

5.1 lid2e

Van: info@zbo-ccd.nl
Verzonden: vrijdag 17 december 2021 14:06
Aan: 5.1 lid2e ; 5.1 lid2h
CC: 5.1 lid2e ; 5.1 lid2h
Onderwerp: Aanhouden AVD 5.1 lid2h 202115538

11

Geachte 5.1 lid2e

Op 27-10-2021 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Evaluatie van biodistributie, farmacokinetiek en farmacodynamiek van potentiële nieuwe geneesmiddelen" met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202115538. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In dit bericht leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

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

Niet technische samenvatting

- De NTS bevat 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.

Onduidelijkheden

- Wij verzoeken u om in de bijlagen aan te geven wat de maximale duur van de proeven en de individuele huisvesting zal zijn.

- Kunt u in bijlage 3.4.3.1, onder C. ook benoemen dat dieren mogelijk gevestigd zullen worden?

- 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?

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

Opsturen binnen veertien dagen

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van dit bericht op. U kunt dit aanleveren via NetFTP.

Wanneer een beslissing

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

Mocht u vragen hebben, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

5.1 lid2e

www.centralecommissiedierproeven.nl

Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag

.....
T: 0800 789 0789

E: info@zbo-ccd.nl

Geachte **5.1 lid2e**,

Op 27-10-2021 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Evaluatie van biodistributie, farmacokinetiek en farmacodynamiek van potentiële nieuwe geneesmiddelen" met aanvraagnummer AVD **5.1 lid2h** 202115538. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In dit bericht leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

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

Niet technische samenvatting

- De NTS bevat 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.

De NTS is op verschillende plekken aangepast om de bovengenoemde voorbeelden en ander technisch taalgebruik zoveel mogelijk te vervangen.

Onduidelijkheden

- Wij verzoeken u om in de bijlagen aan te geven wat de maximale duur van de proeven en de individuele huisvesting zal zijn.

Bijlage 1:

- Maximale duur van de experimenten is onder A bij "Toediening(en) van teststof" en bij "Monsterafname" beschreven.
- Maximale duur van solitaire huisvesting is beschreven bij C – en nu aangevuld voor "gescheiden sociale huisvesting".

Bijlage 2: De maximale duur van een experiment hebben we nu genoemd onder A bij "Termineren en weefselcollectie": Een experiment in deze bijlage duurt doorgaans 2-3 maanden en maximaal 5 maanden.

- Kunt u in bijlage 3.4.3.1, onder C, ook benoemen dat dieren mogelijk gevestigd zullen worden?

In bijlage 1 is bij C toegevoegd: 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 gevestigd worden.

- 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?

Aangezien de huidige aanvraag een vervolg is op de vergunning AVD **5.1 lid2h**, willen we graag een directe aansluiting van dit vervolg op de aflopende AVD **5.1 lid2h** vandaar zouden we graag de aangevraagde startdatum van 01-02-2022 aanhouden.

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

Opsturen binnen veertien dagen

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van dit bericht op. U kunt dit aanleveren via NetFTP.



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 lid2h 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 lid2h 02114908. 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 lid2h 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 postdosering monsters 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 (Partridge, 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 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		1500		nee	
3	Muis	onderzoek		500		ja	

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^{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. Deze wijze van huisvesting zal vanaf direct na de operatie tot het einde van dergelijke experimenten (maximaal 2 maanden) worden ingezet.

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.

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. Immundeficiënte 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 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.

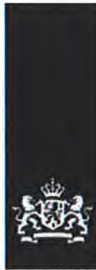
Ja > Betreft het een dodingsmethode die alleen onder specifieke voorwaarden mag worden toegepast?

Nee > Beschrijf de dodingsmethode

(Jong)volwassen dieren worden meestal onder 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.



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 hechtdraad 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, doorgaans 2-3 maanden en maximaal 5 maanden na toediening van de teststof, 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	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_IbezJ, 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	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. Vooralnog 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. 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.
------------	--

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 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.

5.1 lid2e

Van: 5.1 lid2e namens Info-zbo <info@zbo-ccd.nl>
Verzonden: maandag 27 december 2021 14:41
Aan: 5.1 lid2e info@zbo-ccd.nl; 5.1 lid2h
CC: 5.1 lid2e 5.1 lid2h
Onderwerp: RE: [External]: Aanhouden AVD 5.1 lid2h 202115538

15

Geachte 5.1 lid2e

Bedankt voor de reactie op onze vragen van 17 december. In de CCD vergadering van 23 december j.l. is uw aanvraag besproken en uit deze bespreking zijn nog enkele aanvullende vragen voortgekomen die ik graag namens de CCD aan u wil voorleggen, alvorens wij tot een besluit kunnen komen.

Niet technische samenvatting

- De CCD is van oordeel dat het doel van de aanvraag nog onvoldoende duidelijk is beschreven in de NTS. Kunt u de sectie 'Objectives of the project' verder uitwerken en bijvoorbeeld meer informatie geven over het soort geneesmiddelen dat mogelijk onderzocht zal worden onder deze vergunningsaanvraag?

Onduidelijkheden

- Kunt u in de bijlagen dierproeven, onder G., ook beschrijven hoe de inzichten uit het voortraject met diervrije alternatieven zullen worden ingezet om het aantal benodigde dieren voor in vivo proeven tot een minimum te beperken?

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

Met vriendelijke groet,

5.1 lid2e

Namens de Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl

Prinses Beatrixlaan 2 | 2595 AL | Den Haag
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag

T: 0800-789 0789

E: info@zbo-ccd.nl

Niet technische samenvatting

- De CCD is van oordeel dat het doel van de aanvraag nog onvoldoende duidelijk is beschreven in de NTS. Kunt u de sectie 'Objectives of the project' verder uitwerken en bijvoorbeeld meer informatie geven over het soort geneesmiddelen dat mogelijk onderzocht zal worden onder deze vergunningsaanvraag?

De tekst onder 'Objectives of the project' is aangepast:

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.

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.

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.

Onduidelijkheden

- Kunt u in de bijlagen dierproeven, onder G., ook beschrijven hoe de inzichten uit het voortraject met diervrije alternatieven zullen worden ingezet om het aantal benodigde dieren voor in vivo proeven tot een minimum te beperken?

In beide bijlages is onder G. bij Vervanging genoemd: Alleen teststoffen die in *in vitro* testen veelbelovend zijn, worden ingezet in dierproeven.

Bij Vermindering is nu toegevoegd: *Bij het ontwerp van iedere studie worden alle reeds bekende eigenschappen van de teststof (uit in vitro, in silico of eventuele in vivo experimenten) opgevraagd en meegenomen in de experimentele opzet. Het kan hierbij gaan om bijvoorbeeld de oplosbaarheid of de te verwachten tijdsspanne van verdeling en/of effecten van de teststof. Hierdoor hoeven in de dierproef minder variabelen getest te worden en kunnen de studies zo opgezet worden dat een maximale hoeveelheid data met zo min mogelijk dieren en groepen dieren gegenereerd kan worden. Na afloop van een studie kunnen de door ons verkregen resultaten gebruikt worden als invoergegevens voor bijvoorbeeld farmacokinetische/farmacodynamische modellen. Met behulp van zulke modellen kunnen voorspellingen gedaan worden waardoor in vervolgonderzoek (onder deze projectaanvraag of elders) mogelijk minder dieren kunnen worden ingezet.*

In bijlage 1 is nog toegevoegd: *Bij microdialyse ten behoeve van farmacokinetiek wordt altijd eerst een in vitro microdialyse experiment opgezet om de beste condities en de meetbaarheid van de teststof te bepalen, voordat de teststof in vivo ingezet wordt.*



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 lid2h 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 lid2h 02114908. 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 lid2h 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 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 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-	1000		nee	
2	Rat	gefokt voor	volwassen	1500	m/v	nee	
3	Muis	onderzoek		500		ja	

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^{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. Deze wijze van huisvesting zal vanaf direct na de operatie tot het einde van dergelijke experimenten (maximaal 2 maanden) worden ingezet.

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.

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 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>Bij het ontwerp van iedere studie worden alle reeds bekende eigenschappen van de teststof (uit <i>in vitro</i>, <i>in silico</i> of eventuele <i>in vivo</i> experimenten) opgevraagd en meegenomen in de experimentele opzet. Het kan hierbij gaan om bijvoorbeeld de oplosbaarheid of de te verwachten tijdsspanne van verdeling en/of effecten van de teststof. Hierdoor hoeven in de dierproef minder variabelen getest te worden en kunnen de studies zo opgezet worden dat een maximale hoeveelheid data met zo min mogelijk dieren en groepen dieren gegenereerd kan worden. Na afloop van een studie kunnen de door ons verkregen resultaten gebruikt worden als invoergegevens voor bijvoorbeeld farmacokinetische/farmacodynamische modellen. Met behulp van zulke modellen kunnen voorspellingen gedaan worden waardoor in vervolgonderzoek (onder deze projectaanvraag of elders) mogelijk minder dieren kunnen worden ingezet. Bij microdialyse ten behoeve van farmacokinetiek wordt altijd eerst een <i>in vitro</i> microdialyse experiment opgezet om de beste condities en de meetbaarheid van de teststof te bepalen, voordat de teststof <i>in vivo</i> ingezet wordt.</p> <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 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.



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 microchirurgische 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, doorgaans 2-3 maanden en maximaal 5 maanden na toediening van de teststof, 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 transcordiale 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	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 <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: 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_IbezJ, 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 gematched 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. 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 het ontwerp van iedere studie worden alle reeds bekende eigenschappen van de teststof (uit <i>in vitro</i>, <i>in silico</i> of eventuele <i>in vivo</i> experimenten) opgevraagd en meegenomen in de experimentele opzet. Het kan hierbij gaan om bijvoorbeeld de oplosbaarheid of de te verwachten tijdsspanne van verdeling en/of effecten van de teststof. Hierdoor hoeven in de dierproef minder variabelen getest te worden en kunnen de studies zo opgezet worden dat een maximale hoeveelheid data met zo min mogelijk dieren en groepen dieren gegenereerd kan worden. Na afloop van een studie kunnen de door ons verkregen resultaten gebruikt worden als invoergegevens voor bijvoorbeeld farmacokinetische/farmacodynamische modellen. Met behulp van zulke modellen kunnen voorspellingen gedaan worden waardoor in vervolgonderzoek (onder deze projectaanvraag of elders) mogelijk minder dieren kunnen worden ingezet. Bij de opzet van elke studie worden de groepen en groepsgroottes, eventuele bloedmonsters, teststofdoses 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 waardes 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 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.



Advies aan CCD

Datum 11 januari 2022

Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD202115538

Instelling: 5.1 lid2h
Onderzoeker: 5.1 lid2b
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.- Kunt u in bijlage 3.4.3.1, onder C ook benoemen dat dieren mogelijk gevestigd zullen worden?- 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.)

CITAAT VRAAG 19.

Vraag: 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?

Antwoord: 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.

Vraag: 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?

Antwoord: 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.

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 welke 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.

CITAAT VRAAG 2.

Vraag: 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?

Antwoord: 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.

CITAAT VRAAG 5.

Vraag: 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?

Antwoord: 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.

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 beoordelingsvragen 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 bestaande vergunning **5.1 lid2h**. Onder deze vergunning zijn de 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 zijn. In deze gevallen zullen dieren voor maximaal 8 uur gevestig worden. **5.1 lid2h**

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 de maximale duur van de proeven en individuele huisvesting toe te lichten.

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

Het betreft **5.1 lid2h** onderzoek. Het belang van de te testen stoffen is helder en wanneer de vraag over de maximale duur van de proeven is beantwoord is ook het ongerief voldoende ingekaderd. **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**

Terugkoppeling

Gedurende de looptijd van de vergunning moet u jaarlijks aan de CCD terugkoppelen welke geneesmiddelen onder deze vergunning zijn onderzocht en voor welke ziektebeelden deze middelen worden ontwikkeld. Deze terugkoppeling moet uiterlijk 15 maart door de CCD ontvangen zijn en rapporteert over het afgelopen kalenderjaar (1 januari - 31 december). Ook wanneer er geen dierstudies zijn uitgevoerd wordt dit gerapporteerd. De CCD kan op basis van deze terugkoppeling aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

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



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

5.1 lid2h
5.1 lid2e
5.1 lid2h



**Centrale Commissie
Dierproeven**
Postbus 93118
2509 AC Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0800 789 0789
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD **5.1 lid2h** 02115538
Bijlagen
3

Datum 11 januari 2022
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte **5.1 lid2e**

Op 27 oktober 2021 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Evaluatie van biodistributie, farmacokinetiek en farmacodynamiek van potentiële nieuwe geneesmiddelen" met aanvraagnummer AVD **5.1 lid2h** 202115538. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed. Uit artikel 10a, eerste lid van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) volgt daarom dat het is toegestaan om uw project uit te voeren binnen de gestelde vergunningsperiode. Deze vergunning wordt afgegeven voor de periode van 1 februari 2022 tot en met 31 januari 2027.

Aan de vergunning hebben wij de volgende voorwaarde verbonden op grond van artikel 10a1, tweede lid van de wet.

Terugkoppeling

Gedurende de looptijd van de vergunning moet u jaarlijks aan de CCD terugkoppelen welke geneesmiddelen onder deze vergunning zijn onderzocht en voor welke ziektebeelden deze middelen worden ontwikkeld. Deze terugkoppeling moet uiterlijk 15 maart door de CCD ontvangen zijn en rapporteert over het afgelopen kalenderjaar (1 januari - 31 december). Ook wanneer er geen dierstudies zijn uitgevoerd wordt dit gerapporteerd. De CCD kan op basis van deze terugkoppeling aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

De onderbouwing van deze beslissing vindt u onder 'Overwegingen'.

Procedure

Datum:

11 januari 2022

Aanvraagnummer:

AVD5.1 lid2h 02115538

Advies dierexperimentencommissie

Wij hebben advies gevraagd bij de dierexperimentencommissie 5.1 lid2h (hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 13 december 2021. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

Nadere vragen aanvrager

Op 17 december 2021 en 27 december 2021 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft tijdig antwoord gegeven. Het verzoek om aanvullingen had betrekking op de 3V's, de duur van experimenten en individuele huisvesting, de verzorging van de dieren, de implementatie van inzichten uit proefdiervrije alternatieven en de NTS. Uw reactie is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

Overwegingen

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de DEC, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

De vergunde termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat op het aanvraagformulier een termijn van 5 jaar na de werkelijke startdatum is aangevraagd.

Terugkoppeling

Omdat uit uw aanvraag niet blijkt welke stoffen u zal gaan onderzoeken, maar de uit te voeren handelingen wel omschreven zijn, is een voorwaarde opgenomen dat u jaarlijks aan de CCD moet terugkoppelen naar welke soort stoffen onderzoek plaats heeft gevonden. Deze voorwaarde is gesteld omdat de CCD graag een beeld wil krijgen van wat voor soort stoffen/experimenten worden uitgevoerd onder deze vergunning. Op deze wijze houdt de CCD zicht op het soort experimenten dat gedaan wordt en het soort stoffen dat getest wordt.

Bezwaar

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

Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 93118, 2509 AC Den Haag.

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

Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. Nadat u een bezwaarschrift heeft ingediend kunt u een voorlopige voorziening vragen bij de voorzieningenrechter van de rechtbank in de vestigingsplaats van de vergunninghouder. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisende situatie.

Datum:
11 januari 2022
Aanvraagnummer:
AVD 5.1 lid 2h 202115538

Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op <http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de vergunninghouder valt.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl, stuur een e-mail naar info@zbo-ccd.nl of neem telefonisch contact met ons op: 0800 789 0789.

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

5.1 lid 2h

drs. F. Braunstahl
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

- Projectvergunning
- DEC-advies
- Weergave wet- en regelgeving



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: 5.1 lid2h
Adres: 5.1 lid2h
Postcode en plaats: 5.1 lid2h
Deelnemersnummer: 5.1 lid2h

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 februari 2022 tot en met 31 januari 2027, voor het project "Evaluatie van biodistributie, farmacokinetiek en farmacodynamiek van potentiële nieuwe geneesmiddelen" met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202115538, na advies van dierexperimentencommissie 5.1 lid2h
De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is 5.1 lid2e Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 27 oktober 2021
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 13 december 2021;
 - b Bijlagen dierproeven
 - 3.4.3.1 Biodistributie, farmacokinetiek en farmacodynamiek evaluatie met gebruikmaking van canulatie, zoals ontvangen op 7 januari 2022;
 - 3.4.3.2 Biodistributie, farmacokinetiek en farmacodynamiek evaluatie na acute toediening, zoals ontvangen op 7 januari 2022;
 - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 7 januari 2022;
 - d Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 13 december 2021
 - e De aanvullingen op uw aanvraag, zoals ontvangen op 22 december 2021, 7 januari 2022.

Aanvraagnummer: AVD 5.1 lid 2n 02115538

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief
3.4.3.1 Biodistributie, farmacokinetiek en farmacodynamiek evaluatie met gebruikmaking van canulatie			
	Muizen (<i>Mus musculus</i>)	1.500	10,0% Terminaal 85,0% Matig 5,0% Licht
	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>)	1.500	10,0% Terminaal 85,0% Matig 5,0% Licht
3.4.3.2 Biodistributie, farmacokinetiek en farmacodynamiek evaluatie na acute toediening			
	Muizen (<i>Mus musculus</i>)	4.000	70,0% Matig 30,0% Licht
	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>)	2.000	70,0% Matig 30,0% Licht

Voorwaarden

Terugkoppeling

Gedurende de looptijd van de vergunning moet u jaarlijks aan de CCD terugkoppelen welke geneesmiddelen onder deze vergunning zijn onderzocht en voor welke ziektebeelden deze middelen worden ontwikkeld. Deze terugkoppeling moet uiterlijk 15 maart door de CCD ontvangen zijn en rapporteert over het afgelopen kalenderjaar (1 januari - 31 december). Ook wanneer er geen dierstudies zijn uitgevoerd wordt dit gerapporteerd. De CCD kan op basis van deze terugkoppeling aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

Geldende voorschriften

Wij wijzen u op onderstaande geldende voorschriften, die volgen uit artikel 1d, vierde lid, artikel 10, eerste lid en/of artikel 10a3 van de wet.

- Go/ no go momenten worden voor aanvang van elk experiment afgestemd met de IvD.
- Het is verboden een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is.

Aanvraagnummer: AVD S 1-0021 202115538

- Het is verboden dierproeven te verrichten voor een doel waarvan het belang niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend.
- Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.



Aanvraagnummer:

AVD5.1 11021 02115538

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

Volgens artikel 10c van de Wet op de Dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g, derde lid van de wet. Uit artikel 10b, eerste lid van de wet volgt dat de dierproeven zijn ingedeeld in de categorieën terminaal, licht, matig of ernstig. Als er wijzigingen in een dierproef plaatsvinden, moeten deze gemeld worden aan de Centrale Commissie Dierproeven. Hebben de wijzigingen negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn, dan moet volgens artikel 10a5, eerste lid van de wet de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven. Artikel 10b, tweede en derde lid van de wet schrijven voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister een ontheffing is verleend.

Verzorging

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

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

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

Pijnbestrijding en verdoving

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

Aanvraagnummer:AVD **5.1.1026** 02115538

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

Einde van een dierproef

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

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

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

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

5.1 lid2e

Van: info@zbo-ccd.nl
Verzonden: maandag 17 januari 2022 09:56
Aan: 5.1 lid2h
Onderwerp: Terugkoppeling over projectvergunningaanvraag AVD 5.1 lid2h 202115538

21

Geachte 5.1 lid2h

Op 27-10-2021 hebben wij een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het gaat om het project 'Evaluatie van biodistributie, farmacokinetiek en farmacodynamiek van potentiële nieuwe geneesmiddelen' met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202115538.

De CCD heeft de aanvrager aanvullende vragen gesteld. De aanvullingen hadden betrekking op de 3V's, de duur van experimenten en individuele huisvesting, de verzorging van de dieren, de implementatie van inzichten uit proefdiervrije alternatieven en de NTS.

De CCD heeft besloten de vergunning toe te wijzen. De aanvrager en verantwoordelijk onderzoeker zijn hierover ingelicht. De beschikking is verstuurd op 12-1-2022.

De vergunning wordt verleend onder de volgende voorwaarden:

Gedurende de looptijd van de vergunning moet u jaarlijks aan de CCD terugkoppelen welke geneesmiddelen onder deze vergunning zijn onderzocht en voor welke ziektebeelden deze middelen worden ontwikkeld. Deze terugkoppeling moet uiterlijk 15 maart door de CCD ontvangen zijn en rapporteert over het afgelopen kalenderjaar (1 januari - 31 december). Ook wanneer er geen dierstudies zijn uitgevoerd wordt dit gerapporteerd. De CCD kan op basis van deze terugkoppeling aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

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 beoordelingsvragen 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.

Omdat uit de aanvraag niet blijkt welke geneesmiddelen zullen worden onderzocht en voor welke aandoeningen, hebben wij besloten om een 5.1 lid2h voorwaarde aan de vergunning te verbinden.

Mocht u vragen hebben over onze beslissing, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

5.1 lid2e

www.centralecommissiedierproeven.nl

Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag

T: 0800 789 0789
E: info@zbo-ccd.nl