of een microdialyseprobe of guide-canule intrathecaal via het atlanto-occipitaal-membraan.
- Longepitheel: bij ratten wordt een microdialyseprobe of guide-canule via de trachea ingebracht.
- Knie: bij ratten wordt een microdialyseprobe achter de patella geplaatst.
- Andere locaties waarvoor de canules en technieken al ontwikkeld zijn. Deze methodes worden op dit moment niet routinematig uitgevoerd, en de bevoegde medewerkers zullen daarom eerst een opfrustraining moeten uitvoeren onder AVD 5.1 lid 2f 202114908. Dit geldt bijvoorbeeld voor het beenmerg van de tibia van de rat en voor de lever van rat of muis.
- Andere locaties waarvoor de techniek nog (verder) ontwikkeld en vervolgens getraind moet worden (beide onder AVD 5.1 lid 2f 202114908): op het moment wordt de plaatsing van een microdialyseprobe in de nier van de rat verder ontwikkeld voor zowel de nierschors als het niermerg. Andere locaties kunnen ook gecanuleerd worden als de canule en techniek daarvoor ontwikkeld, verfijnd en getraind zijn.

Zodra deze volledig ontwikkeld zijn, goedgekeurd zijn door de IvD en toegepast kunnen worden, zullen we na overleg met de IvD, een melding of aanvraag tot wijziging indienen om de nieuwe operatietechniek toe te voegen.

Gecombineerd kunnen bij muizen maximaal twee canules per dier geplaatst worden, bij ratten zijn dat er maximaal drie per dier. Afhankelijk van het aantal te plaatsen canules duurt de operatie per dier tussen 20 en 90 minuten.

Voor het plaatsen van alle soorten canules wordt eenzelfde soort stappenplan gevolgd.

1. Voorbereidende fase: Het doelgebied wordt vrijgeprepareerd en een lokaal analgeticum toegepast.
2. Inbrengen van canules: Vervolgens worden canules, katheters en/of microdialyseprobes/guides geplaatst. Waar mogelijk worden deze subcutaan getunneld naar de kop, waar deze met speciaal biocompatibele polymeer wordt vastgezet. De binding tussen de schedel en canule wordt versterkt door het bevestigen van een of meerdere schroefjes in de schedel.
3. Afrondende fase: Na het fixeren van de canule worden de incisie(s) gesloten, met hecht draad of weefsellijm.
4. Einde van de operatie: Het dier komt bij of kan meteen worden ingezet voor terminale bemonstering onder anesthesie gedurende maximaal 8 uur. Bij het bijkomen uit de anesthesie worden de dieren warm gehouden door middel van een warmtemat en geobserveerd op tekenen van ongerief. Wanneer de dieren volledig wakker zijn, worden ze individueel in experimentele kooien gehuisvest om beschadiging van elkaars canules te voorkomen. De dieren worden zodanig gehuisvest dat ze elkaar kunnen horen, zien, en ruiken; bij langer durende individuele huisvesting is dat tot de overbrenging in experimentele kooien zoveel mogelijk per paar in een kooi met een geperforeerde perspex scheidingswand voor beperkt contact zonder dat de canules kunnen worden beschadigd en daardoor het experiment gevaar kan lopen. Waar nodig krijgen de dieren extra verzorging (pamper care).

Voedselrestrictie *

Het kan in een enkel geval voorkomen dat de dieren bij orale toediening van de teststof "nuchter" moeten zijn. In deze gevallen zullen de dieren gedurende maximaal 8 uur voor toediening gevast worden. Aangezien de meeste toedieningen in de ochtend plaatsvinden, en de bemonstering daaropvolgend gedurende de dag, zal deze voedselrestrictie in de actieve periode van de dieren plaatsvinden. Er is gekozen voor een maximum van 8 uur omdat een vastenperiode van 6 tot 7 uur bij ratten en muizen vaak resulteert in een vergelijkbare maaglediging als bij langere vastenperiodes (bv. Prior et al., 2012; Hauff & Nebendahl, 2017). Hierbij wordt alleen het voer weggenomen, de dieren hebben *ad libitum* toegang tot drinkwater. Dit is, net als bij al toegelaten geneesmiddelen, afhankelijk van stofspecifieke eigenschappen en gebeurt alleen als er al gegevens over de teststof bekend zijn dat dit voor opname van de stof noodzakelijk is. Ter indicatie, in het verleden betrof dit hooguit 1 of 2 studies per periode van 5 jaar. De verwachting is dus, dat voedselrestrictie hoogstens maar bij enkele studies nodig zal zijn.

Toediening(en) van teststof *

Het individuele dier wordt één of meerdere keren (maximaal 60 keer in totaal, bijvoorbeeld 2 maanden dagelijks, of 1 maand tweemaal daags) een dosering van de teststof(fen) (teststof of vehikel, en/of referentiestof) toegediend. Als naast de teststof ook een bekende receptor (ant)agonist als referentiestof toegediend wordt, kan hiermee ook informatie over het werkingsmechanisme van de teststof verkregen worden.

Veelal zal de toediening van de teststof(fen) na een aantal basale monsters tijdens de microdialyse plaatsvinden om pre- met postdoseringsmonsters te kunnen vergelijken. Bij (sub)chronische toediening of als sprake is van langetermijneffecten kan toediening ook al voor de implantatie van de canule(s) aanvangen.

In enkele gevallen zal een basaal profiel van de relevante biomarkers door de tijd heen bepaald moeten worden (meestal als voorbereiding op een later farmacokinetiek/farmacodynamiek experiment). In deze gevallen zal geen toediening gedaan worden.

De volgende toedieningsroutes worden (in overleg met de klant over de geschiktheid/toepasbaarheid voor de specifieke vraagstelling en eigenschappen van de teststof) **bij voorkeur** gebruikt:

- Intraperitoneaal, subcutaan, oraal, intraveneus (eventueel via geplaatste katheter), lokaal door de canule of probe.

Daarnaast kan, indien de al bekende eigenschappen van de teststof hiertoe aanleiding geven, gebruik worden gemaakt van:

- Intramusculair, rectaal, intranasaal.

- Onder anesthesie (bij voorkeur tijdens de bovenbeschreven operatie, routes vooral relevant voor teststoffen zoals adeno-associated-virussen en antisense oligonucleotiden): intracerebroventriculair, intracerebraal, intrathecaal, toedieningen in specifieke organen.

De toediening zal in de meeste gevallen in de eerste uren van de lichtfase plaatsvinden. Indien de activiteit van het dier bepalend is voor de fysiologie van het mechanisme waar de teststof op aangrijpt en dus de transleerbaarheid naar de mens volgens ons in het gedrang komt, hebben we de mogelijkheid het dag-nacht-ritme van de dieren om te keren. In overleg met de klant beslist de onderzoeker over de noodzakelijkheid hiervan.

Klinische observaties

Na de operatie en na toediening van stoffen worden de dieren geobserveerd. Hierbij wordt gekeken naar algemene klinische verschijnselen die op effecten van de toediening van de stof en/of verminderd welzijn kunnen duiden. De dieren worden beoordeeld aan de hand van de door de IvD opgestelde beslisboom. De dieren worden standaard dagelijks gemonitord en eventuele bevindingen worden vastgelegd in het welzijnsdagboek van ieder individueel dier en de studie-overview.

Nadat de dieren uit de anesthesie zijn bijgekomen en in de experimentele kooien gehuisvest zijn, worden ze op de dag van de operatie nog minstens een keer geobserveerd. Afhankelijk van de ingreep en de daarbij behorende analgesieprocedure stemmen wij onze observatiefrequentie af. Bij een ingreep waarbij de analgesie langer duurt dan een dag, worden de dieren 's ochtends, 's middags en 's avonds geobserveerd om het dierenwelzijn te waarborgen. Omdat we de chirurgische ingrepen volgens standaardprocedures uitvoeren, is in bijna alle gevallen verdere observatie niet nodig.

Monsterafname

Na implantatie van de relevante canules en bijkomen uit de anesthesie kunnen vanaf de dag na de operatie tot maximaal 2 maanden de volgende soorten monsters genomen worden:

- **Bloedmonsters** Bloedafname voor en/of na toediening van de teststof gebeurt via de geplaatste katheter in de vena jugularis/femoralis, en kan ook uit de staartvene (voorkeur bij rat) of aangezichtsvene (voorkeur bij muis) gedaan worden. De afname van bloedmonsters is bij voorkeur beperkt tot maximaal 8 monsters van in totaal 10% van het totaal bloedvolume per 24 uur en tot een absoluut maximum van 15% van het totaal bloedvolume in 24 uur, waarbij boven de 10% vervangende vloeistof (fysiologische zoutoplossing) wordt gegeven volgens een door de IvD opgestelde richtlijn en met de klant wordt gesproken over de noodzaak van de overschrijding van 10% van het bloedvolume. Een absoluut maximum van 20%, met vervangende vloeistof, kan alleen verdeeld over verschillende dagen afgenomen worden. Eventuele herstelperiodes zijn 7 dagen voor 7,5 tot 10%, 14 dagen voor 10 tot 15% en 21 dagen voor 15 tot 20%. Bij de kortere experimenten zal er na het afnemen van deze volumina vaker sprake zijn van termineren dan van herstel van het dier. Als leidraad voor de interne richtlijnen is gekeken naar Diehl (2001).
- **Cerebrospinale vloeistof (CSF)** Deze monsters worden genomen door de geplaatste canule in de cisterna magna. De afname van CSF-monsters is beperkt tot 4 monsters van ongeveer 5-10 microliter van een muis en 8 monsters van ongeveer 15-30 microliter van een rat per 24 uur. Door de CSF-productie van 0.3 microliter per minuut in de muis en meer bij grotere diersoorten wordt de afgenomen vloeistof ruimschoots weer aangevuld (Pardridge, Expert Opin Drug Deliv 2016: 13, 963-975).
- **Microdialysaat** Bij wakkere dieren kan monsterafname vanaf de dag na de operatie starten; monsterafname onder anesthesie start direct aansluitend aan de operatie. De geplaatste microdialyseprobes worden via slangetjes verbonden met een microperfusiepomp. Er stroomt nu continu een iso-osmotische vloeistof door de probe, met een snelheid van 0,1 tot enkele microliters per minuut. De uitstromende vloeistof uit de outletslangetjes wordt per dier en per locatie opgevangen om tot bijvoorbeeld 10-, 15-, 30-, 60-, of 240-minutenmonsters te komen. Het principe van (micro)dialyse is

dat er netto geen vloeistof aan het dier wordt onttrokken. De bemonsteringssnelheid is afhankelijk van de vraagstelling van de klant en van de al bekende eigenschappen van de teststoffen. Voordat de experimentele monsters verzameld worden, is er een stabilisatiefase van 1,5 tot 2 uur, waarin de dieren wennen aan de slangetjes en de niveaus van biomarkers in de opgevangen monsters stabiliseren.

Over het algemeen worden eerst alle monsters verzameld en opgeslagen en vervolgens met behulp van bijvoorbeeld high-performance liquid chromatography (HPLC) gevolgd door tandem-massaspectrometrie geanalyseerd.

Termineren

Aan het eind van het experiment zullen de dieren onder inhalatie-anesthesie worden getermineerd met een barbituraat-overdosis, zodat de relevante organen kunnen worden verwijderd om de plaatsing van de canule(s) te verifiëren. Dit gebeurt op een wijze in overeenstemming met bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Tevens kan er weefsel, terminaal bloed, en/of terminale cerebrospinale vloeistof worden uitgenomen voor verdere *ex vivo* bepalingen. Wanneer post-mortem weefsel zonder bloed moet worden uitgenomen, kan transcandiale perfusie onder inhalatie-anesthesie onderdeel uitmaken van het terminatieprotocol.

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

Op basis van power-analyse en statistische post-hoc analyse is in het verleden de benodigde groepsgrootte bepaald. Deze loopt uiteen van 4 tot 12 dieren per groep (afhankelijk van de variatie in de concentratie van de te bepalen biomarker of teststof).

- Voor farmacokinetische studies met behulp van een ultra langzame flow (in onze gepatenteerde **5.1 lid2h**) zijn data van minimaal 4 dieren nodig.
- Voor de meeste stabiele biomarkers zijn data van 5 tot 6 dieren per dosering voldoende.
- Voor biomarkers waarvan bekend is dat basale concentraties sterk variëren, zijn data van 7 tot 12 dieren nodig.

Voor niet eerder geteste of bestudeerde biomarkers zou op basis van een pilotstudie de bio-analytische variatie moeten worden bepaald alvorens een power-analyse kan worden uitgevoerd.

Op basis van onze ervaringen in het verleden ligt de uitval na operatie rond de 5% en 25% bij de meest complexe ingrepen (bijvoorbeeld de plaatsing van een microdialyseprobe in het ruggenmerg).

Tumormodellen hebben meer intrinsieke variatie, daarvoor worden extra dieren geïnoculeerd. Het met tumorcellen te inoculeren aantal dieren wordt in overleg met onze oncologie-collega's in **5.1 lid2h** besloten om de uiteindelijke aantallen te kunnen verkrijgen. Zij beschikken over een uitgebreide database met informatie over de groeikarakteristieken per tumorcellijn.

B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, levensstadia, geschatte aantallen per levensstadium, geslacht, genetische wijzigingen en, indien van belang voor het behalen van de doelstelling, de te gebruiken stam.

Volgnr.	Diersoort	Herkomst	Levensstadium	Aantal	Geslacht	Genetisch gewijzigd	Stam
1	Muis	1) dieren	Neonataal- volwassen	1000	m/v	nee	
2	Rat	gefokt voor					
3	Muis	onderzoek					

Onderbouw de bovengenoemde keuzes.

Diersoort	<p>Onze instelling heeft expertise in het toepassen van microchirurgie en bemonstering in muizen en ratten. Voor de verschillende onderzoeken wordt per klant en per studie bepaald welke diersoort het meest geschikt is voor het beantwoorden van de specifieke vraag, gecombineerd met het minste te verwachten lijden (in aantal en individueel ongerief). Verder zijn zoals hierboven beschreven sommige canulaties beperkt tot een van beide diersoorten.</p> <p>Als (vervolg)studies naar een teststof met een specifieke soort of model gepland of gedaan zijn, worden deze studies zoveel mogelijk in dieren van dezelfde soort gedaan.</p>
Herkomst	Alle dieren zullen worden verkregen van erkende instellingen voor het fokken van proefdieren.
Levensstadia	<p>In de meeste studies worden (jong)volwassen dieren ingezet. Meestal is dit de relevante leeftijd voor de te onderzoeken teststof. Ook is er bij volwassen dieren meer ruimte op de schedel om de verschillende canules vast te zetten, waardoor bij meerdere te bemonsteren compartimenten het aantal dieren zo laag mogelijk gehouden kan worden. Daarom vinden de canulaties bij voorkeur bij (jong)volwassen dieren plaats, vanaf een leeftijd van 8 weken, bij een gewicht van ~250-350 gram voor ratten en ~20-25 gram voor muizen.</p> <p>Om aan veroudering gerelateerde ziektes te bestuderen worden soms ook oudere dieren ingezet, of juist pasgeboren dieren wanneer het gaat om een afwijking die vanaf de eerste levensdagen moet worden bestreden met een passende therapie. Wanneer dat voor de studie-opzet noodzakelijk is, kunnen dieren tot maximaal 18 maanden geopereerd worden. In het geval van pasgeboren dieren zal het gaan om toediening op of vanaf de vroeg postnatale leeftijd, terwijl de canule-plaatsing en de daaropvolgende bemonstering in het (jong)volwassen dier zullen plaatsvinden.</p>
Aantal	Uitgaande van 25 studies per jaar met gemiddeld 4 groepen met gemiddelde groepsgrootte 6, verwachten we 600 dieren per jaar, dus 3000 over een periode van 5 jaar in te zetten waarvan 1500 muizen en 1500 ratten.
Geslacht	Deze experimenten kunnen zowel in mannelijke als vrouwelijke dieren uitgevoerd worden. Bij het ontwerpen van de studie-opzet wordt met de klant het geslacht van de te testen dieren besproken en het wetenschappelijk belang van het onderzoeken van de effecten van potentiële geneesmiddelen in beide geslachten benadrukt. Voor de klant is het vaak belangrijk om de vergelijkbaarheid met eventueel voorafgaand uitgevoerde <i>in vivo</i> studies of opvolgende <i>in vivo</i> studies veilig te stellen. De klant zal in dat geval moeten aangeven dat een specifiek geslacht passender is in het totale ontwikkelingstraject.
Genetisch gewijzigd	<p>Volgnr. 1 & 2: niet van toepassing.</p> <p>Bij volgnr. 3: Voor tumorstudies met xenotransplantaties (bijvoorbeeld patient-derived-xenograft), zijn immuundeficiënte dieren nodig, om afstoting van de tumor te voorkomen. Een veelgebruikte genetisch gewijzigde muis voor tumorimplantatie is de NSG-muis (NOD.Cg-Prkdc^{sc.d} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ), maar ook andere dieren kunnen gebruikt worden voor specifieke tumormodellen.</p> <p>Deze GGO-muis heeft zowel een spontane mutatie als een targeted mutatie waardoor de dieren expressie van de genen <i>Prkdc</i> en <i>Il2rg</i> missen. Hierdoor zijn de dieren sterk immuundeficiënt en gevoelig voor infecties. NSG muizen zijn levensvatbaar, vruchtbaar, van normale grootte en vertonen geen sterke fysieke of gedragsafwijkingen.</p> <p>In het geval een klant een studie wil laten uitvoeren met een ander model, kunnen in overleg met de IvD ook andere sterk gelijkende modellen ingezet worden. In het geval van nieuwe modellen zullen we, na overleg met de IvD, een melding of aanvraag tot wijziging indienen.</p>
Stam	<p>De gebruikte stam wordt indien relevant gematcht aan die in andere onderzoeken van de klant.</p> <p>Als immuundeficiënte muizen nodig zijn voor tumorinoculatie met xeno-transplantaat, wordt ook de NMRI-Foxn1nu/nu stam (spontane mutatie, geen GGO) ingezet.</p>

C. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

Ja

Nee > 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.

Dieren worden voor aanvang van het experiment standaard gehuisvest volgens de richtlijnen 2010/63/EU. In bijzondere gevallen, waar bijvoorbeeld gevochten wordt binnen een kooi, kan ervoor gekozen worden om de dieren in kleinere groepen of individueel te huisvesten.

Na de operatie moeten de dieren individueel gehuisvest worden om beschadigingen van de geplaatste canule(s), en daardoor uitval uit het experiment, te vermijden. Ook tijdens de monsterafname via canules moeten de dieren alleen zitten. Bij veel experimenten vindt de monsterafname op de dag na de operatie (met overnacht herstel) plaats. In deze gevallen duurt de solitaire huisvesting doorgaans tussen de 24 en 36 uur (afhankelijk van het individuele tijdstip van operatie en de duur van het microdialyse-experiment. In de experimentele kooien kunnen de dieren elkaar goed horen, zien en ruiken.

Bij experimenten waarin de dieren na operatie langer dan 48 uur gevolgd en/of bemonsterd worden, worden de dieren na de operatie zoveel mogelijk gehuisvest in de eerder genoemde speciale kooien met een scheidingswand, waarbij de dieren maximaal interactie kunnen hebben met uitzondering van direct fysiek contact.

D. Pijn en welzijnsaantasting

Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?

Nee >

Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

Operaties vinden altijd onder diepe algehele anesthesie plaats. Vooral het vrijprepareren van het doelweefsel zou na bijkomen uit de anesthesie nog pijn kunnen veroorzaken bij de dieren. Pijnbestrijding vindt plaats door toediening van een langwerkend systemisch analgeticum voor aanvang van de operatieve ingreep en topicale analgesie op de plaats van incisie.

Na de operatie wordt optimale pijnbestrijding gecontroleerd op basis van uiterlijk en gedrag van de dieren. Extra pijnstilling wordt alleen gegeven als uiterlijk en gedrag van het dier daar aanleiding toe geven.

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

1. Bijkomen uit anesthesie is een bekende oorzaak van stress voor de dieren, hierbij spelen ook de invasiviteit en lengte van de uitgevoerde operatie een rol.
2. Tijdens de experimenten zelf worden de dieren individueel gehuisvest om te voorkomen dat zij elkaars canules beschadigen bij sociale interacties. Individuele huisvesting is een bekende vorm van verminderd dierenwelzijn en moet zo beperkt mogelijk worden ingezet.
3. Een andere bron van potentiële welzijnsaantasting zijn de te onderzoeken teststoffen, deze kunnen ondanks eerdere (veelal *in vitro*) testen nog onbekende bijwerkingen vertonen.
4. Bij gebruik van immuundeficiënte dieren kan er welzijnsaantasting zijn in de vorm van het vatbaarder zijn voor infecties.
5. Na het inoculeren met tumorcellen / xeno-transplantaat (alleen bij gebruik van tumormodellen) kan er welzijnsaantasting optreden.
6. Bij gebruik van oudere dieren is het ook van belang om rekening te houden met leeftijdsspecifieke aantasting van het welzijn (bijvoorbeeld (maar niet uitsluitend) het ontstaan van gezwellen in oudere dieren).

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

1. Oorzaken voor ongerief bij bijkomen uit anesthesie zijn gerelateerd aan de tijdelijk veranderde fysiologie van het lichaam, het lichaam heeft minimaal een aantal uren nodig om de homeostase te herstellen.
2. Het knagen aan geplaatste canules en onderling vechten hebben te maken met normaal sociaal gedrag van de dieren, dit is moeilijk anders tegen te gaan dan door individuele huisvesting.
3. Oorzaak voor het onbekend zijn van mogelijke bijwerkingen is dat de stoffen die getest zullen worden zich vaak nog in een vroeg stadium van de geneesmiddelenontwikkeling bevinden en daarom vaak nog niet eerder (uitgebreid) in dieren getest zijn. Hierdoor kan het zijn dat er onverwachte negatieve bijwerkingen optreden.
4. Dieren met een (gedeeltelijke) immuundeficiëntie hebben bij langdurige blootstelling aan de omgeving meer kans op infecties dan gewone dieren.
5. Bij gebruik van tumormodellen: specifiek ongerief door de groei van de tumor
6. Bij gebruik van oudere dieren: specifiek ongerief heeft meestal te maken met symptomen die ook bij oudere mensen worden waargenomen.

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

1. Om het ongerief bij het bijkomen uit anesthesie te minimaliseren komen de dieren bij in een rustige en verwarmde omgeving waar ze toegang hebben tot voedsel en water. De dieren krijgen voor de operatie een pijnstillertoezegging. De dieren worden regelmatig gecontroleerd tot ze fit genoeg zijn om in hun experimentele kooi te worden geplaatst.
2. Dieren in (sub)chronische experimenten worden per paar gehuisvest in een speciaal ontworpen sociale "individual-group-housing-cage" met scheidingswand. Deze huisvesting behoudt olfactorische, auditieve en visuele interacties aangaan, maar beperkt fysiek contact. Daarnaast wordt altijd kooiverrijking aangeboden aan de dieren.
3. Negatieve effecten veroorzaakt door de teststof worden op vier manieren geminimaliseerd:
 - a) Voorafgaand aan het ontwerpen van de experimentele opzet wordt informatie van de klant gevraagd om zoveel mogelijk over de teststof te weten te komen. Dit is inclusief informatie die kan wijzen op het ontstaan van potentieel ongerief bij de dieren.
 - b) Tijdens de experimenten worden de dieren geobserveerd voor tekenen van ongerief en onbedoelde bijwerkingen. Hierbij wordt het dierenwelzijn ingeschat met behulp van een interne beslisboom. Wanneer noodzakelijk en zinvol zal extra verzorging en/of additionele analgesie worden toegepast.
 - c) In het geval dat er effecten optreden die niet zijn voorzien en/of zijn beschreven in de beslisboom wordt in overleg met de IvD en dierenarts gekeken naar mogelijkheden om het ongerief te verminderen, of indien nodig de dieren te termineren.
 - d) Door een goede experimentele opzet kan ervoor worden gezorgd dat niet alle dieren gelijktijdig worden ingezet bij aanvang van de studie (randomisatie, pilot-experimenten, versprongen toediening).
4. Immuundeficiënte dieren worden tot de operatie in geautoclaveerde IVC-kooien gehouden, met gesteriliseerd voer en drinkwater, om blootstelling aan microbiologische organismen te minimaliseren.
5. Bij tumormodellen wordt na inoculatie tijdens de observaties gemonitord op tumorgrootte en tumorspecifiek ongerief, bijvoorbeeld zelfverminking door voortdurend krabben, zweervorming, eventuele ectopische tumorgroei.
6. Bij gebruik van oudere dieren: de noodzaak van inzet van deze dieren wordt vooraf in detail met de sponsor besproken. Het gedrag van de dieren wordt tijdens en voor experimenten geobserveerd om vroegtijdig te kunnen ingrijpen bij eventueel ongerief.

E. 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 F.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Tijdens de operatie: bij niet meer zelfstandig ademen na een periode van ademhalingsondersteuning, of sterke bloedingen, wordt een humaan eindpunt toegepast.

Bij het plaatsen van een probe in het ruggenmerg: als tijdens het inbrengen van de canule de ademhaling onregelmatig wordt of zenuwen samentrekken.

Na de operatie en tijdens het experiment wordt een humaan eindpunt toegepast bij:

- het loskomen van probes, katheters of canules (tevens wetenschappelijk eindpunt);
- meerdere convulsies;
- gewichtsverlies (algemeen meer dan 15% gewichtsverlies, vlak na de operatie 20%);
- verlamningsverschijnselen

Bij algehele slechte conditie van het dier na operatie: combinatie van meerdere symptomen (op basis van parameters zoals vacht [zeer dof en ruw], veranderde oogkleur of huidskleur, lokale ontsteking, lichaamstemperatuur [met de hand voelbaar verhoogd of verlaagd]), zónder de bovengenoemde indicaties voor een humaan eindpunt, kan een experiment alleen doorgang vinden als het in dezelfde werkweek nog afgerond wordt en het dier getermineerd wordt, anders wordt een humaan eindpunt toegepast.

Voor tumormodellen geldt dat de tumor maximaal 10% van het normale lichaamsgewicht mag uitmaken en maximaal 2000 mm³ groot mag zijn. Indien er zweren optreden, mogen die maximaal 20% van het oppervlak van de tumor uitmaken. Mocht er gezwelvorming op een andere locatie dan de geïnoculeerde locatie gedetecteerd wordt, wordt een humaan eindpunt toegepast. Als er in de te verwachten tijd na inoculatie nog geen tumor te zien is, wordt ook een humaan eindpunt toegepast (bijvoorbeeld 1 maand).

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

Muis	15%
Rat	10%

F. Classificatie van ongerief

Benoem de experiment gebonden factoren die bijdragen aan het ongerief en geef voor elk van deze factoren aan hoe het ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig'. Geef per diersoort en behandelgroep het cumulatieve ongerief aan in percentages van het totale aantal dieren.

Bij de dieren die we laten bijkomen uit de anesthesie is het cumulatieve ongerief voor de dieren als matig in te schatten. De volgende aspecten van deze experimenten zijn meegenomen in de overweging voor de ongeriefclassificatie:

- Bijkomen uit anesthesie (matig)
- Postoperatief ongemak (licht tot matig)
- Postoperatieve individuele huisvesting (licht bij kortdurende experimenten, ook licht bij langetermijn-experimenten door speciale kooien met een geperforeerde tussenwand)
- Hanteren ten behoeve van monsterafname (licht)
- Toedienen van een teststof of tumor/xeno-transplantaat (licht)
- Hebben van een tumor tot 2000 mm³ (licht)
- Hebben van een kleine zweer (matig)
- Toedienen van een barbituraat onder anesthesie (terminaal)

In het geval van terminale procedures met tumormodellen is het cumulatieve ongerief voor de dieren als matig in te schatten. De volgende aspecten van deze experimenten zijn meegenomen in de overweging voor de ongeriefclassificatie:

- Toedienen van een teststof of tumor/xeno-transplantaat (licht)
- Hebben van een tumor tot 2000 mm³ (licht)
- Hebben van een kleine zweer (matig)
- Toedienen van een barbituraat onder anesthesie (terminaal)

In het geval van terminale procedures met vooraf doseren is het cumulatieve ongerief voor de dieren als licht in te schatten. De volgende aspecten van deze experimenten zijn meegenomen in de overweging voor de ongeriefclassificatie:

- Toedienen van een teststof (licht)
- Toedienen van een barbituraat onder anesthesie (terminaal)

In het geval van terminale procedures: terminaal.

Percentages van het totale aantal dieren:

Matig 85%

Licht 5%

Terminaal 10%

G. 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	<p>Diervrije alternatieven zoals computermodellen, <i>in vitro</i> tests, <i>organ-on-a-chip</i> worden wel in het voortraject gebruikt, om verschillende eigenschappen van de teststoffen te onderzoeken. Vooralsnog kan geen van deze methodes de informatie geven die we in deze experimenten verzamelen, en die essentieel is voor de verdere ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen.</p> <p>Het uiteindelijke testen van een potentieel geneesmiddel moet vooralsnog in een intact organisme gebeuren, zodat de volledige fysiologie en ook potentiële bijwerkingen kunnen worden vastgesteld. De kinetiek van farmaca wordt in grote mate bepaald door de doorbloeding van de organen, bovendien kan het zijn dat de teststof in het lichaam een secundair (off-target) effect heeft, waardoor de <i>in vitro</i> gemeten reactie <i>in vivo</i> niet plaatsvindt of wordt geremd of juist versterkt. Alleen teststoffen die in <i>in vitro</i> testen veelbelovend zijn, worden ingezet in dierproeven.</p>
------------	--

Vermindering	<p>Door het gebruik van canules voor herhaalde bemonstering in plaats van alleen monsters te verzamelen na termineren, bereiken we een belangrijke vermindering van het aantal proefdieren. Bij bijvoorbeeld een studie met 6 meetpunten in 4 groepen met een groepsgrootte van 5, zijn in plaats van 120 dieren nog 20 dieren nodig, een reductie van ruim 80%.</p> <p>Daarbij kunnen gemeten waarden over de tijd en in de verschillende compartimenten binnen het dier met elkaar gecorreleerd worden. Bovendien zorgt het herhaald bemonsteren uit één dier voor een verminderde variatie in de data. Hierdoor zijn kleinere groepsgroottes nodig, wat leidt tot een verdere besparing.</p> <p>Ook zijn de operatietechnieken in de afgelopen jaren verder ontwikkeld waardoor meer canules per dier geplaatst kunnen worden en deze langer functioneel blijven. Tenslotte worden meetmethodes continu verbeterd om in de kleine monstervolumina steeds meer analyten te kunnen meten.</p>
Verfijning	<p>Microdialyse en canulatie zijn verfijnde methodes omdat na de plaatsing van de canules herhaalde monsters uit verschillende compartimenten genomen kunnen worden. Gedurende het hele experiment worden de dieren gemonitord op tekenen van ongerief. Alle handelingen aan de dieren, waaronder operaties, hanteren, monitoren, monsterafname, en termineren worden volgens vaststaande protocollen uitgevoerd door bevoegde en goed getrainde medewerkers.</p> <p>Specifiek voor teststoffen met een oncologisch oogmerk is een tumormodel het meest verfijnde model om farmacokinetische en farmacodynamische eigenschappen te onderzoeken. Bij de keuze voor het juiste tumormodel hebben wij te allen tijde ruggenspraak met oncologische experts op een zusterlocatie van onze 5.1 lid2h</p>

Zijn er nadelige milieueffecten te verwachten?

Nee

Ja > Benoem de te verwachten milieueffecten en geef aan welke maatregelen zijn genomen om deze tot een minimum te beperken.

H. Hergebruik

Worden er dieren ingezet die eerder in een andere dierproef zijn gebruikt?

Nee, ga verder met vraag I.

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

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

Nee

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

I. Herhaling

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

n.v.t.

J. Plaats waar de dierproef wordt uitgevoerd

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder Wod valt?

Nee > Ga verder met vraag K.

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?

K. Bestemming van de dieren bij einde experiment

Worden de dieren gedood?

Nee > Beschrijf de bestemming van de dieren.

Ja > Geef aan waarom de dieren worden gedood.

Om na te gaan of de canule in het juiste doelweefsel is geplaatst moet dit weefsel terminaal worden vrijgeprepareerd en uitgenomen om hiervan een macroscopische beoordeling te doen. Ook worden bij veel van de experimenten analyses van terminale monsters (organen, weefsels, bloed, cerebrospinale vloeistof) gepland.

Indien dieren worden gedood, wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van Richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja > Betreft het een dodingsmethode die alleen onder specifieke voorwaarden mag worden toegepast?

Nee > Beschrijf de dodingsmethode

(Jong)volwassen dieren worden meestal onder isofluraananesthesie gedood door middel van een intracardiale barbituraat-overdosis of intracardiale perfusie. In geval van een HEP worden neonatale dieren gedecapiteerd en kan bij (jong)volwassen muizen en niet-volwassen ratten (tot 150 g) ook cervicale dislocatie gebruikt worden.

Ja > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Indien dieren worden gedood, maar niet in het kader van de proef, geef aan of herplaatsing is overwogen en waarom hiervan is afgezien.



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 in de 'Toelichting op de te gebruiken formulieren voor de aanvraag van een projectvergunning' 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.

5.1 lid2h

1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.

5.1 lid2h

1.3 Vul het volgnummer en de titel van de dierproef in.

Volgnummer	Titel dierproef
2	Biodistributie, farmacokinetiek en farmacodynamiek evaluatie na acute toediening

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.3 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Experimentele aanpak:

De onderzoeksvraag van de klant is voor veel van de te onderzoeken teststoffen het bepalen van de biodistributie en/of farmacodynamiek over de tijd na dosering. Onze instelling is gespecialiseerd in het uitvoeren van preklinische testen van potentiële nieuwe geneesmiddelen gebruikmakend van micro-chirurgische technieken. De dieren worden gedoseerd en over een periode geobserveerd, eventueel met incidentele bloedafname. Vervolgens worden terminale (weefsel)monsters genomen, meestal met behulp van microdissectie.

Primaire uitkomstparameters:

De primaire uitkomstparameters zijn de verzamelde gegevens over lichaamsgewicht en gedrag- en welzijnscores, evenals de verzamelde monsters.

Secundaire uitkomstparameters zijn gemeten concentraties van bijvoorbeeld gedoseerde stoffen en/of metabolieten (farmacokinetiek) en biomarkers (farmacodynamiek) in de verzamelde monsters. De verzamelde weefsels worden meestal verder opgedeeld in bijvoorbeeld individuele hersengebieden, zodat effecten lokaal bestudeerd kunnen worden. Deze analyses worden met behulp van geavanceerde technieken, zoals massaspectrometrie, ELISA (multiplexing) of qPCR, uitgevoerd. Dit kan binnen onze instelling, bij de klant en/of een andere instelling zijn.

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

Tijdens het onderzoek kunnen de volgende handelingen worden uitgevoerd (* voor optionele handelingen):

Acclimatisatie

Na aankomst in het vivarium krijgen de dieren de tijd om gewend te raken aan hun nieuwe kooi, voeding en andere omgevingsfactoren. Dit bevordert zowel het dierenwelzijn als de reproduceerbaarheid van experimentele resultaten. De acclimatisatiefase duurt minimaal 7 dagen.

Toediening teststof

De volgende toedieningsroutes worden (in overleg met de klant over de geschiktheid/toepasbaarheid voor de specifieke vraagstelling en eigenschappen van de teststof) **bij voorkeur** gebruikt:

- Intraperitoneaal, subcutaan, oraal, intraveneus.

Daarnaast kan, indien de al bekende eigenschappen van de teststof hiertoe aanleiding geven, gebruik worden gemaakt van:

- Intramusculair, rectaal, intranasaal.

- Onder anesthesie (routes vooral relevant voor teststoffen zoals adeno-associated-virussen en antisense oligonucleotiden): intracerebroventriculair, intracerebraal, intrathecaal, intra-cisterna-magna.

Hiervoor volgt de toediening de volgende stappen:

1. Voorbereidende fase: Het doelgebied wordt vrijgeprepareerd en een lokaal analgeticum toegepast.
2. Toedienen van teststof: Door middel van het stereotactisch positioneren wordt de naald of canule in het gewenste gebied geplaatst, vervolgens wordt de teststof met een vastgestelde infusiesnelheid geïnjecteerd.
3. Afrondende fase: De naald of canule wordt verwijderd en vervolgens wordt de incisie gesloten met hecht draad of weefsellijm. Bij het bijkomen uit de anesthesie worden de dieren warm gehouden door middel van een warmtemat en geobserveerd op tekenen van ongerief. Wanneer het dier volledig wakker is, wordt het teruggeplaatst in de home-cage met soortgenoten.

Klinische observaties en datacollectie

Na de toediening van stoffen worden de dieren geobserveerd, en meestal ook gescoord ten behoeve van datacollectie. Dit kan over een periode van enkele uren tot enkele maanden zijn (afhankelijk van de eigenschappen van de teststof). Hierbij wordt gekeken naar algemene klinische verschijnselen die op effecten van de toediening van de stof en/of verminderd welzijn kunnen duiden. Daarnaast kan er naar teststof specifieke verschijnselen gekeken worden. De dieren worden beoordeeld aan de hand van de door de IvD opgestelde beslisboom. Bevindingen worden vastgelegd in het welzijnsdagboek van ieder individueel dier en de studie-overview.

Afname van bloedmonsters *

In enkele gevallen zal, om de experimentele vraag te beantwoorden, gekozen worden voor het verzamelen van bloedmonsters. Bloedafname voor en/of na toediening van de teststof gebeurt bij voorkeur uit de staartvene (bij rat) of aangezichtsvene (bij muis). De afname van bloedmonsters is bij voorkeur beperkt tot maximaal 8 monsters van in totaal 10% van het totaal bloedvolume per 24 uur en tot een absoluut maximum van 15% van het totaal bloedvolume in 24 uur, waarbij boven de 10% vervangende vloeistof (fysiologische zoutoplossing) wordt gegeven volgens een door de IvD opgestelde werkinstructie en met de klant wordt gesproken over de noodzaak van de overschrijding van 10% van het bloedvolume. Een absoluut maximum van 20%, met vervangende vloeistof, kan alleen verdeeld over verschillende dagen afgenomen worden. Herstelperiodes zijn 7 dagen voor 7,5 tot 10%, 14 dagen voor 10 tot 15% en 21 dagen voor 15 tot 20%. Als leidraad voor de interne richtlijnen is gekeken naar Diehl (2001).

Termineren en weefselcollectie

Aan het eind van het experiment zullen de dieren onder inhalatie-anesthesie worden getermineerd met een barbituraat-overdosis. Dit gebeurt op een wijze in overeenstemming met bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Tevens kan er weefsel, terminaal bloed, en/of terminaal CSF worden uitgenomen voor verdere *ex vivo* bepalingen. Wanneer post-mortem weefsel zonder bloed moet worden uitgenomen, kan transcaderale perfusie onder inhalatie-anesthesie onderdeel uitmaken van het terminatieprotocol. Vaak wordt er microdissectie gedaan op de hersenen. Hierdoor kunnen analyses worden uitgevoerd specifiek op individuele hersengebieden.

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

Op basis van power-analyse en statistische post-hoc analyse is in het verleden de benodigde groepsgrootte bepaald. Deze loopt over het algemeen uiteen van 2 tot 12 dieren per groep (afhankelijk van de variatie in de concentratie van de te bepalen biomarker of teststof).

- Voor het correleren van metingen aan data van eerdere studies zijn vaak 2 tot 4 dieren voldoende.
- Voor de meeste stabiele biomarkers zijn data van 5 tot 6 dieren per dosering voldoende.
- Voor biomarkers waarvan bekend is dat basale concentraties sterk variëren, zijn data van 7 tot 12 dieren nodig.

Voor niet eerder geteste of bestudeerde biomarkers zou op basis van een pilotstudie de bio-analytische variatie moeten worden bepaald alvorens een power-analyse kan worden uitgevoerd.

B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, levensstadia, geschatte aantallen per levensstadium, geslacht, genetische wijzigingen en, indien van belang voor het behalen van de doelstelling, de te gebruiken stam.

Volgnr.	Diersoort	Herkomst	Levensstadium	Aantal	Geslacht	Genetisch gewijzigd	Stam
1	Muis	1) dieren	Neonataal-	3500		Nee	
2	Rat	gefokt voor	volwassen	2000	M/F	Nee	
3	Muis	onderzoek		500		Ja	

Onderbouw de bovengenoemde keuzes.

Diersoort	Onze instelling heeft expertise in het toepassen van microchirurgie en microdissectie in muizen en ratten. Voor de verschillende onderzoeken wordt per klant en per studie bepaald welke diersoort het meest geschikt is voor het beantwoorden van de specifieke vraag, gecombineerd met het minste te verwachten lijden (in aantal en individueel ongerief). Als (vervolg)studies naar een teststof met een specifieke soort of model gepland of gedaan zijn, worden deze studies zoveel mogelijk in dieren van dezelfde soort gedaan.
Herkomst	Alle dieren zullen worden verkregen van erkende instellingen voor het fokken van proefdieren.
Levensstadia	Over het algemeen worden er (jong)volwassen dieren ingezet. Meestal is dit de relevante leeftijd voor de te onderzoeken teststof. Daarnaast worden soms ook pasgeboren, of juist oudere dieren ingezet, wanneer het gaat bijvoorbeeld over afwijkingen die vanaf de eerste levensdagen moet worden bestreden met passende therapie, of juist later in het leven.
Aantal	Uitgaande van 12 studies per jaar met 10 groepen met groepsgrootte 10, verwachten we 1200 dieren per jaar, dus 6000 over een periode van 5 jaar in te zetten. Hiervan verwachten we 3500 muizen, 500 genetisch gewijzigde muizen en 2000 ratten.
Geslacht	Deze experimenten kunnen zowel in mannelijke als vrouwelijke dieren uitgevoerd worden. Bij het ontwerpen van de studie-opzet wordt met de klant het geslacht van de te testen dieren besproken en het wetenschappelijk belang van het onderzoeken van de effecten van potentiële geneesmiddelen in beide geslachten benadrukt. Voor de klant is het vaak belangrijk om de vergelijkbaarheid met eventueel voorafgaand uitgevoerde in vivo studies of opvolgende in vivo studies veilig te stellen. De klant zal in dat geval moeten aangeven dat een specifiek geslacht passender is in het totale ontwikkelingstraject.

Genetisch gewijzigd	<p>Volgnr. 1 & 2: niet van toepassing.</p> <p>Bij volgnr. 3: In sommige gevallen wordt de teststof onderzocht in een genetisch gemodificeerd model specifiek voor de afwijking. Het eventuele verminderde welzijn van deze dieren wordt altijd van tevoren beoordeeld in overleg met de IvD. Een voorbeeld van een zeldzame ziekte die op deze wijze onderzocht kan worden is de ziekte van Machado-Joseph, een neurodegeneratieve ziekte die zich op latere leeftijd openbaart. Hiervoor wordt gebruik gemaakt van bijvoorbeeld MJD84.2 dieren (B6;CBA-Tg(ATXN3)84.2Cce_Ibez], Cemal et al, Human Molecular Genetics 2002; 11: 1075-1094). Deze dieren worden ingezet voordat symptomen optreden, waarbij de behandeling erop gericht is om de symptomen geassocieerd met de genetische modificatie te voorkomen.</p> <p>Deze genetisch gewijzigde muizen zijn op de jongere leeftijd waarop ze worden ingezet levensvatbaar, vruchtbaar, van normale grootte en vertonen geen sterke fysieke of gedragsafwijkingen.</p> <p>In het geval een klant een studie wil laten uitvoeren met een ander model, kunnen in overleg met de IvD ook andere sterk gelijkende modellen ingezet worden. In het geval van nieuwe modellen zullen we, na overleg met de IvD, een melding of aanvraag tot wijziging indienen.</p>
Stam	De gebruikte stam wordt indien relevant gematcht aan die in andere onderzoeken van de klant.

C. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

Ja

Nee > 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.

Dieren worden standaard gehuisvest volgens de richtlijnen 2010/63/EU. In bijzondere gevallen, waar bijvoorbeeld gevochten wordt binnen een kooi, kan ervoor gekozen worden om de dieren in kleinere groepen of in het uiterste geval individueel te huisvesten.

D. Pijn en welzijnsaantasting

Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?

Nee >

Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

Indien de toediening onder anesthesie plaatsvindt, wordt passende pijnbestrijding toegepast. Een langwerkend systemisch analgeticum wordt voor aanvang gegeven en topicale analgesie op de plaats van incisie.

Na het bijkomen wordt optimale pijnbestrijding gecontroleerd op basis van uiterlijk en gedrag van de dieren. Extra pijnstilling wordt alleen gegeven als uiterlijk en gedrag van het dier daar aanleiding toe geven.

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

1. Bijkomen uit anesthesie is een bekende oorzaak van stress voor de dieren.
2. De andere bron van potentiële welzijnsaantasting zijn de te onderzoeken teststoffen en dosis, deze kunnen ondanks eerdere (veelal *in vitro*) testen nog onbekende bijwerkingen vertonen.
3. Bij gebruik van oudere dieren is het ook van belang om rekening te houden met leeftijdsspecifieke aantasting van het welzijn (bijvoorbeeld (maar niet uitsluitend) het ontstaan van gezwellen in oudere dieren).
4. Bij gebruik van genetisch gemodificeerde dieren, kan er intrinsieke welzijnsaantasting zijn. Dit wordt altijd van te voren beoordeeld.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

1. Oorzaken voor ongerief bij bijkomen uit anesthesie zijn gerelateerd aan de tijdelijk veranderde fysiologie van het lichaam, het lichaam heeft minimaal een aantal uren nodig om de homeostase te herstellen.
2. Oorzaak voor het onbekend zijn van mogelijke bijwerkingen is dat de stoffen die getest zullen worden zich vaak nog in een vroeg stadium van de geneesmiddelenontwikkeling bevinden en daarom vaak nog niet eerder (uitgebreid) in dieren getest zijn. Hierdoor kan het zijn dat er onverwachte negatieve bijwerkingen optreden bij bepaalde dosis. Indien een stof in onze studies ernstige bijwerkingen vertoont, wordt deze uiteraard niet toegelaten tot verdere testen.
3. Bij gebruik van oudere dieren: specifiek ongerief heeft meestal te maken met symptomen die ook bij oudere mensen worden waargenomen.
4. Intrinsieke welzijnsaantasting, bijvoorbeeld een ziektemodel dat symptomen vertoont.

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

1. Om het ongerief bij het bijkomen uit anesthesie te minimaliseren komen de dieren bij in een rustige en verwarmde omgeving waar ze toegang hebben tot voedsel en water. De dieren krijgen voor de anesthesie een pijnstillertoegevend. De dieren worden regelmatig gecontroleerd tot ze fit genoeg zijn om terug in hun groepskooi te worden geplaatst.
2. Negatieve effecten veroorzaakt door de teststof worden op vier manieren geminimaliseerd:
 - a) Voorafgaand aan het ontwerpen van de experimentele opzet wordt informatie van de klant gevraagd om zoveel mogelijk over de teststof te weten te komen. Dit is inclusief informatie die kan wijzen op het ontstaan van potentieel ongerief bij de dieren.
 - b) Tijdens de experimenten worden de dieren geobserveerd voor tekenen van ongerief en onbedoelde bijwerkingen. Hierbij wordt het dierenwelzijn ingeschat met behulp van een interne beslisboom. Wanneer noodzakelijk en zinvol zal extra verzorging en/of additionele analgesie worden toegepast.
 - c) In het geval dat er effecten optreden die niet zijn voorzien en/of zijn beschreven in de beslisboom wordt in overleg met de IvD en dierenarts gekeken naar mogelijkheden om het ongerief te verminderen, of indien nodig de dieren te termineren.
 - d) Door een goede experimentele opzet kan ervoor worden gezorgd dat niet alle dieren gelijktijdig worden ingezet bij aanvang van de studie (randomisatie, pilot-experimenten, versprongen toediening, eerst een lagere dosis toedienen).
3. Bij gebruik van oudere dieren: de noodzaak van inzet van deze dieren wordt vooraf in detail met de sponsor besproken. Het gedrag van de dieren wordt tijdens en voor experimenten geobserveerd om vroegtijdig te kunnen ingrijpen bij eventueel ongerief.
4. Waar mogelijk worden de dieren op een leeftijd ingezet waarin deze nog geen symptomen vertonen. Daarnaast wordt er van te voren beoordeeld of de te verwachten intrinsieke welzijnsaantasting van het model niet meer dan 'licht' is.

E. 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 F.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Tijdens toedieningen onder anesthesie: bij niet meer zelfstandig ademen na een periode van ademhalingsondersteuning, of sterke bloedingen, wordt een humaan eindpunt toegepast.

Tijdens bijkomen uit anesthesie na doseren:

- meerdere convulsies
- gewichtsverlies (algemeen meer dan 15% gewichtsverlies);
- persistente neurologische verschijnselen

Bij algehele slechte conditie van het dier na toediening: combinatie van meerdere symptomen (op basis van parameters zoals vacht [zeer dof en ruw], veranderde oogkleur of huidskleur, lokale ontsteking, lichaamstemperatuur [met de hand voelbaar verhoogd of verlaagd]), zónder de bovengenoemde indicaties voor een humaan eindpunt, kan een experiment alleen doorgang vinden als het in dezelfde werkweek nog afgerond wordt en het dier getermineerd wordt, anders wordt een humaan eindpunt toegepast.

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

Muis	1-5%
Rat	1-5%

F. Classificatie van ongerief

Benoem de experiment gebonden factoren die bijdragen aan het ongerief en geef voor elk van deze factoren aan hoe het ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig'. Geef per diersoort en behandelgroep het cumulatieve ongerief aan in percentages van het totale aantal dieren.

Bij de dieren die onder anesthesie gedoseerd worden is het cumulatieve ongerief voor de dieren als matig in te schatten. De volgende aspecten van deze experimenten zijn meegenomen in de overweging voor de ongeriefclassificatie:

- Bijkomen uit anesthesie na toediening (matig)
- Hanteren ten behoeve van monsterafname (licht)
- Toedienen van een barbituraat onder anesthesie (terminaal)

Bij de dieren die zonder anesthesie gedoseerd worden, is het cumulatieve ongerief voor de dieren als licht in te schatten. De volgende aspecten van deze experimenten zijn meegenomen in de overweging voor de ongeriefclassificatie:

- Hanteren ten behoeve van monsterafname (licht)
- Toedienen van een teststof (licht)
- Toedienen van een barbituraat onder anesthesie (terminaal)

Percentages van het totale aantal dieren:

Matig	70%
Licht	30%

G. 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	<p>Diervrije alternatieven zoals computermodellen, <i>in vitro</i> tests, <i>organ-on-a-chip</i> worden wel in het voortraject gebruikt, om verschillende eigenschappen van de teststoffen te onderzoeken. Vooral nog kan geen van deze methodes de informatie geven die we in deze experimenten verzamelen, en die essentieel is voor de verdere ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen.</p> <p>Het uiteindelijke testen van een potentieel geneesmiddel moet voornamelijk in een intact organisme gebeuren, zodat de volledige fysiologie en ook potentiële bijwerkingen kunnen worden vastgesteld. De kinetiek van farmaca wordt in grote mate bepaald door de doorbloeding van de organen, bovendien kan het zijn dat de teststof in het lichaam een secundair (off-target) effect heeft, waardoor de <i>in vitro</i> gemeten reactie <i>in vivo</i> niet plaatsvindt of wordt geremd of juist versterkt. Alleen teststoffen die in <i>in vitro</i> testen veelbelovend zijn, worden ingezet in dierproeven.</p>
------------	--

Vermindering	<p>Bij de opzet van elke studie worden de groepen en groepsgroottes, eventuele bloedmonsters, teststofdosages en doseringsschema's zorgvuldig gekozen om uit zo min mogelijk dieren alle benodigde informatie te verkrijgen. Door in de experimentele opzet randomisatie, pilotgroepen en verspringende administraties toe te passen, is het vaak mogelijk om eventuele uitval op te vangen zonder dat we gegevens missen voor bepaalde tijdstippen. Daarbij kan, specifiek voor studies waarin antisense oligonucleotiden getest worden, een stapsgewijze dosisverhoging worden geïncorporeerd. Het combineren van een dergelijke pilot met de uiteindelijke monsterverzameling biedt de mogelijkheid om de groep met de optimale dosis aan te vullen in plaats van een heel nieuw experiment te starten. Dit resulteert in een vermindering van 50% tot 75% van de dieren per dosagroep. Waar mogelijk wordt bij studies met meerdere teststoffen hetzelfde vehikel voor alle teststoffen gebruikt waardoor het aantal groepen gereduceerd wordt.</p> <p>De verzamelde gegevens over tijd (longitudinale observaties) en de gemeten waarden in de verschillende compartimenten, eventueel door microdissectie verkregen, kunnen binnen het dier met elkaar gecorreleerd worden.</p> <p>Verder worden meetmethodes continu verbeterd om in de kleine monsters steeds meer analyten te kunnen meten.</p>
Verfijning	<p>Gedurende het hele experiment worden de dieren gemonitord op tekenen van ongerief. Alle handelingen aan de dieren, waaronder operaties/toedieningen, hanteren, monitoren, monsterafname, en termineren worden volgens vaststaande protocollen uitgevoerd door bevoegde en goed getrainde medewerkers.</p> <p>Het scoren en monitoren van de dieren gebeurt zoveel mogelijk in de groepskooi met soortgenoten.</p>

Zijn er nadelige milieueffecten te verwachten?

Nee

Ja > Benoem de te verwachten milieueffecten en geef aan welke maatregelen zijn genomen om deze tot een minimum te beperken.

H. Hergebruik

Worden er dieren ingezet die eerder in een andere dierproef zijn gebruikt?

Nee, ga verder met vraag I.

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

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

Nee

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

I. Herhaling

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

n.v.t.

J. Plaats waar de dierproef wordt uitgevoerd

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder Wod valt?

Nee > Ga verder met vraag K.

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?

K. Bestemming van de dieren bij einde experiment

Worden de dieren gedood?

Nee > Beschrijf de bestemming van de dieren.

Ja > Geef aan waarom de dieren worden gedood.

Verzamelen van weefsels is essentieel om de werkzaamheid van de test stof en de aanwezigheid van de teststof te kunnen analyseren

Indien dieren worden gedood, wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van Richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja > Betreft het een dodingsmethode die alleen onder specifieke voorwaarden mag worden toegepast?

Nee > Beschrijf de dodingsmethode

(Jong)volwassen dieren worden meestal onder isofluraananesthesie gedood door middel van een intracardiale barbituraat-overdosis of intracardiale perfusie. In geval van een HEP worden neonatale dieren gedecapiteerd en kan bij (jong)volwassen muizen en niet-volwassen ratten (tot 150 g) ook cervicale dislocatie gebruikt worden.

Ja > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Indien dieren worden gedood, maar niet in het kader van de proef, geef aan of herplaatsing is overwogen en waarom hiervan is afgezien.



Advies aan CCD

Datum 17 december 2021
Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD202115538

Instelling: 5.1 lid2h
Onderzoeker: 5.1 lid2a
Project: Evaluatie van biodistributie, farmacokinetiek en farmacodynamiek van potentiële nieuwe geneesmiddelen
Aanvraagnummer: AVD202115538
Betreft: Nieuwe aanvraag
Categorieën: Translationeel of toegepast onderzoek

1 Inzicht in aanvraag en de eventuele knelpunten en risico's

Deze aanvraag is minder diepgaand getoetst vanwege een kwalitatief goed DEC-advies.

Proces	<p>Vragen projectaanvraag:</p> <ul style="list-style-type: none">- Wij verzoeken u om in de bijlagen aan te geven wat de maximale duur van de proeven en de individuele huisvesting zal zijn.- Op het aanvraagformulier hebt u als startdatum 01-02-2022 aangegeven een termijn van 5 jaar na de werkelijke startdatum aangevraagd. Indien de aanvraag eerder dan de aangevraagde startdatum wordt behandeld en toegewezen, heeft het dan uw voorkeur om de vergunning zo snel mogelijk in te laten gaan, of prefereert u de aangevraagde startdatum van 01-02-2022? <p>Vragen NTS:</p> <ul style="list-style-type: none">- De NTS bevat op enkele plaatsen nog technisch taalgebruik, zoals bijvoorbeeld bio-distributie, concentratie, monsters, canules en in vitro. Hierdoor wordt de NTS voor de gemiddelde Nederlander minder goed navolgbaar. Wij verzoeken u daarom om technische taal in de NTS te vervangen door meer toegankelijke termen.
---------------	--

Naam proef	Diersoort	Stam	Aantal dieren	Herkomst
3.4.3.1 Biodistributie, farmacokinetiek en farmacodynamiek evaluatie met gebruikmaking van canulatie				
	Muizen (<i>Mus musculus</i>)		1.500	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn
	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>)		1.500	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn
3.4.3.2 Biodistributie, farmacokinetiek en farmacodynamiek evaluatie na acute toediening				
	Muizen (<i>Mus musculus</i>)		4.000	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn
	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>)		2.000	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn

Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

3.4.3.1 Biodistributie, farmacokinetiek en farmacodynamiek evaluatie met gebruikmaking van canulatie

Muizen (*Mus musculus*) Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt. CITAAT. Deze experimenten kunnen zowel in mannelijke als vrouwelijke dieren uitgevoerd worden. Bij het ontwerpen van de studie-opzet wordt met de klant het geslacht van de te testen dieren besproken en het wetenschappelijk belang van het onderzoeken van de effecten van potentiële geneesmiddelen in beide geslachten benadrukt. Voor de klant is het vaak belangrijk om de vergelijkbaarheid met eventueel voorafgaand uitgevoerde in vivo studies of opvolgende in vivo studies veilig te stellen. De klant zal in dat geval moeten aangeven dat een specifiek geslacht passender is in het totale ontwikkelingstraject.

Ratten (*Rattus norvegicus*) Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt. Zie muizen.

3.4.3.2 Biodistributie, farmacokinetiek en farmacodynamiek evaluatie na acute toediening

Muizen (*Mus musculus*) Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt. zie 3.4.3.1.

Ratten (*Rattus norvegicus*) Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt. zie 3.4.3.1.

Locatie uitvoering experimenten	- Alle proeven vinden plaats in een instelling van een vergunninghouder. - Er zijn geen problemen bekend met de vergunninghouder.
--	--

2 DEC advies

DEC-advies	CITAAT C10. De dieren worden in principe verzorgd en gehuisvest op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. Maar in bijzondere gevallen, waar bijvoorbeeld gevochten
-------------------	---

wordt binnen een kooi, kan ervoor gekozen worden om de dieren in kleinere groepen of individueel te huisvesten.

CITAAT C11.

Het cumulatieve ongerief is goed ingeschat op basis het ongerief van de verschillende handelingen tezamen die nodig zijn om het onderzoek uit te voeren. De DEC heeft gediscussieerd over de praktijk van een 24-uurs kinetiekstudie van bijv. een oraal gegeven farmacon, waarbij het een gegeven is dat altijd de meeste bloedmonsters kort na dosering afgenomen worden om het piekeffect en de eerste uitwasfase te kunnen meten; de latere meetpunten (bijv. 9, 16 en 24 na dosering) liggen dus op flinke afstanden van elkaar. Maar het spreekt voor zich dat de eerste monsters via dezelfde katheter afgenomen worden. Dit had wat beter uitgelegd kunnen worden, maar de DEC accepteert dit, omdat de onderzoeksinstelling over alle specialistische ervaring terzake beschikt en er vertrouwen is in het toezicht van de IVD.

CITAAT C14.

Dierproefvrije methoden worden waar mogelijk al ingezet om verschillende eigenschappen van de teststoffen te evalueren, maar om de biodistributie van de te onderzoeken teststoffen te onderzoeken is (nog) een proefdier noodzakelijk. Dit is voldoende beargumenteerd.

CITAAT C18.

In principe worden dieren van beide geslachten in gelijke mate worden ingezet. Bij het ontwerpen van de studie-opzet wordt met de opdrachtgever het geslacht van de te testen dieren besproken en het wetenschappelijk belang van het onderzoeken van de effecten van potentiële geneesmiddelen in beide geslachten benadrukt. Voor de opdrachtgever is het vaak belangrijk om de vergelijkbaarheid met eventueel voorafgaand uitgevoerde in vivo-studies of opvolgende in vivo-studies veilig te stellen. De opdrachtgever zal in dat geval moeten rechtvaardigen dat een specifiek geslacht passender is in het totale ontwikkelingstraject. (Zie ook onze vraag 19.)

Ethische afweging van de DEC:

1. rechtvaardigt het directe doel namelijk de bepaling van de biodistributie, farmacokinetiek en farmacodynamiek van potentiële farmaca in het lichaam om uiteindelijk geneesmiddelen te kunnen ontwikkelen, het ongerief van 150 muizen met terminaal, 1.275 met licht en 4.075 met matig ongerief en 150 ratten met terminaal, 675 met licht en 2.675 met matig ongerief?

2. De belangrijkste belanghebbenden zijn de proefdieren die deels onder

anesthesie worden gedood en deels een aantasting van welzijn (met bovengenoemd ongerief) en integriteit ondergaan, hetgeen een groot belang is.

Daartegenover staan de volgende belanghebbenden:

- de vergunninghouder die de experimenten in opdracht uitvoert met een economisch belang, maar de DEC kent daar een zeer geringe waarde aan toe;
- de opdrachtgever die met de verkregen data geschikte kandidaat-stoffen kan selecteren en hun toedieningsroute en dosis voor verder (pre)klinisch onderzoek kan bepalen, waaraan de DEC op zichzelf een geringe waarde aan toekent;
- de onderzoekers van de opdrachtgevers die hun kennis over de stoffen kunnen vergroten, en mogelijk gaan publiceren, belangen met een geringe waarde;
- de toekomstige patiënten waarvoor mogelijk een nieuwe of verbeterde behandeling mogelijk is. De DEC acht dit belang in dit stadium nog gering, maar als het onderzoek tot positieve gevolgen leidt, groot. Deze toekomstige patiënten zijn potentieel zeer groot in aantal, en daarmee raakt hun belang ook aan een substantieel belang van de samenleving.

3. De DEC heeft laten meewegen dat de vergunninghouder zeer ervaren is in opzet en uitvoering van de uit te voeren experimenten, en is overtuigd van de meerwaarde van het uitbesteden van dit type onderzoek aan een gespecialiseerd onderzoeksbedrijf door de gestandaardiseerde en gevalideerde proefopzet. De DEC acht het toekomstige belang voor patiënten groot, en is daarom mede op grond van het bovenstaande van oordeel dat de bepaling van biodistributie, farmacokinetiek, en farmacodynamiek van potentiële farmaca in het lichaam om uiteindelijk geneesmiddelen te kunnen ontwikkelen een groot belang vertegenwoordigt en dat dit grote belang opweegt tegen de aantasting van het welzijn en de integriteit van de proefdieren. Het gebruik van de proefdieren zoals beschreven in de aanvraag is daarmee gerechtvaardigd.

Het DEC advies is Positief

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

De volgende dilemma's zijn gesignaleerd door de DEC:

CITAAT E3.

De DEC heeft uitgebreid bediscussieerd in hoeverre het uiteindelijke doel

	beter gespecificeerd zou moeten worden dan nu het geval is. Dit is het ontwikkelen van nieuwe geneesmiddelen, maar het is voor het bedrijf onmogelijk te voorzien wélke geneesmiddelen. Na doorvragen heeft de DEC hier begrip voor gekregen en heeft zij er vertrouwen in dat er voldoende waarborgen zijn voor een goede omgang met deze handelingsruimte, door de toegelichte werkwijze bij nieuwe opdrachten en de betrokkenheid van de IvD. Zie bijvoorbeeld onze vragen 2 en 5 hierover.
--	--

3 Kwaliteit DEC advies

Kwaliteit DEC-advies	
Het DEC advies is duidelijk en goed navolgbaar. In het advies is op heldere en uitgebreide wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld. Bij de beantwoording van de beoordelvingsvragen verstrekt u een heldere onderbouwing, waardoor uw conclusies goed navolgbaar zijn. In het advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de discussies weer die in de DEC hebben plaatsgevonden en de ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen.	

4 Inhoudelijke beoordeling

Belangen-verstrengeling	Eén van de medewerkers van het Secretariaat heeft een arbeidsrelatie met deze vergunninghouder die minder dan 5 jaar geleden is beëindigd. Deze medewerker is niet betrokken geweest bij de behandeling van deze aanvraag.
--------------------------------	--

3V's

Er is in voldoende mate onderbouwd dat de doelstelling niet zonder dieren behaald kan worden en het project met zo min mogelijk dieren en zo verfijnd mogelijk wordt uitgevoerd.
--

Hergebruik	Er is geen sprake van hergebruik van dieren.
-------------------	--

Naam proef	Worden de dieren gedood?	Doden volgens richtlijn?
3.4.3.1 Biodistributie, farmacokinetiek en farmacodynamiek evaluatie met gebruikmaking van canulatie	Ja	volgens de richtlijn.
3.4.3.2 Biodistributie, farmacokinetiek en farmacodynamiek evaluatie na acute toediening	Ja	volgens de richtlijn.

Naam proef		
3.4.3.1 Biodistributie, farmacokinetiek en farmacodynamiek evaluatie met gebruikmaking van canulatie		
Muizen (Mus musculus)	Ongerief: 10,0% Terminaal 85,0% Matig 5,0% Licht	
Ratten (Rattus norvegicus)	Ongerief: 10,0% Terminaal 85,0% Matig 5,0% Licht	
3.4.3.2 Biodistributie, farmacokinetiek en farmacodynamiek evaluatie na acute toediening		
Muizen (Mus musculus)	Ongerief: 70,0% Matig 30,0% Licht	
Ratten (Rattus norvegicus)	Ongerief: 70,0% Matig 30,0% Licht	

5 Samenvatting

De projectaanvraag betreft het vervolg op een bestaand AVD [5.1 lid 2h](#). Hierop zijn afgelopen vijf jaar potentiële geneesmiddelen bestudeerd en een bijdrage geleverd aan het opstellen van farmacokinetische en farmacodynamische profielen van teststoffen. Onder deze vervolgaanvraag wil de aanvrager dit soort studies ten behoeve van geneesmiddelen tegen uiteenlopende humane ziekten continueren. Het projectvoorstel bevat voldoende informatie over het belang van het onderzoek, de strategie, de 3V's, het ongerief en de humane eindpunten om tot een oordeel te kunnen komen. Het DEC-advies kan als grondslag dienen voor het besluit.

Het kan zijn dat in bijlage 1 voedselrestrictie wordt toegepast bij orale toediening, indien van de teststof reeds bekend is dat het noodzakelijk is dat de dieren nuchter moeten zijn. In deze gevallen zullen dieren voor maximaal

8 uur gevestig worden. 5.2 lid1

Dieren kunnen individueel worden gehuisvest indien blijkt dat er onderling wordt gevochten. Ook zullen dieren in bijlage 1 individueel worden gehuisvest na de operaties, om beschadiging van canules te voorkomen. Deze proeven duren meestal maximaal 36 uur, maar kunnen langer duren. De maximale duur van een proef is niet benoemd, DE aanvrager is verzocht deze toe te lichten.

Het uitgangspunt van de projectaanvraag is dat beide geslachten zullen worden ingezet. Het kan voorkomen dat in een proef voor slechts één geslacht wordt gekozen uit wetenschappelijke overwegingen zoals de eigenschappen van de teststof of vergelijkbaarheid van resultaten met eerdere studies. 5.2 lid1

Het betreft ¹¹⁴⁰⁰ onderzoek. 5.2 lid1

De NTS bevat technische termen, de aanvrager is verzocht deze te vervangen door meer gangbare terminologie.

6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning

Het Secretariaat 5.2 lid1

De ingangsdatum van de vergunning kan niet voor de verzenddatum van de beschikking zijn en zal indien van toepassing aangepast worden. Dit is ook het geval bij een voorgenomen besluit.

7 Concept beschikking voor akkoord CCD