

Inventaris Wob-verzoek W21-03									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	Aanvraagdossier xxxx	reeds openb aar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
1	AVDxxxx wijziging aanvraagformulier 5 aug 2020				x		x	x	
2	Projectvoorstel				x	x		x	
3	Bijlage 1				x			x	
4	Bijlage 2				x			x	
5	Bijlage 3				x			x	
6	Bijlage 4				x	x		x	
7	Bijlage tabel diersoort en ongerief				x			x	
8	NTS		x						
9	Toelichting wijzigingsaanvraag				x		x	x	
10	E-mailwisseling advies- verzoek aan DEC				x		x	x	
11	E-mailwisseling aanvraag stukken				x		x	x	
12	E-mailwisseling aanvraag stukken				x		x	x	
13	DEC-advies				x		x	x	
14	E-mailwisseling aanvullende stukken				x		x	x	
15	E-mailwisseling aanvullende stukken				x		x	x	
16	Beslissing aanvraag 12 okt 2020				x		x	x	
17	Terugkoppeling DEC- advies				x		x	x	



10 AUG 2020

### Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

#### 1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen	10.2.g	
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde KvK-nummer	10.2.g 10.2.e	
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	Straat en huisnummer Postbus Postcode en plaats IBAN Tenaamstelling van het rekeningnummer	10.2.g	
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters Functie Afdeling Telefoonnummer E-mailadres	10.2.e	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters Functie Afdeling Telefoonnummer E-mailadres	10.2.e	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.

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

10 AUG 2020

**2 Over uw aanvraag**

- 2.1 Wat voor aanvraag doet u?
- Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3
- Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
- Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2 AVD 10.2.g
- Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
- Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3
- 2.2 Is dit een *wijziging* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor verleend is?
- Ja > Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier
- Nee > Ga verder met vraag 3
- 2.3 Is dit een *melding* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor is verleend?
- Nee > Ga verder met vraag 3
- Ja > Geef hier onder een toelichting en ga verder met vraag 6

**3 Over uw project**

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 1 - 1 - 2018
- Einddatum 31 - 12 - 2022
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- In vivo studies to enable and support regulatory testing programs for the safety evaluation of medicinal products, chemicals, plant protection products, biocides, medical devices, feed and foods.
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- 10.2.g
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC
- Postadres
- E-mailadres
- 10.2.g

## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?  Nieuwe aanvraag Projectvergunning € Lege  
 Wijziging € 1389,-- Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.  
*Bij een eenmalige Incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*
- Via een eenmalige Incasso  
 Na ontvangst van de factuur

## 5 Checklist bijlagen

10 AUG 2020

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
- Verplicht
- Projectvoorstel
- Niet-technische samenvatting
- Overige bijlagen, indien van toepassing
- Melding Machtiging
- Brief (5-8-2020)

## 6 Ondertekening

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

Centrale Commissie  
 Dierproeven  
 Postbus 20401  
 2500 EK Den Haag

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

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

Naam

10.2.e

Functie

10.2.e

Plaats

10.2.g

Datum

5 - 8 - 2020

Handtekening

10.2.e

10.2.g

10 AUG 2020

Aan: Centrale Commissie Dierproeven  
Postbus 93118  
2509 AC Den Haag

Van:

10.2.e

10.2.g

Betreft: Wijzigingsaanvraag behorende bij project(vergunning) AVD 10.2.g  
Bijlagen: 7

Datum: 5 augustus 2020

Geachte CCD,

Gaarne verzoeken wij u de onderhavige wijzigingsaanvraag behorende bij project(vergunning) AV 10.2.g (In vivo studies to enable and support regulatory testing programs for the safety evaluation of medicinal products, chemicals, plant protection products, biocides, medical devices, feed and foods) te beoordelen.

Samengevat vragen wij u toestemming om de verleende vergunning -over de periode 1 januari 2018 tot en met 31 december 2022- aan te passen ten aanzien van het aantal proefdieren, uit te breiden met een nieuwe regulatoire test voor onderzoek met de klauwkikker, alsmede het aanbrengen van een aantal tekstuele en technische aanpassingen.

De reden voor dit verzoek is gebaseerd op de ervaring opgedaan in de eerste twee jaren van de projectvergunningsperiode en op de huidige inschatting van de (inter)nationale marktvraag en de ontwikkelingen op het gebied van regelgeving.

Onze inschatting van het aantal benodigde proefdieren gemaakt in augustus 2017, blijkt na twee jaar voor een aantal diersoorten (muis, hamster, cavia, hond, kat) adequaat te zijn met een verbruik van minder dan 40% van het aangevraagde totaal. De huidige verwachting is dat voor deze diersoorten de (5-jaars) totalen afdoende zullen zijn.

Echter, voor de diersoorten rat (49%), konijn (80%) en vis (45%) ligt het verbruikspercentage nu reeds hoger dan destijds ingeschat en is de verwachting dat deze trend zich versterkt zal voortzetten. Een aparte vermelding verdient de klauwkikker (in voorgaande documentatie ten onrechte als klauwpad

aangeduid), waarmee in de eerste twee jaren nog geen studies werden uitgevoerd, maar waar gebaseerd op nieuwe vereisten in de regelgeving<sup>1\*</sup>, aanpassing in testdesigns en toevoeging van de OECD 241 Test (The Larval Amphibian Growth and Developmental Assay), naar verwachting de vraag vanaf dit jaar ruim zal stijgen boven het oorspronkelijk aangevraagde totaal (zie ook tabel 1).

Voornoemde ontwikkelingen hangen ons inziens nauw samen met een verhoogde vraag vanuit de (agro)chemische en farmaceutische industrie voor uitvoer van regelgedreven studies op basis van besluiten van de Europese Commissie voor chemische producten (ECHA) en instanties voor toelating van geneesmiddelen (EMA, FDA).

Meenden wij drie jaar geleden nog rekening te moeten houden met een klein aantal zogenoemde 'Extended One Generation Studies' (EOGRTS) met ratten, inmiddels worden er tientallen van deze omvangrijke (OECD 433) studies (tot ca 2370 ratten/studie) door de ECHA van de industrie gevraagd. Vaak met nog noodzakelijke voorstudies. Testcapaciteit in Nederland is met het wegvallen van de organisatie **10.2 g** eerder afgenomen. Mogelijk dat de **10.2 g** een rol heeft gespeeld bij de grote vraag die wij, **10.2 g** mogen ervaren, naast het feit dat onze opdrachtgevers aangeven deze specialistische en logistiek uitdagende studies graag aan ons toe te vertrouwen. Dit moge ook blijken uit het feit dat onze planning al tot ruim in 2021 reikt.

De verhoogde vraag naar de EOGRT studies betreft verder ook (OECD 414) teratologiestudies met ratten (max ca. 1520 ratten in hoofdstudie) en konijnen (max ca 960 konijnen in hoofdstudie). Als eerder aangegeven, is de aandacht en marktontwikkeling voor studies naar effecten op het milieu met vissen en klauwkickers sterk groeiende. Eenzelfde beeld zien wij op het gebied van de ontwikkeling van nieuwe medicijnen en vaccins, waarbij voor de studies met vaccins veelal het konijn als proefdier wordt ingezet.

Op basis van de opgedane ervaringen en geschetste (markt)ontwikkelingen komen wij in onderstaande tabel (1) tot de aangepaste aantallen proefdieren voor de diersoorten rat, konijn, klauwkikker en vis.

Tabel 1: Geschat aantal proefdieren over 5-jaars projectvergunningperiode. In rood staan de bijgestelde getallen weergegeven.

Geschat aantal proefdieren voor periode van 5 jaar	
Muis	22500
Rat	<del>190000</del> 256000
Hamster	200
Cavia	1600
Konijn	<del>22250</del> 62500
Hond	2600
Kat	750
Minivarken	1200
Klauwkikker	<del>2750</del> 10800
Vis	<del>22000</del> 30000

<sup>1</sup> \*PPP: Commission Regulation (EU) 2018/605 of 19 April 2018, entry into force from 10 November 2018

\*Biocides: Commission Delegated Regulation (EU) 2017/2100 of 4 September 2017, entry into force from 7 June 2018

\*Guidance for the identification of endocrine disruptors published jointly by EFSA and ECHA on 5 June 2018 (135 pages, 7 Appendices (A-G), 1 Excel template – update published in February 2019)

Bij dit schrijven is een zevental bijlagen toegevoegd, zijnde de complete oorspronkelijke projectvergunningaanvraag inclusief aanpassingen in rood.

- 1) 10.2.g format-nts 10.2.g W-f (met aanpassing in § 3.3)
- 2) 10.2.g aanvraag-projectvergunning-1.1 10.2.g W-f (als wijzigingsaanvraag; punt 1-6)
- 3) 10.2.g project-proposal-form-1.2-10.2.g W-f (met aanpassing in § 3.4)
- 4) 10.2.g appendix-description-animal-procedures-1.3-Appendix 1-General Toxicology 10.2.g W-f (met aanpassing in B en F)
- 5) 10.2.g appendix-description-animal-procedures-1.3-Appendix 2-Developmental and Reproductive Toxicology-10.2.g W-f (geen aanpassing)
- 6) 10.2.g appendix-description-animal-procedures-1.3-Appendix 3-ADME and DMPK-10.2.g W-f (met aanpassing in § 2A, 2B en F)
- 7) 10.2.g appendix-description-animal-procedures-1.3-Appendix 4-Ecotoxicology 10.2.g W-f (met aanpassing in § 2A, 2B, D, K en L).

Vertrouwende u hiermee voldoende te hebben geïnformeerd, zien wij gaarne uw reactie tegemoet.

Met vriendelijke groet,

10.2.e

10 AUG 2020

10.2.e

10.2.e 10.2.g

10.2.g

10.2.e 10.2.g

10.2.e 10.2.g

10.2.g

Aan: Centrale Commissie Dierproeven  
Postbus 93118  
2509 AC Den Haag

Van: 10.2.e  
10.2.g

Betreft: Wijzigingsaanvraag Projectvergunning AVI 10.2.g

Datum: 05 augustus 2020

Geachte CCD,

Bijgevoegd vindt u de Wijzigingsaanvraag inzake Projectvergunning AVD 10.2.g Dit betreft het document met de 'originale handtekening' op pagina 3.

Daarnaast zenden wij u de toelichting op de wijzigingsaanvraag, als integraal deel van de te beoordelen informatie.

Beide documenten zijn vandaag ook via de elektronisch beveiligde verbinding aan de CCD gezonden.

Gaarne zien wij de ontvangstbevestiging van dit schrijven tegemoet.

Vertrouwende u hiermee voldoende te hebben geïnformeerd, verblijf ik met vriendelijke groet,

10.2.e

10.2.e

10.2.g

10.2.g

10.2.e

10.2.g

10.2.e

10.2.g





## Form Project proposal

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

### 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 10.2 g
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. 10.2 g
- 1.3 Provide the title of the project. In vivo studies to enable and support regulatory testing programs for the safety evaluation of medicinal products, chemicals, plant protection products, biocides, medical devices, feed and foods.

### 2 Categories

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

### 3 General description of the project

#### 3.1 Background

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

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

(Adjustments are printed in red and green. The letter accompanying this application provides

detailed additional background information on these adjustments.)

#### Introduction:

To ensure the safety of humans, animals and the environment after exposure to industrial chemicals, pharmaceuticals, plant protection products, biocides, implantable medical devices, vaccines and food/feed (further referred to as 'substances'), national and international legislation requires (inter-)national authorities to assess information on safe manufacture and use of substances. National and international legal and scientific bodies / committees determine which information is needed to declare a product as being 'safe' or with a known acceptable risk. Most of this information is obtained via mandatory in-vivo safety assessment studies (further in this project referred to as 'toxicological studies') when no authority-approved in-vitro or ex-vivo alternative testing methods are available.

For pharmacological substances and vaccines, prior to the registration of product, data from pharmacokinetics and in-vivo ADME (absorption, distribution, metabolism and excretion) studies will be required for further development of the compound.

The in-vivo studies in this project comply to the following requirements:

- Legal requirements for animal toxicological research as described in (inter-)national Laws and Regulations;
- Technical Guidelines to define a framework in which the technical, scientific and quality standards are guaranteed and secured for in vivo testing.

#### Background:

[REDACTED] (> 350 staff members) specializes in safety research for new and existing drugs, chemical substances and agrochemical products. Clients are pharmaceutical, chemical and agro-chemical companies worldwide. [REDACTED] is both GLP (Good Laboratory Practice) and AAALAC (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care) certified.

[REDACTED] scientists have a broad experience in different aspects of the pharmaceutical and chemical development processes and are therefore able to provide clients with expert advice on the studies required and the design, execution and interpretation of such studies. They are also able to provide expert advice at key decision points of drug discovery and development, and chemical registration processes.

Clients require toxicological studies in order to ensure safety, and in case of pharmaceuticals / vaccines, to ensure efficacy as well. The information derived from these experiments are used to [REDACTED] candidates from further development, to remove [REDACTED] from the market (e.g. substances currently in use by patients or public), or from the environment where based on toxicological data, these substances have to be considered to pose an unacceptable risk by the relevant authorities.

The in-vivo studies in this project are part of human, animal and/or environmental safety research programs. This research is required by several national and international authorities such as the European Medicines Agency and US Food and Drug Administration, for substances and products intended for medical, veterinary or other use as consumption. These studies facilitate regulatory decisions, since the data generated are used to support risk assessment and the development programs of substances.

National and international guidelines are permanently subject to changes and [REDACTED] assures to make use of the most recently updated guidelines. An extensive list of applicable guidelines for toxicological studies with laboratory animals, covering studies being performed at [REDACTED], are available on the following websites:

- **ICH** (International Conference of Harmonisation);
- **OECD** (Organisation for Economic Co-operation and Development);
- **EC** (European Commission);
- **EMA** (European Medicines Agency);

- **FDA** (Food and Drug Administration);
- **EPA** (United States Environmental Protection Agency);
- **WHO** (World Health Organisation);
- Technical Guidelines as referred to in Appendices 1-4;
- and others.

The relevant (technical) guideline is dependent on the expected route of exposure of the substance to humans / animals / environment, the intended use of the substance (e.g. human pharmaceuticals, veterinary pharmaceuticals, (agro)chemicals, biocides, food ingredients, etc.) and on the above listed legislation. For an in depth understanding, it should be noted that not all guidelines are fixed, in particular, pharmaceutical guidelines provide the possibility to design the study to a specific information request, to specific substance-related properties and to the development phase of the substance. The results of the studies will be included in the dossier which will be evaluated for market registration by the regulatory authorities, for instance for pharmaceuticals in the Common Technical Document (CTD) for FDA authorization, or in the IUCLID (International Uniform Chemical Information Database) dossier for notification of chemicals under the European Chemical Agency (ECHA).

### 3.2 Purpose

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

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

The objective of this project is to authorize rodent and non-rodent (excluding non-human primates) studies to enable and support regulatory testing programs for the safety evaluation of substances, and to assess information on substances during manufacture and use.

When studies are requested in order to meet regulatory requirements, they will be performed in compliance with relevant national and international legislation. The guidance given in the various guidelines is followed in the design of safety evaluation programs and in the design of studies. The technical implementation of these studies are described in the test guidelines. The applicable test guideline depends on the exposure, the intended use of the substance and applicable legislation. The respective test guideline(s) will be listed in the study plan (protocol) of each study.

The program of work defined under this project proposal may take place early in the discovery stage (i.e. pre-clinical candidate selection and refinement), in later stages of development of substances (i.e. pharmacokinetic profiling for dose selection in advance of pivotal safety studies, clinical trials, or kinetic analysis to refine environmental residue models and acceptable intake levels), or for dose level selection purposes, and may therefore start at any point in the development process. Studies are performed to either directly meet the requirements of various regulatory authorities worldwide or as part of a robust supporting strategy used to evaluate research strategies.

In summary, studies under this project proposal will contribute to safe exposure of humans, animals and the environment to a wide range of substances (e.g. chemicals, biocides, plant production products, pharmaceuticals, vaccines, medical products, foods/feeds).

### 3.3 Relevance

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

The principal benefit of the project is the provision of data to facilitate development and/or regulatory decisions on, for example, clinical trial approval or marketing authorization for substances to which humans, animals and or the environment are/will be exposed. The in vivo studies requested in this project application are 'relevant contributions to safe products' and will support, based on observed toxicity levels, any regulatory and corporate decisions related to market approval and the safe use of the product in society.

The data generated are used to support risk assessment and to continue to facilitate the development of substances, thereby contributing to their safe use. The information derived from these studies may be used to preclude unsuitable candidates from development, to remove unsuitable existing compounds from the market or to prevent unsuitable substances from entering the market once they have been shown to pose an unacceptable risk. The information may also be used to replace existing hazardous substances on the market by less hazardous ones. For these purposes, the use of toxicological information from animal testing is considered socially relevant.

For pharmaceuticals, this ultimately contributes to safe products and innovations, which improve the health and quality of the life of humans and/or animals. For industrial and household chemicals and food/feed (ingredients, additives, etc.), it may inform on their safe handling, transport, use and consumption. For crop protection products, this translates to better targeted products that can safeguard and improve the yields of our food supply or reduce any potential negative impact upon ecosystems and the environment (i.e. including humans and animals). Further, (historical) data may be used as a reference in setting-up alternatives for animal testing.

### **3.4 Research strategy**

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

General strategy to design the study plan:

Before a study is initiated, the 'legal/regulatory need' of the in vivo animal study is evaluated. This will be done at an early stage, preferably during initial contact with the client. The applicability of guidelines, alternative(s) for animal testing and status of the substance (e.g. development or registration phase) and other specific information will be provided by the client. In Section 3.4.2, an overview of the (fifteen) items to be reviewed will be presented in order to assess the 'legal/regulatory need' of the in vivo animal study.

For each individual study, the design and experimental work plan is documented in a study plan. This is authorized by the Study Director (SD) with respect to the scientific objectives, project compliance and the 3Rs before scientific procedures commence, and is reviewed by the Animal Welfare Body (AWB). All known test substance characteristics (shared by the sponsor) and available background information (from sponsor and public available literature) will be taken into account in the design of the study. Based on the available information and applicable guideline, the most appropriate study design and end-points will be determined.

Studies are designed to obtain a maximum amount of data from the smallest number of animals. In general, the number of animals used for each study is considered to be the minimum needed to meet the aim of the study. In general, only one test substance will be tested under one study plan. However, certain study designs or test substances require a multiple number/combination of test substances, vehicles or routes of administration. If possible, identical studies with different test substances are combined to reduce the number of control groups, thus reducing the number of animals used. Certain study designs or test substances require (guideline driven) inclusion of a positive control group, and/or negative control group and/or reference test substance group. The AWB will be involved in the review of the study plan before the start of the study. The research strategy to be followed will depend on the purpose for use of the substance, and the applicable guidelines.

The selection of the animal species will be determined (inter alia) by:

- Applicable directive(s) / guidelines;
- Intended use of the substance;
- Animal species used in (other) toxicity/safety studies;
- Pharmacodynamic characteristics of the substance;
- In vitro metabolism data of the substance;
- Characteristics of vaccine/medical device.

Need for the study -according the guideline as mentioned in the appendices- will guide to species, number and sex:

**Choice of species:** In case of the use of genetically modified animals, this requirement should be justified. If multiple rodent/non-rodent species are considered appropriate for the aim of the study, the choice of species will be discussed with the AWB.

**Number of animals:** In general, the total number of animals used per study is based on the recommendations made in the applicable guidelines, and amongst authorities where commonly accepted group sizes are listed as the "default" number of animals required (for more detailed information, see Appendices 1-4 (Type of Animal Procedures)). Based on the numbers of animals used at [REDACTED] over the last first two (project) couple of years and the anticipated study requests for the remaining 3-year project period coming 5 years, the estimated total number of animals to be used at [REDACTED] (over the 5 year projected period) is given in the table below on the next page. Main driver for the adjusted numbers is the increased market demand for studies with rats and rabbits (largely developmental and reproductive studies) and studies with the clawed frog and fish (environmental studies). Trigger for this increase could be the fact that "Checks on more than 3,800 REACH dossiers have found that 32% for substances at tonnage levels of 1,000tpa and above were found to be non-compliant" (BfR workshop on data quality in registration dossiers, August 2018, Berlin: Communication No 030/2018 of 25 September 2018), warranting additional studies to be performed.

Further, test substance characteristics and available toxicological information will guide to route and dosing. This information will be described in the study plan.

Estimated maximum number of animals over the 5-year projected period	
Mouse	22500
Rat	<del>190000</del> 256000
Hamster	200
Guinea pig	1600
Rabbit	<del>22250</del> 62500
Dog	2600
Cat	750
Minipig	1200
Clawed frog	<del>2750</del> 10800
Fish	<del>22000</del> 30000

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

Prior to the start of the in vivo study the following (15) items will be evaluated:

- 1) **Substance identity:** a unique identifier (e.g. [REDACTED] structural formula) for the chemical or biological identity of the test substance is determined at this stage. Physico- and chemical properties may be collected.
- 2) **Intended use of the substance:** co-determines the applicable legislation.
- 3) **Most relevant route of exposure:** of human exposure is generally also used in animal testing. If justified, another less relevant route of exposure may be chosen, e.g. based on technical feasibility / practicality of the testing. In such case, it will be ensured that the study remains valid for its intended use. Sometimes multiple routes of exposure are relevant.
- 4) **Applicable jurisdiction(s):** in most cases the jurisdiction of the European Union, USA and / or Japan will apply. However, other jurisdictions are not considered exempt. Moreover, multiple jurisdictions may apply for the same information requirements. At this stage, the applicable jurisdiction will be determined, most often in consultation with the customer who is requesting the research.
- 5) **Applicable legislation(s):** in most cases the legislation of the European Union, USA and / or Japan will apply. However, no legislation of other countries are considered exempt. At this stage, a general distinction between chemical, pharmaceutical and food/feed legislation is made. The applicable legislation will be determined, most often in consultation with the client who is requesting the research. Updates/changes of these legislations will be regularly checked and implemented.

- 6) **Yearly production or import tonnage:** for chemicals, in the framework of REACH, the yearly production or import tonnage of a substance determines the legal information requirements, including those of toxicology.
- 7) **Stage of product development:** different stages of product development may require different legal information requirements.
- 8) **Legally required study type(s):** different legislation may require different study types or study durations for the same legal information requirement. The type of study or study package is selected from one or more of non-animal (not in this project) and 'animal testing procedures' as described in the Appendices 1-4.
- 9) **Availability of other toxicological or pharmacological information:** additional information can be used to help drafting an optimal study design and may preclude - exact- duplication of studies.
- 10) **Availability of alternatives to animal testing:** for those parts of the regulatory-driven toxicity studies, where authority approved alternatives are available and accepted by the appropriate jurisdiction (e.g., in vitro skin absorption test), these will be used. However, for the vast majority of the regulatory-driven toxicity studies, no authority approved alternatives are available as alternatives for animal testing.
- 11) **Applicable Technical Guideline(s):** by following the applicable Testing Guidelines (TG; e.g., OECD, OPPTS), the required tests are detailed into the standard study design. Each ultimate study design will be an interpretation of the TG and may vary with respect to animal number and use, also depending on the applicability of points 12-15 raised below. Updates in the TG will be checked regularly, implemented and referred to in the study plan.
- 12) **Applicability** 10.1.c Sometimes study designs are limited to only a part of the Technical Guideline, for example, when specific research into 10.1.c toxicity or mechanisms of toxicity is required. Usually these studies are supplementary to existing toxicity information, but are critical for the registration dossier.
- 13) **Laboratory animal species/strain:** The most relevant or most informative animal species are to be selected. Rodents (including genetically modified rodents) or non-rodents may be required. For example, for general toxicity studies, rodents (rat or mice) may be selected. The choice may depend, e.g. on the preference for the species used in previous testing (comparability of the studies), species-specific properties (e.g. 10.1.c in one 10.1.c warranting the toxicity testing in the same species). The species -sometimes multiple- is guideline driven for industrial chemicals and pharmaceuticals.
- 14) **Possibility of 10.1.c studies:** whether (parts of) studies can be 10.1.c without compromising the scientific validity (e.g. combining in vivo genotoxicity testing with general toxicity testing).
- 15) **Necessity of 10.1.c additional studies/groups:** The necessity of 10.1.c studies (e.g. 10.1.c studies), additional studies (e.g. 10.1.c studies) or additional groups (e.g. in case of 10.1.c studies using 10.2.g substances, 10.2.g control groups or in case of 10.2.g dose-effect relationships) is being established.

This project consists of four components as summarized below. A more detailed description is given in Appendices 1-4.

- Appendix 1: General Toxicology
- Appendix 2: Developmental and Reproductive Toxicology
- Appendix 3: ADME (Absorption Distribution Metabolism Excretion) and DMPK (Drug Metabolism Pharmacokinetics)
- Appendix 4: Ecotoxicology

Appendix 1 - General Toxicology: The study procedures are performed to determine toxicity of a test substance in a specific animal species, which provide part of a rational basis for toxicological risk assessment in man and animals. Results of studies are used to develop safety guidelines to reduce exposure risks for different populations. A wide spectrum of toxicology studies can be differentiated ranging from 10.2.g studies in e.g. rats, mice, rabbits, dogs, using various routes of administration (e.g. oral gavage, (intra)dermal, inhalation).

Appendix 2 - Developmental and Reproductive Toxicology (DART): The study procedures are performed to determine developmental and/or reproductive toxicity of a test substance in a specific animal species, which provide part of a rational basis for toxicological risk assessment in man. Results of DART studies are used to develop safety guidelines to reduce exposure risks for different populations, including pregnant women, infants and young children. Generally, DART studies can be divided into two types, which can sometimes be combined: 1) Developmental toxicity focuses on pre-natal development of the embryo or fetus. Toxicity may manifest as death of the embryo or fetus, abnormal development or birth defects or retardation of normal growth patterns and 2) Reproductive toxicity looks at all aspects of fertility. This includes the reproductive cycle, sexual behavior, gamete (sperm or egg) production and transport, fertility (including sperm quality and quantity), pregnancy outcomes, gestation, birth, lactation and maternal behavior. These studies also examine postnatal survival, growth and development of offspring. Some studies look at multiple generations to detect heritable effects.

Appendix 3 - ADME (Absorption Distribution Metabolism Excretion) and DMPK (Drug Metabolism Pharmacokinetics): ADME / DMPK studies are conducted to obtain adequate information on absorption, distribution, biotransformation (i.e. metabolism) and excretion of test substances, to relate concentration (or dose) and time course to the observed toxicity and to aid in understanding mechanism of toxicity. 10.2 g

10.2 g). Basic kinetic parameters determined in these studies will also provide information on the potential for accumulation of the test substance in tissues and/or organs and the potential of biotransformation following exposure to the test substance. Together with data from toxicity studies, these kinetic data provide a rational basis for risk assessment in man and animals. In addition, pharmacokinetic studies will provide data to evaluate the research program by supporting: candidate selection (whether or not a candidate should be developed); selection of formulations; treatment regimens, dose levels and/or routes of administration.

Appendix 4 - Ecotoxicology: The study procedures are performed to determine the toxicity of a test substance in a specific animal species (fish or frog), which provide part of a rational basis for environmental risk assessment. Ecotoxicology testing focusses on the three trophic levels in the food chain, being algae, daphnia and fish. Effects of test substances on either of these species will affect the environment. It is of high importance to know the toxicity of a test substance before and during production, transportation and use, to prevent, where possible, any unwanted effects on the environment.

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

Laws, regulations and guidelines are the main driver of the steps/milestones in a study or package of studies. In general, the first step consists of a small study of short duration and a limited number of animals. This will provide essential information on doses for subsequent studies, potential adverse effects and/or intrinsic hazards with the test item. Based on the outcome, further studies of longer duration (e.g. 10.2 g) are initiated. With each step, more test substance-related knowledge is obtained and applied (e.g. for dose level selection) in the next guideline driven study. For example, for pharmaceutical substances, following the selection of a clinical drug candidate, a number of preclinical Investigational New Drug (IND)-enabling studies are conducted.

Process and content of a study:

Each study is managed by a Study Director, an experienced and competent (according to the Law on Animal Experimentation (WoD)) scientist responsible for the overall design and conduct of the study, who works closely together with the client, contributing scientists and (bio)technicians. In the case of in-vivo studies, the AWB and the Designated Veterinarian (further referred to as 'Veterinarian') are consulted on questions regarding animal welfare and health. For the more complex studies (often pharma related) a 'pre-study briefing' is performed with the involved staff by the SD to ensure awareness/understanding of the study objectives and design by the animal staff. Specific attention will be paid to possible adverse effects of the substance, minimizing the severity, and being in-line with achieving study objectives.

In general; each in-vivo study is divided in different phases (details per type of study are included in the Appendices):

- An acclimation phase: animals will be habituated to their environment, which promotes both animal welfare and reproducible experimental results.
- A pretest phase: (most commonly included in non-rodent studies) administration of the substance and comparison of data with baseline details to refine the experimental set-up of the treatment phase.
- Treatment phase: substances and, if needed, 10.2 g control substances (or 10.2 g) are administered by scientifically relevant routes, followed by measurements, and/or collection of body fluids, excreta and/or organs/tissues for subsequent analysis.
- Recovery phase: to assess the reversibility of observed effects.

Further, for all phases, substances can be administered by varying routes, with frequency and duration varying from a single dose to repeated dosing for several weeks depending on study objectives. The most commonly used frequency is once daily, but it may range from once every selected period (e.g. once every two weeks) to multiple times per day. Duration of treatment ranges from one day up to 2 years. The route and frequency will be detailed in the study plan. Treatment in fasted or fed animals is possible depending on substance characteristics. During the pretest, treatment and/or recovery phase, besides the above mentioned administration of substances, sampling of fluids, surgical procedures such as the implantation of a catheter and measurements including ECG may be conducted. All treatment specifications and justifications will be documented in the study plan and will be subject to review of the Animal Welfare Body according to Wod art 10.1.3.

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

Serial number	Type of animal procedure
1	General Toxicology
2	Developmental and Reproductive Toxicology
3	ADME (Absorption Distribution Metabolism Excretion) and DMPK (Drug Metabolism Pharmacokinetics)
4	Ecotoxicology
5	
6	
7	
8	
9	
10	





## Appendix Description animal procedures

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

### 1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.

10.2.g

1.2 Provide the name of the licenced establishment.

10.2.g

1.3 List the serial number and type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
1	General Toxicology

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

### 2 Description of animal procedures

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

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

The study procedures are performed to determine the toxicity ('primary outcome parameter') of a test substance in a specific animal species, being part of a rational basis for toxicological risk assessment in man and occasionally in animals. Each general toxicology study consists of an acclimation phase and treatment phase. During acclimation phase, animals will be habituated to their environment which promotes both animal welfare and reproducible experimental results.

The treatment phase might be preceded by a pretest phase and followed by a recovery phase. A pretest period can be used to refine the experimental set-up if needed and allows treatment data being compared with baseline data. In the treatment phase test substances are administered by relevant routes, followed by specific observation of the animals and collection of body fluids, excreta and/or organs/tissues for subsequent analysis. Reversibility of effects can be assessed during a recovery phase. The study design depends on the applicable guideline used as specified in the project proposal.

**Table 1: Study types included in this appendix are:**

Study type	Goal
Condition finding	Optimizing study
Dose range finding and maximum tolerated dose	Determine the maximum tolerated dose and dose levels for repeated dose studies
(extended) Single dose	Determine toxicity after a single dose
Repeated dose (up to approx. 2 years)	Determine toxicity after multiple dosing

Prior to the start of a study the need for in vivo testing will be evaluated. As described in the project proposal, the 15-items checklist will be used to make this assessment.

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

Guidelines and Technical Documents e.g. from the ICH (International Conference of Harmonisation) and OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) provide guidance on animal species selection, dose level selection, frequency of dosing, and duration of treatment. During pretest, treatment and/or recovery phase the following type of animal procedures may be conducted:

- *Administration:* to achieve the study objectives animals may be sham dosed or receive vehicle, placebo or other appropriate substances in the pretest period. In the treatment period, co-administration of test-substances (e.g. to study anticipated combination treatments) or adjunctive administration of 'challenge substances' (adjuvants or positive control compounds for e.g. assessment of organ function or immunology) are possible as well. Substances will be administered by several routes, including but not limited to: oral (gavage, capsule, dietary) / by inhalation (nose only) / dermal (topical) / intra- intestinal via implanted cannula / buccal (oromucosal) / ocular / intranasal / intratracheal / rectal / vaginal / (amongst others), and by injection (intramuscular, intravenous, intra-arterial, perivenous, subcutaneous, intraperitoneal, intradermal) / infusion (intravenous, intra-arterial).

The most relevant route of exposure, in humans or in animals, is in most cases also the route of administration in the animal study. If justified, another administration route may be chosen; in that case it will be ensured that the project data remain valid for its intended use. In some cases, multiple administration routes are relevant (for instance, to compare with the intended parenteral human route of exposure): Unless otherwise specified, the administration of substances and the sampling procedures will be applied such that the severity will no more be than transient mild and that no lasting harm occurs.

Frequency of administration may vary from a single to repeated dose depending on study objectives. The most commonly used frequency is once daily, but it may range from once every selected period (e.g. once every two weeks) to multiple times per day. The frequency is based upon available literature, expected dosing regime in humans, experience, animal welfare considerations and advice of the AWB.

The duration of treatment is driven by applicable guidance documents. For pharmaceuticals, the duration of repeated dose toxicity studies depends on the duration of the proposed therapeutic use in humans or animals; for industrial chemicals, -amongst others- it depends upon the tonnage of production and/or import.

- *Clinical observation:* clinical signs will be determined at least once daily to assess the health condition of the animal. A functional observational battery like ECG, ophthalmoscopy or (modified) Irwin might be performed. These methods are being applied according to guidelines. Frequency of observations may be increased in case severity is increasing from mild to moderate.
- *Blood sampling:* blood may be sampled on one or more occasions (under anesthesia if applicable) using peripheral / superficial vessels, major blood vessels / an implanted cannula / cardiac puncture (procedure under terminal anesthesia). The purpose for blood collection is mostly to assess clinical pathology and to derive toxicokinetic parameters. The amount of blood collected will remain within the internationally accepted limits, according to animal ethical standard procedures and approved by the AWB.
- *Body fluids or excreta sampling:* may be performed at any time, as follows: excreta (faeces), urine by catheter, or voluntary using metabolism cages, gut lumen contents, expired air using a face mask, cerebrospinal fluid, tear fluid, vaginal smears or swabs, bronchoalveolar lavage fluid.

- *Confinement and restraint*: one or more of the following methods may be used: manual restraint, anti-interference collar or bag, application (followed by removal) of an occlusive/semi-occlusive dressing, fitting and removal of a jacket, purpose-made cradle or sling, short term separation (e.g., for observation purposes), single housing in case of males fighting or with scientific justification and permission of the AWB. For restraint regimes (e.g. in a restraining tube for dosing purposes i.e. in inhalation or infusions), this may be up to a total of 8 hours in a 24-hour period. For less confinement (e.g. single housing/metabolism cage) this may be up to 7 days, but on very rare occasions may be a maximum of 4 weeks i.e. dermal studies. If the route of administration requires a long duration of restraint, the animals will be trained for this restraint. Confinement will only be applied after consultation with the AWB. In any case, species/sex behavioural requirements will be taken into account.
- *Food and/or water deprivation*: may be withheld, and will be clearly documented in the study plan. Treatment under fasted or fed conditions might be referred depending on compound characteristics. The duration of fasting depends on the species and aim of the study and will be according to best practice procedures. If the maximum withholding period for water (8 hours) and of food (24 hours) is applied, this would usually be no more than once in a 1-day for water and 7-day period for food (exceptionally twice but not on successive days - unless food and water is being provided in the interim period).
- *Scarification/dermal abrasion* (e.g. tape stripping): may be performed but not exceeding 10% of the body surface area.
- *Patch, clamp or cuff application*: may be performed for a short duration for e.g. ECG or blood pressure recordings.
- *Exposure to artificial sun light*: may be performed for phototoxicity studies.
- *Removal of hair*: may be performed by chemical or mechanical procedures, in order to facilitate test substance administration (e.g. dermal dosing), to facilitate local observations and better exposure to light/air, as preparation for surgery and to improve recovery of underlying surface.
- *Temperature*: body temperature (e.g. rectal) may be measured using suitable devices.
- *Surgical preparation*: animals may undergo surgical cannulation of blood vessels, ducts, tracts (airway or esophagus) or hollow organs, with or without exteriorization. An adequate recovery time will be implemented.
- *Radio-active treatment*: rarely applied in general toxicity studies, except for the local lymph node assay (LLNA) where 3H-methyl thymidine is required, according to guideline.

All the above-mentioned procedures are described in Standard Operation Procedures (SOPs) which contain best practice procedures and are at least reviewed by Animal Welfare Body and study director. Compliance to these present SOPs will be monitored by Quality Assurance Officers, management, the study director and the Animal Welfare Body.

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

The total number of animals per group is based on recommendations in applicable guidelines and experience with toxicological studies; these group sizes are commonly accepted by regulatory bodies / market registration authorities across the world. Additional information which can influence the animal numbers used are: information from previous (pilot) studies by the manufacturer or by other companies, and product information and literature data about similar compounds. In addition, animal numbers may also be chosen on the basis of previous studies with a similar design. Where appropriate, study designs are further refined, in consultation with statisticians, to identify the minimum animal number to achieve

study objectives whilst avoiding the risk of needing to repeat a study through using too few animals and not meeting the study objectives. As a guidance, a "standard" number of animals per study is presented in Table 2. The precise number of animals per study will be justified in the study plan.

## B. The animals

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

### Species and origin:

*Rodents:* Mice, rats, guinea pigs and hamsters.

*Non-rodents:* rabbits, cats, dogs, (mini) pigs.

Animals will be obtained from certified international breeders/suppliers and will be transported by a registered and approved animal courier. [Next sentences are no longer applicable. Only cats from a 10.2.g are used and housed in the 10.2.g ] In case of PK or bioequivalence studies (Appendix 3) with a non-terminal endpoint and no or mild adverse effects, 10.2.g from a 10.2.g are used and are returned to this facility after study termination without (lasting) effects. This facility is located in The Netherlands and is known and registered by NVWA. 10.2.g are from a closed colony and undergo regular health monitoring. The use of these cats has advantages over the use of cats from 10.2.g : no naive cats need to be bred, no international transport is necessary and no cats need to be unnecessarily euthanized (since it concerns non-terminal studies) or adopted. The AWB will monitor the animal welfare, wash-out and return of these cats to the colony facility. External surgery models may be used and might be done internal or external (e.g. with implanted jugular vein catheter), which will be decided by AWB. If the study design, animals and severity allows, animals will be re-used or re-used animals will be included in accordance with legislation. The policy on the re-use of animals is documented in SOPs. Animals that had severe discomfort will not be re-used. The selected animal species depends on the applicable guidelines. The following considerations on the type of species to be used can be taken into account:

- In general, repeated dose toxicity studies shall be carried out in 10.2.g species of non-human vertebrate mammals;
- Toxicology/pharmacokinetic profile (including metabolites). E.g. for pharmaceuticals, the species with a 10.2.g most comparable with human kinetics, will be selected;
- Species used in previous in vivo studies;
- Species-specific properties 10.2.g

### Age and sex:

Age and sex of the selected animal species depends on the applicable guidelines. In general, the age should be representative for the human situation. Usually, young adult animals will be used, but if necessary, the age of the animals may be adapted to the required study design (e.g. for juvenile studies).

### Number of animals:

To optimize the study design and/or to refine the use of animals it might be necessary to perform an orienting experiment (condition finding test) prior to start of the main study. Examples of a condition finding test are: verifying the suitability of the animals concerned 10.2.g (10.2.g ) and/or the appropriateness of used compounds 10.2.g or procedures (10.2.g ). When a condition finding test is a reduced version of the main study regarding total number of animals, treatments, test items, and the severity does not exceed the maximum level in the main study, a condition finding test may be performed only after approval of the Animal Welfare Body (AWB).

As a guidance, a "default" number of animals per study is mentioned in the table (2) below (with dog and rat as examples) but comparable animal numbers apply for other non-rodent or rodent species:

**Table 2: examples of species, number of animals per type of study**

Study type:	Non-rodent (dog, cat, minipig, rabbit)	Rodent (rat, mouse, guinea pig, hamster)
Condition finding study	1-3 animals/group.	1-5 animals/group.
Dose Range Finding (DRF)	1 Male and 1 female dog	Up to 5 groups of 3 (fe)males per group

		In total max 15 rodents/ study.
Maximum Tolerated Dose study (MTD)	Groups of 1 male and 1 female dog (e.g. 2 naïve dogs at high dose, 2 range finding dogs at low dose)	2 Groups of 3 male and 3 female rats In total max. 12 rats/study.
Primary skin irritation and corrosion study <sup>3</sup>	1-3 rabbits/group Max. 18 rabbits/study.	1-3 animals/group Max. 18 animals/study.
Acute eye irritation and corrosion study <sup>3</sup>	1-3 animals/group Max. 18 animals (rabbit).	1-3 animals/group Max. 18 animals.
Acute systemic toxicity study <sup>3</sup>	1-5 animals/group Max. 50 animals (rabbit)	1-5 animals/group Max. 50 animals
Acute inhalation toxicity study <sup>3</sup>	1-5 animals/group. Max. 40 animals (rat)	1-5 animals/group. Max. 40 animals.
Assessment of contact hypersensitivity (Local Lymph Node Assay) <sup>3</sup>	NA (Not Applicable)	1-6 animals/group Max. 40 animals.
Assessment of contact hypersensitivity (GPMT and Buehler Assay) <sup>3</sup>	NA	1-20 animals/group Max. 40 animals.
Assessment of photoallergy (Buehler design) <sup>3</sup>	NA	1-20 animals/group Max. 50 animals.
Photoallergy study (Local Lymph Node Assay) <sup>3</sup>	NA	1-6 animals/group Max. 70 animals.
Phototoxicity study to determine effects on eyes and skin <sup>3</sup>	3-5 animals/group. Max. 50 animals (rabbit)	3-5 animals/group. Max. 50 animals.
Intravaginal or penile local tolerance study <sup>3</sup>	3 animals/sex/group Max. 12 (rabbit)	3 animals/sex/group Max. 12.
Oral mucosa irritation test <sup>3</sup>	NA	3 animals/group Max. 18 animals.
Assessment of local effects after implantation study <sup>3</sup>	3 animals/group Max. 18 animals (rabbit).	3 animals/group Max. 18 animals.
(Extended) Single Dose	1-3 Main animals/sex/group. 1-2 Recovery animals/sex in Groups 1 and 4 In total max. 32 animals.	1-10 Main animals/sex/group. 1-5 Recovery animals/sex in Groups 1 and 4. 5-6 Toxicokinetic animals/sex in Groups 2, 3 and 4 <sup>2</sup> . 3 Toxicokinetic animals/sex in control group <sup>2</sup> . In total max. 142 animals.
Repeated dose study >1-28 days	3-4 Main animals/sex/group. 2 Recovery animals/sex in Groups 1 and 4 In total max. 40 animals.	5-10 Main animals/sex/group. 5 Recovery animals/sex in Groups 1 and 4. 5-6 Toxicokinetic animals/sex in Groups 2, 3 and 4 <sup>2</sup> . 3 Toxicokinetic animals/sex in control group <sup>2</sup> . In total max. 142 animals.
Repeated dose study 90 days	3-4 Main animals/sex/group. 2 Recovery animals/sex in Groups 1 and 4 In total max. 40 animals.	10-20 Main animals/sex/group. 5 Recovery animals/sex in Groups 1 and 4. 5-6 Toxicokinetic animals/sex in Groups 2, 3 and 4 <sup>2</sup> .

Repeated dose 6-12 months	4 Main animals/sex/group. 2 Recovery animals/sex in Groups 1 and 4 In total max. 40 animals.	15-20 Main animals/sex/group. 5 Recovery animals/sex in Groups 1 and 4. 5-6 Toxicokinetic animals/sex in Groups 2, and 4 <sup>2</sup> . 3 Toxicokinetic animals/sex in control group <sup>2</sup> . In total max. 222 animals.
Repeated dose 18-24 months	NA	Main groups: 50 males, 50 females. Satellite groups: additional 6 males, 6 females per group for TK <sup>2</sup> . An extra 30-34 males and 30-34 females will be used as health check animals. In total max. 648 animals (in case of 5 groups).
Irwin study	NA	8 animals/group Max. 40 animals.
Respiratory safety study	NA	10 animals/group Max. 50 animals.
Vaccine study	4-6 Main /sex/group 3-5 Recovery /sex/group In total max. 66 animals <sup>1</sup> .	8-10 Main /sex/group 8-10 Recovery /sex/group In total max. 160 animals.
Collection of biological materials for in vitro tox studies	NA	A: Preparation of prostate / uterus cytosol from castrated / ovariectomized rats for in vitro testosterone / estrogen receptor binding studies. 100-150 rats*. B: Collection of tissues for genetic and in vitro toxicity studies like rat liver S9 fraction. 150-200 rats*. *Yearly, based on historic data.

*Note: above-mentioned number of animals is based on guidelines (minimum amount of animals required) and good practice. In general, studies of longer duration have large group sizes, as indicated by guidelines.*

- 1: *slightly more animals are required for rabbit vaccine studies to improve the detection sensitivity of e.g. immunogenicity measurements included in these studies.*
- 2: *in case the rodent species is smaller than a rat, e.g. mouse, more animals for 'toxicokinetic evaluation' will be included as only a limited amount of blood can be collected from these small animals. As a guidance a "standard" number of mice for toxicokinetic blood sampling is 9 satellite mice/sex/group/occasion. Sample volumes will be kept as small as possible (depending on the compound and the sensitivity of available bioanalytical method) to keep the number of additional animals as low as possible. When higher sample volumes are required, the number of satellite animals needs to be increased accordingly.*
- 3: *In case the results are not conclusive or classification is not possible, the study may be repeated once with the same number of animals.*

In general, common practice is to use the lowest number of animals to achieve the study goal (determine toxicity). More animals may be required than specified above either as addition or as replacement due to inclusion of spare animals, additional reference/recovery groups/positive or negative control groups, due to interim sacrifices, unexpected toxicity or health issues. Furthermore, depending on the detection sensitivity of the required biomarkers/measurements at issue, more animals may be necessary for a proper scientific evaluation. In case one or more of the above-mentioned criteria are applicable, the rationale/reason will be amended after consultation (and approval) of the AWB.

In case of a killed animal, which is not related to the study or treatment (with euthanasia of a planned study animal based upon a human endpoint), this animal may be replaced by a spare animal. Instead of inclusion of a positive control group, a positive control study (reliability check) might be performed. This will only be the case if this leads to a reduction in the total number of animals needed. A reliability check will also be performed in case essential modifications of the test system are necessary. The maximum number of animals included in a reliability check is 30. The estimated number of animals for this appendix 1 is about 50-60% of the total (excluding fish and frog) given in the Project Proposal.

### C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

If the study design allows, animals (mostly cats, dogs and minipigs and rabbits) will be re-used or re-used animals will be included. The policy on the re-use of animals is documented in SOPs. Animals used in severe procedures will not be re-used. The evaluation for re-use of animals will be made by the responsible veterinarian and AWB. The veterinarian will be notified in case any unexpected (clinical) signs have been observed in the previous study, or the severity score was more than moderate. Re-use can be performed within the same type of study or between different types of studies. A sufficient washout period will be taken into account based on the characteristics of the test substance. Unused spare animals may be used in other studies or for training of technicians (separate Project Proposal). Adoptions might be considered as well.

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

X No

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

### D. Replacement, reduction, refinement

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

02g is actively involved within the Dutch Three Rs centre, and regularly interacts with global regulatory agencies and European Lab Animal Science (FELASA) network, and thus is well positioned to encourage adoption and improvement of animal welfare best practice within regulatory testing and 02g

In the light of the NCad guideline 'Transitie naar proefdier vrij onderzoek', study designs are reviewed at regular intervals (in conjunction with changing guidelines or recommendations) as well as on an ad-hoc basis (in conjunction with the client) to incorporate available refinements, to minimise animal numbers or to reduce the severity level. The company is actively involved in cross-industry initiatives, aimed at sharing best practice and application of the 3Rs.

#### Replacement

Most studies are obligatory for registration of a test substance according to official guidelines or in support of clinical trials. If the guidelines allows the use of alternatives not involving animals, then these alternatives will –and have to– be used for registration purposes. Some in vivo study types have already been replaced by in vitro studies. In the most recent guidelines, however, no authority-approved alternatives are available for the studies described in this Project Proposal.

Several international legal and scientific bodies/committees determine which information is needed to evaluate the safety of a substance or product. Often no validated and authority approved alternatives are available and animal testing remains the only way to obtain the required information. The requested animal studies in this project application are all designed to support legally mandatory requirements for which alternative testing is not available. Where authority-approved alternatives are available and

accepted by the appropriate jurisdiction (e.g., in vitro skin absorption test), these will be used. As the development of alternatives is ongoing and regulatory authorities have different and changing policies in the acceptance of alternatives, updates/changes of these legislations will be regularly checked and implemented.

For meaningful and reliable evaluation of overall compound toxicity, target physiological systems must be intact, with complete neural and humoral controls modulating any responses. Thus far, in vitro and ex-vivo test systems remain insufficient for comprehensive determination of toxicity.

#### Reduction

The minimal number of animals used in a study is described in international guidelines. Studies are designed to obtain maximal information from the smallest number of animals. In general, the number of animals used in a full study is considered to be the minimum needed to satisfy evaluation criteria.

Study designs are reviewed at regular intervals (in conjunction with changing guidelines or recommendations) as well as on an ad-hoc basis (in conjunction with the client, statisticians) and updated to incorporate available refinements, to minimise animal numbers or to reduce discomfort.

When a study design has no terminal requirement, animals may be suitable for re-use, thereby saving the use of naïve animals. Animals used previously under this or other project licenses at this facility may be re-used provided the legal conditions for re-use are met. Re-use will be discussed and needs to be approved by the AWB.

#### Refinement

The main non-rodent species under this project are dogs and minipigs. The dog and minipig are the most commonly used non-rodent species for non-clinical safety and supplementary ADME programs, and are chosen because they have physiological, morphological, metabolic or pharmacokinetic/dynamic similarities with target species, when rodent species are scientifically or physiologically inappropriate. The main rodent species under this project is the rat. The rat is the commonly used rodent species for non-clinical safety and supplementary ADME programs (see also Appendix 3). Extensive historical use of this species has accumulated substantial experience and background data, which may facilitate the interpretation of experimental results; furthermore, its size permits repeated collection of analytical samples with minimal physiological impact, which in turn reduces the group size required to fulfil the scientific/regulatory objectives of the study.

Data on 10.1.c

Furthermore, predictive studies' such as tolerability and/or pharmacokinetic studies allow streamlining of the evaluation program and are often used to inform about candidate selection (whether or not a candidate should be developed). For substances in progress, these studies may be included in regulatory submissions as supporting studies.

Animal welfare is of utmost importance and Good Surgical Practice will be observed for any animal undergoing surgical procedures. Care is taken to provide species specific environmental enrichment (e.g. play items and shelters for rodents, and chew blocks and human interaction for dogs). Further, attention is given to evaluate environmental enrichment items and communicate on practices between sites.

Animals are checked multiple times per day to timely detect humane end points. In case an animal shows clear adverse effects or is in pain, the animal will be observed more intensively and a veterinarian will check the animal regularly. Small treatment such as cooling, supportive feeding, cleaning of wounds might be acceptable within the scope of the study.

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

The majority of animals are not expected to show signs of severe adverse effects of the test substances that impact on their general well-being. Selection of a suitable dose level will take into account any available data from other dose routes but assumptions have to be made in such extrapolation and occasionally unwanted adverse effects may arise from the selected dose level.



Studies involving therapeutic agents (pharmaceuticals, human and veterinary) with effects putatively caused by the compound, are likely to produce pharmacodynamic effects but without clinical signs and these would not be expected to persist for longer than 24 hours. Studies involving non-therapeutic substances (agrochemicals, food additives and industrial chemicals) may, as a side effect not directly related to their proposed biological or chemical action, also produce pharmacodynamic effects with severity levels from mild to severe, that will not be expected to persist for longer than 24 hours. Interventions, if needed, can be performed within this timeframe.

Analgesia or veterinary treatment will be performed if this is compliant with the study. The veterinarian and study director will be involved in the decision making for performing a treatment.

In the event of an animal showing severe clinical signs, study director, designated veterinarian and AWB can/will be involved deciding on either modification of study design, withdrawal from treatment, provision of preventative or therapeutic treatments, or humane killing (HEP) of affected animals.

## Repetition and duplication

### E. Repetition

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

Repetition of studies will be avoided as much as possible, which is also supported by legislation. The study history of the test substance will be queried (with the 15-item checklist) from the sponsor to avoid repetition. In case of (agro)chemicals the sponsor need to register a test substance at the authorities prior to study execution.

Repetition of a certain study could occur on incidental basis, for example when a previous study failed because of a contamination or poor execution by another **10.2.g**. In case of a significant alteration of the test substance or vehicle, which requires additional testing and consultation of the responsible regulatory authorities, this is not considered to be 'repetition'.

If a regulatory accepted study is already available, repetition of the study will not be beneficial for the client/customer/sponsor and therefore no repetition will be performed. For industrial chemicals, agrochemicals and biocides to be authorized in the European Union, there are specific Articles in Regulations and Directives to avoid duplicate testing. However, performance of studies in accordance with the latest test guidelines or on request of authorities or another jurisdiction cannot be completely excluded.

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

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

No

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

Male mice, rabbits, ~~surgically instrumented~~ (surgically) instrumented animals and animals with dermal/topical applications will be housed single in order to prevent fighting and/or damage to the instrumentation or dermal application. Other housing and care conditions will be in accordance with Directive 2010/63/EU. Animals will have visual, auditory and olfactorial contact where possible.

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

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

## Classification of discomfort/humane endpoints

### H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Anesthesia and analgesia will be used perioperative during surgery, anesthesia prior to euthanasia of animals and/or during blood/tissue collection (rodents). In general, no anesthesia or analgesia will be used as a relief for pain putatively caused by test substance as this is not compliant with the study objectives. Exception to this are acute ocular rabbit studies. If needed analgesia is used in eye or skin irritation studies when pain is expected or observed. Superficial/non-invasive methods can be used to reduce pain sensation, such as cooling of wounds.

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

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

Adverse effects caused by the test substance are commonly observed.

Explain why these effects may emerge.

The aim of the studies is to determine toxicity of a test substance. An adverse effect might occur with higher than expected severity during studies after test substance administration, but this is part of the assessment of toxicity.

In Maximum Tolerated Dose studies the aim is to achieve a dose level that is maximally tolerated by the animals (not reaching humane study endpoints).

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

The animals will be closely monitored in order to make sure that animals will be timely sacrificed according to humane endpoints, or treatment can be terminated or temporarily stopped for recovery purposes. A veterinarian will be involved during this process.

In response to developing unexpected discomfort, involvement of the Animal Welfare Body will be sought at the earliest possible stage when potential issues of concern arise or when unusual events (within the context of the study) first occur.

If scientifically and practically possible, animals will always be group housed (with exception of male mice and rabbits and during post-coitum for rats in DART studies (Appendix 2)) and a maximum level of cage enrichment will be applied according to animal needs, best practice and standards.

### J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

Animals that are showing stress or pain which is not expected to be temporary in nature or to become more transient, will be killed based on OECD guidance documents on humane endpoints (ENV/JM/MOMO/2000/7).

Indicate the likely incidence.

The incidence is estimated as very minimal (<1%), it depends strongly on the type of study and the test substance.

**K. Classification of severity of procedures**

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

The allowed cumulative severity classification for these studies will be moderate, at the most, depending on the study content and the animal procedures involved. For the large majority of studies the severity level is not expected to increase after administration of the test substance. For incidental early types of studies, such as acute toxicity testing, rising dose, or maximum tolerated dose studies, the severity level could occasionally increase to severe. Based on historical data at **020** the overall expected distribution (%) of severity levels for this appendix is expected to be: 40-45% mild; 50-55% moderate; <5% severe.

**End of experiment**

**L. Method of killing**

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

Animals will be killed at the end of the treatment period or after a recovery period. During necropsy, organs and tissues may be collected for histopathological examination. Additional tissue samples may be collected for future investigations/new research purposes (separate Project Proposal).

If mortality is not a study end point, an evaluation will be made to determine if an animal is suitable for re-use or training purposes.

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

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

X Yes



## Appendix Description animal procedures

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

### 1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.

10/20

1.2 Provide the name of the licenced establishment.

1.3 List the serial number and type of animal procedure.

Serial number

Type of animal procedure

2

Developmental and Reproductive Toxicology

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

### 2 Description of animal procedures

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

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

The study procedures are performed to determine developmental and/or reproductive toxicity of a test substance in a specific animal species, which provide part of a rational basis for toxicological risk assessment in man.

Each Developmental and Reproductive Toxicology (DART) study consists of an acclimation phase and treatment phase. The treatment phase might be preceded by a pretest phase and followed by a recovery phase. During acclimation phase animals will be habituated to their environment which promotes both animal welfare and reproducible experimental results. A subsequent possible pretest period allows treatment data comparison with baseline data. In the treatment phase test substances (and on occasion positive and/or negative controls substances or challenge materials like adjuvants are administered by scientifically relevant routes, followed by specific observation of the animals, collection of body fluids, excreta organs/tissues and/or fetuses/pups for subsequent analysis. Reversibility of effects can be assessed during a possible recovery phase. The study design and selected parameters depend on the applicable guideline used.

Studies conducted under this project may occur at different stages of the development/registration process. For test substances that are at an early stage, there will be little or no animal data available. Therefore, study design decisions may have to be made based on data from in vitro tests or from any available in vivo studies performed using the test substance. A cautious approach will therefore be adopted to minimize the severity of any responses and use of animals. For studies that are being performed at a later stage of development, where animal studies may have already been performed, decisions on study design can usually be made with a higher degree of confidence. Scientists will review the available data and advise clients on the selection of appropriate dose levels and develop the optimal

study design, to ensure that the procedures performed are of the minimum severity to achieve the objectives of the study. This will ensure that the studies will have a high probability of producing data that will enable decisions to be made about the suitability of the test substance for further development/registration and/or production.

The following study types are included in this appendix (according relevant guidelines):

- tolerability study in non-pregnant animals;
- prenatal developmental toxicity study including dose range finder (OECD 414), and embryo-fetal developmental toxicity study, including dose range finder and preliminary embryo-fetal developmental toxicity studies (ICH);
- dose range finding study;
- reproduction/developmental toxicity screening test (OECD 421);
- combined repeated dose toxicity study 28-day with reproduction/developmental toxicity screening test (OECD 422);
- two-generation reproduction study (OECD 416);
- extended one-generation reproductive toxicity study (EOGRTS; OECD 443);
- fertility study (ICH);
- pre- and postnatal development study (ICH);
- developmental neurotoxicity (DNT) study (OECD 426).

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

Several applicable guidelines provide guidance on dose level selection, frequency of dosing, duration of treatment, animal species selection, like OECD 414, 416, 422 and 443 for industrial chemicals, and ICH (S5) guideline for pharmaceutical products. During pretest, treatment and/or recovery phase the following type of animal procedures may be conducted:

- *Administration (of test substance)*: to achieve the study objectives animals may be sham dosed or receive vehicle, placebo or other appropriate substances in the pretest period. In the treatment period, co-administration of test-substances (e.g. to study anticipated combination treatments) or adjunctive administration (e.g. positive control compounds for assessment of organ function or immunology) are possible as well.

Substances will be administered by several routes, including but not limited to: oral (gavage, capsule, dietary) / by inhalation (nose only) / dermal (topical) / intra- intestinal via implanted cannula / buccal (oromucosal) / ocular / intranasal / intratracheal / rectal / vaginal, and by injection (intramuscular, intravenous, intra-arterial, perivenous, subcutaneous, intraperitoneal, intradermal) / infusion (intravenous, intra-arterial).

The most relevant route of exposure, in humans or in animals, is in most cases also the route of administration in the animal study. If justified, another administration route may be chosen; in that case it will be ensured that the project data remain valid for its intended use. In some cases, multiple administration routes are relevant (for instance, to compare with the intended parenteral human route of exposure). Unless otherwise specified, the administration of substances and the sampling procedures will be applied such that the severity will no more be than transient mild and that no lasting harm occurs.

Frequency of administration may vary from a single to repeated dose depending on study objectives. The most commonly used frequency is once daily, but it may range from once every selected period (e.g. once every two weeks) to multiple times per day. The frequency is based upon available literature, expected dosing regime in humans, experience, animal welfare considerations and advice of the AWB.

The duration of treatment is driven by applicable guidance documents. For pharmaceuticals, the duration of repeated dose toxicity studies depends on the duration of the proposed therapeutic use in humans or animals; for industrial chemicals, -amongst others- it depends upon the tonnage of production and/or import.

- *Clinical observation*: clinical signs will be determined at least once daily to assess the health condition of the animal. In order to determine the effects of a test substance more thoroughly a functional observational battery, (modified) Irwin, automated acoustic startle test and/or learning & memory test (e.g. water-filled Biel Maze) might be performed. These methods are set up according to guidelines. Frequency of observations may be increased in case severity is increasing from mild to moderate.
- *Blood sampling*: blood may be sampled on one or more occasions (under anesthesia if applicable) using peripheral / superficial vessels, major blood vessels / an implanted cannula / cardiac puncture (procedure under terminal anesthesia) / decapitation (for fetuses and young pups). The purpose for blood collection is mostly to assess clinical pathology and to derive toxicokinetic parameters. The amount of blood collected will remain within the internationally accepted limits, according to animal ethical standard procedures and approved by the AWB.
- *Body fluids or excreta sampling*: may be performed at any time, as follows: excreta (faeces), urine by catheter, or voluntary using metabolism cages, gut lumen contents, cerebrospinal fluid, tear fluid, vaginal smears or swabs, bronchoalveolar lavage fluid.
- *Milk sampling*: samples may be obtained on one or more occasions from lactating rats (usually on postnatal day 10). The dam will be separated from their litter, they will be dosed with the test substance and milk will be sampled at a specific time point after dosing (based on toxicokinetic properties of the test substance). In general, this will be done following stimulation of milk ejection by massage of one or more nipples.
- *Collection of fetuses*: for assessment of developmental toxicity, fetuses will be collected at the end of the post-coitum period by caesarian section and might be subjected to detailed fetal examinations.
- *Confinement and restraint*: one or more of the following methods may be used: manual restraint, anti-interference collar or bag, application (followed by removal) of an occlusive/semi-occlusive dressing, fitting and removal of a jacket, purpose-made cradle or sling, short term separation (e.g., for observation purposes), single housing in case of males fighting or with scientific justification and permission of the AWB. For restraint regimes (e.g. in a restraining tube for dosing purposes i.e. in inhalation or infusions), this may be up to a total of 8 hours in a 24-hour period. If the route of administration requires a long duration of restraint, the animals will be trained for this restraint. For rats, confinement such as metabolism cages will normally be limited to a maximum of 24 hours. Single housing may be up to 7 days, but on very rare occasion may be a maximum of 4 weeks. With the exception of single housing during a dermal exposure study, in which the confinement may be up to 10 weeks for females. As explained under F, rabbits will be single housed. In any case, species/sex behavioural requirements will be taken into account.
- *Culling*: to reduce variability among the litters, culling might be performed. Usually this is done on postnatal day 4 at which eight (or ten) pups from each litter of equal sex distribution (if possible) will be randomly selected to continue on the study. Of two surplus pups blood samples will be taken. The remaining surplus pups will be euthanized immediately, internal sex will be determined and a macroscopic evaluation performed. These surplus pups may be used for training purposes of terminal procedures like tissue/body fluid collection (separate Project Proposal).
- *Food and/or water deprivation*: may be withheld, but will be clearly documented and justified in the study plan. Treatment under fasted or fed conditions might be referred depending on compound characteristics. The duration of fasting depends on the species and aim of the study and will be according to best global practice procedures. If the maximum withholding period for water and of food is applied, this would usually be no more than once in 24 hours for water and 7-day period for food (exceptionally twice but not on successive days - unless food and water is being provided in the interim period). In case overnight fasting is applied during lactation, the pups can be euthanized one day before the fasting period.

- *Body temperature* (e.g. rectal) may be measured.
- *Vaginal lavage*: may be performed to determine the stage of estrous (once or daily for determination of cycle), day of first estrus or outcome of mating.
- *Endocrine disruptor parameters*: anogenital distance may be measured (usually for rat pups on postnatal day 1), the number of areola/nipples may be examined (usually for male rat pups on postnatal day 13), age at vaginal opening may be assessed (usually for female rats beginning on postnatal day 25), and age at balanopreputial separation may be assessed (usually for male rats beginning on postnatal day 35).
- *Patch/clamp or cuff application*: may be applied for a short duration for e.g. ECG or blood pressure recordings.
- *Removal of hair*; may be performed by chemical or mechanical removal in order to facilitate surgical interventions, local observations, better exposure to light/air, facility test substance administration, e.g. dermal dosing, and/or support recovery of underlying surface.
- *Surgical interventions*: animals may undergo surgical cannulation interventions under anesthesia and analgesia of blood vessels, (airway or gastrointestinal) ducts, tracks or hollow organs, with or without exteriorization. A sufficient recovery time will be implemented.

All the above-mentioned procedures are described in Standard Operation Procedures (SOPs) which contain best practice procedures and are at least reviewed by Animal Welfare Body and study director. Compliance to these present SOPs will be monitored by Quality Assurance Officers, management, the study director and the Animal Welfare Body.

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

The total number of animals per group is based on recommendations in applicable guidelines and experience with toxicological studies; these group sizes are commonly accepted by regulatory bodies / market registration authorities across the world. Additional information which can influence the animal numbers used are: information from previous (pilot) studies by the manufacturer or by other companies, and product information and literature data about similar compounds. In addition, animal numbers may also be chosen on the basis of previous studies with a similar design. Where appropriate, study designs are further refined, in consultation with statisticians, to identify the minimum animal number to achieve study objectives whilst avoiding the risk of needing to repeat a study through using too few animals and not meeting the study objectives. As a guidance, a "standard" number of animals per study is presented in Table 1. The precise number of animals per study will be justified in the study plan.

## **B. The animals**

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

### **Species and origin:**

Under this project/appendix 2, the non-rodent species will be the rabbit and the rodent species will be the rat. These species are the most commonly used species for developmental and/or reproductive toxicology testing. The chosen animal species depends on guidelines and laws set by authorities. If multiple species are suitable, the animal species will be selected from which is known that this species will experience the lowest severity level from the study procedures. Rats and rabbits will be obtained from certified breeders/suppliers and will be transported with a registered and approved animal courier.

### **Age and sex:**

Age and sex of the selected animal species depends on the applicable guidelines. In general, the age should be representative for the human situation. Usually, young adult animals will be used, but if necessary, the age of the animals may be adapted to the required study design. In general, following

applicable guidelines, species from same age and sex used in previous (toxicity), will be selected. All species and maximum number of animals per type of study are specified in Table 1..

**Table 1: examples of species, number of animals per type of study**

Type of study, species and guideline(s)	Number of animals/study/group	Primary outcome measures
Prenatal developmental study in rats including dose range finder (DRF) according OECD 414 and ICH and preliminary study according to ICH	<b>Dose Range Finder: (DRF)</b> <u>F0-generation:</u> 6 females 3 Toxicokinetic animals in control group. 5-6 Toxicokinetic animals in treatment groups. <u>F1-generation:</u> approximately 504-540 fetuses (42-45 litters x 12 fetuses). <b>In total max. 585 rats/study</b>	Clinical signs; Body weights; Food consumption (CS, BW, FC) Macroscopy Pre- and post-implantation loss Fetal weights External examination fetuses (including sex determination)
	<b>Preliminary study<sup>1</sup>:</b> <u>F0-generation:</u> 9 Main females/group 5-6 Toxicokinetic animals in treatment groups 3 Toxicokinetic animals in control group. <u>F1-generation:</u> approximately 648-684 fetuses (54-57 litters x 12 fetuses). <b>In total max. 741 rats/study.</b>	CS, BW, FC Macroscopy Pre- and post-implantation loss Fetal weights External, visceral (and skeletal) examination fetuses (including sex determination)
	<b>Main study:</b> <u>F0-generation:</u> 22-24 Main females/group 5-6 Toxicokinetic animals in Groups 2, 3 and 4. 3 Toxicokinetic animals in control group. <u>F1-generation:</u> approximately 1272-1404 fetuses (106-117 litters x 12 fetuses). <b>In total max. 1521 rats/study</b>	CS, BW, FC Macroscopy Pre- and post-implantation loss Fetal weights External, visceral and skeletal examination fetuses (including sex determination)
Tolerability study in the rabbit	Max.4 groups of 3 – 4 animals/group <b>In total max. 16 rabbits/study</b>	CS, BW, FC Macroscopy
Prenatal developmental study in rabbits including dose range finder (DRF) in rabbits according OECD 414 and ICH and preliminary study according to ICH	<b>Dose Range Finding:</b> <u>F0-generation:</u> 6 females rabbits/group. <u>F1-generation:</u> approximately 216 fetuses (24 litters x 9 fetuses). <b>In total max. 240 rabbits/study.</b>	CS, BW, FC Macroscopy Pre- and post-implantation loss Fetal weights External examination fetuses
	<b>Preliminary study<sup>1</sup>:</b> <u>F0-generation:</u> 9 females/group. <u>F1-generation:</u> approximately 324 fetuses (36 litters x9 fetuses). <b>In total max. 360 rabbits/study</b>	CS, BW, FC Macroscopy Pre- and post-implantation loss Fetal weights External, visceral (and skeletal) examination fetuses (including sex determination)
	<b>Main study:</b> <u>F0-generation:</u> 22-24 female rabbits/group. <u>F1-generation:</u> approximately 792-864 fetuses (88-96 litters x 9 fetuses). <b>In total max. 960 rabbits/study</b>	CS, BW, FC Macroscopy Pre- and post-implantation loss Fetal weights External, visceral and skeletal examination fetuses (including sex determination)
Dose Range Finding study in the rat	To determine dose levels: Max 4 groups of 3 – 5 rats /sex/group <b>In total max. 40 rats / study</b>	CS, BW, FC Macroscopy



Reproduction/ developmental screening study in the rat <sup>2</sup> according to OECD 421	<p><b>F0-generation:</b> 10-12 rats/sex/group + 8 reserve animals for determination of estrous cycle.</p> <p><b>F1-generation:</b> approximately 480-576 pups (40-48 litters x 12 pups).</p> <p><b>In total max. 624 rats/study</b></p>	<p>CS, BW, FC</p> <p>Macroscopy</p> <p>Histopathology + weight selected reproductive organs</p> <p>Endocrine disruptor endpoints</p> <p>Reproduction parameters</p> <p>Early post-natal development</p>
Combined 28-day <sup>3</sup> with reproduction/ developmental screening study in the rat <sup>2</sup> according to OECD 422	<p><b>F0-generation:</b> 10-12 Main rats/sex/group + 8 reserve animals for determination of estrous cycle. 5 Recovery rats/sex in Groups 1 and 4.</p> <p><b>F1-generation:</b> approximately 480-576 pups (40-48 litters x 12 pups).</p> <p><b>In total max. 644 rats/study</b></p>	<p>CS, BW, FC</p> <p>Functional observations</p> <p>Macroscopy</p> <p>Histopathology + weight selected organs</p> <p>Clinical pathology</p> <p>Endocrine disruptor endpoints</p> <p>Reproduction parameters</p> <p>Early post-natal development</p>
Two-generation study in the rat according to OECD 416	<p><b>F0-generation:</b> 24-25 rats/sex/group.</p> <p><b>F1-generation:</b> approximately 1152-1200 pups (96-100 litters x 12 pups).</p> <p><b>F2-generation:</b> approximately 1152-1200 pups (96-100 litters x 12 pups).</p> <p><b>In total max. 2600 rats/study.</b></p>	<p>CS, BW, FC</p> <p>Functional observations</p> <p>Macroscopy</p> <p>Histopathology + weight selected organs</p> <p>Clinical pathology</p> <p>Endocrine disruptor endpoints</p> <p>Reproduction parameters</p> <p>Early post-natal development</p>
Extended one-generation reproduction toxicity study (EOGRTS) in the rat according to OECD 443 <sup>5</sup>	<p><b>F0-generation:</b> 24-25 rats/sex/group.</p> <p><b>F1-generation:</b> approximately 1152-1200 pups (96-100 litters x 12 pups).</p> <p><b>F2-generation<sup>4</sup>:</b> approximately 960 pups (80 litters x 12 pups).</p> <p>10/sex positive control animals for TDAR.</p> <p><b>In total max. 2370 rats/study.</b></p>	<p>F0 generation: CS, BW, FC</p> <p>Macroscopy</p> <p>Histopathology + weight selected reproductive organs</p> <p>F1: generation: - Cohort 1: Reproduction - Cohort 2: Neurotoxicity - Cohort 3: Immunotoxicity - Cohort 4: Surplus, addition endpoints</p>
Fertility study in the rat according to ICH	<p><b>F0-generation:</b> 20-24 Main rats/sex/group 5-6 Toxicokinetic rats/sex in Groups 2, 3 and 4. 3 Toxicokinetic rats/sex in control group.</p> <p><b>F1-generation:</b> approximately 1176-1404 fetuses (98-117 litters x 12 fetuses).</p> <p><b>In total max. 1600 rats/study.</b></p>	<p>CS, BW, FC</p> <p>Macroscopy</p> <p>Histopath + weight selected reproductive organs</p> <p>Reproduction parameters</p>
Pre-and postnatal development study in the rat according to ICH	<p><b>F0-generation:</b> 24-25 females/group.</p> <p><b>F1-generation:</b> approximately 1152-1200 pups (96-100 litters x 12 pups).</p> <p><b>F2-generation:</b> approximately 1152-1200 pups (96-100 litters x 12 pups).</p> <p><b>In total max. 2500 rats/study</b></p>	<p>F0 generation: CS, BW, FC</p> <p>Macroscopy</p> <p>F1 generation: CS, BW and FC</p> <p>Early and late post-natal development, including behavioral tests</p> <p>Reproduction parameters</p>

Developmental neurotoxicity (DNT) study in the rat according to OECD 426 <sup>5</sup>	<p><u>F0-generation</u>: 24-25 females/group.</p> <p><u>F1-generation</u>: approximately 1152-1200 pups (96-100 litters x 12 pups).</p> <p><b>In total max. 1300 rats/study.</b></p>	<p>F0 generation: CS, BW, FC</p> <p>Macroscopy</p> <p>F1 generation: CS, BW and FC</p> <p>Early and late post-natal development, including behavioral tests</p> <p>Reproduction parameters</p>
---------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

- 1: *Generally, where appropriate preliminary reproduction toxicity data (from preliminary embryo-fetal developmental toxicity studies) are available from two species (most rodents and rabbits), and where precautions to prevent pregnancy in clinical trials are used, inclusion of women of childbearing potential (up to 150) receiving investigational treatment for a relatively short duration (up to 3 months) can occur before conduct of definitive reproduction toxicity testing.*
- 2: *These studies can serve as dose range finding studies for generation studies (preventing additional testing/animals).*
- 3: *Sometimes this will be extended to 90 days (so a combination of an OECD 422 and 90-day repeated dose toxicity study); the maximum number of animals used for this type of study is not increased.*
- 4: *The second generation is sometimes included in the study design when requested by the authorities and/or based on test substance information, or it can be triggered during the in-life phase (e.g. in case of equivocal reproduction and/or developmental findings during the first generation).*
- 5: *A positive control study for developmental neurotoxicity might be performed to confirm the validity of neurobehavioral tests and neurohistopathology and brain measurements in the test system and regulatory acceptance of the studies evaluating parameters.*

Common practice is to use the least amount of animals to achieve the study goal (determine toxicity). More animals may be required than specified above either as addition or replacement due to inclusion of spare animals, additional reference/recovery groups/positive or negative control groups, due to interim sacrifices, unexpected toxicity or health issues. Furthermore, depending on the detection sensitivity of the required biomarkers/measurements at issue, more animals may be necessary for a proper scientific evaluation. In case one or more of the above-mentioned criteria are applicable, the rationale/reason will be amended and after consultation (and approval) of the AWB.

In case of a killed animal, which is not related to the study or treatment (with euthanasia of a planned study animal based upon a humane endpoint), this animal may be replaced by a spare animal. The estimated number of animals for this appendix 2 is about 30-40% of the total (excluding fish and frog) given in the Project Proposal.

### C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

If the study design allows, animals (parental/pups) will be re-used or re-used animals will be included. The policy on the re-use of animals is documented in SOPs. Animals that had severe discomfort will not be re-used. The evaluation for re-use of animals will be made by the responsible veterinarian and AWB. The veterinarian will be notified in case any unexpected (clinical) signs had been observed in the previous study, or the severity score was more than moderate.

Re-use can be performed within the same type of study or between different types of studies. A sufficient washout period will be taken into account based on the characteristics of the test substance.

Unused spare animals may be used in other studies or for training of technicians (separate Project Proposal).

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

No

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

#### **D. Replacement, reduction, refinement**

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

██████████ is actively involved within the Dutch Three Rs centre, and regularly interacts with global regulatory agencies and European Lab Animal Science (FELASA) network, and thus is well positioned to encourage adoption and improvement of animal welfare best practice within regulatory testing and ██████████

Within the light of the NCad guideline 'Transitie naar proefdiervrij onderzoek', study designs are reviewed at regular intervals (in conjunction with changing guidelines or recommendations) as well as on an ad-hoc basis (in conjunction with the client) to incorporate available refinements, to minimise animal numbers or to reduce the severity level. The company is actively involved in cross-industry initiatives, aimed at sharing best practice and application of the 3Rs.

##### Replacement

The studies are obligatory for registration of a test substance according to official guidelines or in support of clinical trials. If the guidelines allows the use of alternatives not involving animals, then these alternatives will –and have to- be used for registration purposes. Some in vivo study types have already been replaced by in vitro studies. In the most recent guidelines, however, no authority-approved alternatives are available for the studies described in this Project Proposal.

Several international legal and scientific bodies / committees determine which information is needed to evaluate the safety of a substance or product. Often no validated and authority approved alternatives are available and animal testing remains the only way to obtain the required information. The requested animal studies in this project application are all designed to support legally mandatory requirements for which alternative testing is not available. Where authority approved alternatives are available and accepted by the appropriate jurisdiction (e.g., in vitro skin absorption test), these will be used. As the development of alternatives is ongoing and regulatory authorities have different and changing policies in the acceptance of alternatives, updates / changes of these legislations will be regularly checked and implemented.

For meaningful and reliable evaluation of overall compound toxicity, target physiological systems must be intact, with complete neural and humoral controls modulating any responses. Thus far, in vitro and ex-vivo test systems remain insufficient for comprehensive determination of reproductive and developmental toxicity.

##### Reduction

The minimal number of animals used in a study is described in international guidelines. Studies are designed to obtain maximal information from the smallest number of animals. In general, the number of animals used in a full study is considered to be the minimum needed to satisfy evaluation criteria.

Study designs are reviewed at regular intervals (in conjunction with changing guidelines or recommendations) as well as on an ad-hoc basis (in conjunction with the client, statisticians) and updated to incorporate available refinements, to minimize animal numbers or to reduce severity levels.

##### Refinement

The main species under this project are rats and rabbits, the most commonly used species for non-clinical safety testing programs. Extensive historical use of this species has accumulated substantial experience and background data, which may facilitate the interpretation of experimental results; furthermore, its size permits repeated collection of analytical samples with minimal physiological impact, which in turn reduces the group size required to fulfill the scientific/regulatory objectives of the study.

Data on exposure, tolerability and dose-response-relationships enable dose selection, sample size and experimental conditions for subsequent studies, allowing optimization of their design and end-points. Furthermore, predictive studies' such as tolerability and/or pharmacokinetic studies allow streamlining of the evaluation program and are often used to inform about candidate selection (whether or not a candidate should be developed). For substances in progress, these studies may be included in regulatory submissions as supporting studies.

Animal welfare is of utmost importance and Good Surgical Practice will be observed for any animal undergoing surgical procedures. Care is taken to provide species specific environmental enrichment (e.g.

play items and shelters for rodents, and chew blocks and human interaction for dogs). Further, attention is given evaluate environmental enrichment items and communicate on practices between sites.

Animals are checked multiple times per day to timely detect humane end points. In case an animal shows clear adverse effects or is in pain, the animal will be observed more intensive and a veterinarian might check the animal regularly. Small treatment such as cooling, supportive feeding, cleaning of wounds might be acceptable within the scope of the study.

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

The majority of animals are not expected to show signs of severe adverse effects of the test substances that impact on their general well-being. Selection of a suitable dose level will take into account any available data from other dose routes but assumptions have to be made in such extrapolation and occasionally unwanted adverse effects may arise from the selected dose level.

Studies involving therapeutic agents (pharmaceuticals, human and veterinary) with effects putatively caused by the compound, are likely to produce pharmacodynamic effects but without clinical signs and these would not be expected to persist for longer than 24 hours. Studies involving non-therapeutic substances (agrochemicals, food additives and industrial chemicals) may, as a side effect not directly related to their proposed biological or chemical action, also produce pharmacodynamic effects with severity levels from mild to severe that will not be expected to persist for longer than 24 hours. Interventions, if needed, can be performed within this timeframe.

Analgesia or veterinary treatment will be performed if this is compliant with the study. The veterinarian and study director will be involved in the decision making for performing a treatment.

In the event of an animal showing severe clinical signs, study director, designated veterinarian and AWB can/will be involved deciding on either modification of study design, withdrawal from treatment, provision of preventative or therapeutic treatments, or humane killing (HEP) of affected animals.

## Repetition and duplication

### E. Repetition

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

Repetition of studies will be avoided as much as possible, which is also supported by legislation. The study history of the test substance will be queried (with the 15-item checklist) from the sponsor to avoid repetition. In case of (agro)chemicals the sponsor need to register a test substance at the authorities prior to study execution. Repetition of a certain study could occur on incidental basis, for example when a previous study failed because of a contamination or poor execution by [REDACTED]

[REDACTED] n. In case of a significant alteration of the test substance or vehicle, which requires additional testing and consultation of the responsible regulatory authorities, this is not considered to be 'repetition'.

If a regulatory accepted study is already available, repetition of the study will not be beneficial for the client/customer/sponsor and therefore no repetition will be performed. For industrial chemicals, agrochemicals and biocides to be authorized in the European Union, there are specific Articles in Regulations and Directives to avoid duplicate testing. However, performance of studies in accordance with the latest test guidelines or on request of authorities or another jurisdiction cannot be completely excluded.

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

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

No

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

Rabbits and animals with dermal/topical applications will be housed single in order to prevent fighting and/or damage to dermal application. Other housing and care conditions will be in accordance with Directive 2010/63/EU. Animals will have visual, auditory and olfactorial contact where possible.

#### **G. Location where the animal procedures are performed**

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

### **Classification of discomfort/humane endpoints**

#### **H. Pain and pain relief**

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Anesthesia and analgesia will be used perioperative during surgery, anesthesia prior to euthanasia of animals and/or during blood/tissue collection (rodents). In general, no anesthesia or analgesia will be used as a relief for pain putatively caused by test substance as this is not compliant with the study objectives. Superficial/non-invasive methods can be used to reduce pain sensation.

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

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

Adverse effects caused by the test substance (most of the times with mild but in case of dose range finding or tolerability to severe discomfort) are the most common adverse effects observed. In addition, inherent adverse effects caused by the type of dosing, sampling of body fluids, single housing and restraining could occur.

Explain why these effects may emerge.

The aim of the studies is to determine toxicity of a test substance. An adverse effect might occur with higher than expected severity during studies after test substance administration, but this is part of the assessment of toxicity.

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

The animals will be closely monitored in order to make sure that animals will be timely sacrificed according to humane endpoints, or treatment can be terminated or temporarily stopped for recovery purposes. A veterinarian will be involved during this process.

In response to developing unexpected discomfort, involvement of the Animal Welfare Body will be sought at the earliest possible stage when potential issues of concern arise or when unusual events (within the context of the study) first occur.

If scientifically and practically possible, animals will always be group housed (with exception of rabbits and during post-coitum for female rats) and a maximum level of cage enrichment will be applied according animal needs, best practice and standards.

#### **J. Humane endpoints**

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

No > Continue with question K.

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

Animals that are showing stress or pain which is not expected to be temporary in nature or can become more transient, will be sacrificed based on OECD guidance document on humane end points (ENV/JM/MOMO/ 2000/7).

Indicate the likely incidence.

The incidence is estimated as very minimal (<1%), it depends strongly on the type of study and the test substance.

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

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

The allowed cumulative severity classification for these studies will be moderate, at the most, depending on the study content and the animal procedures involved. For the large majority of studies the severity level is not expected to increase after administration of the test substance. For early types of studies, such as tolerability and dose range finding studies, the severity level could occasionally increase to severe. Based on historical data at **10.2.0** the overall expected distribution (%) of severity levels for this appendix is expected to be: 40-45% mild; 50-55% moderate; <5% severe.

### **End of experiment**

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

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

Animals will be killed at the end of the treatment period or after a recovery period. During necropsy, organs and tissues might be collected for histopathology, organs might be weighed and fetuses might be collected for fetal pathology. Additional tissue samples might be collected for future investigations/ new research purposes (separate Project Proposal).

If mortality is not a study endpoint, an evaluation will be made to determine if an animal is suitable for re-use.

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

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

X Yes



## Appendix

### Description animal procedures

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

#### 1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.

0020

1.2 Provide the name of the licenced establishment.

0020

1.3 List the serial number and type of animal procedure.

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

Serial number	Type of animal procedure
3	ADME (Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion) and DMPK (Drug Metabolism Pharmacokinetics)

#### 2 Description of animal procedures

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

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

(Adjustments are printed in red)

ADME / DMPK studies are conducted to obtain adequate information on absorption, distribution, biotransformation (i.e. metabolism) and excretion of test substances, to relate concentration (or dose) and time course to the observed toxicity and to aid in understanding mechanism of toxicity. Kinetics may help to understand the toxicology studies by demonstrating that the test animals are systemically exposed to the test substance and by revealing which are the circulating entities (parent substance/metabolites). Basic kinetic parameters determined in these studies will also provide information on the potential for accumulation of the test substance in tissues and/or organs and the potential of biotransformation following exposure to the test substance. Together with data from toxicity studies, these kinetic data provide a rational basis for risk assessment in man and animals.

In addition, pharmacokinetic studies will provide data to evaluate the research program to support:

- candidate selection (whether or not a candidate should be developed)
- selection of formulations;
- selection of treatment regimens;
- selection of dose levels or routes of administration.

These studies can be run in parallel with toxicity studies during development, or in an earlier phase prior to the first-in-human and animal programs, to serve as candidate selection tools.

For compounds in development, these studies may be in part of regulatory submissions as supporting studies. The following study types are included in this appendix: (DM)PK studies, ADME studies (Mass-balance studies, PK studies, tissue-distribution studies), Bioequivalence studies.

**Primary outcome parameters:**

In order to study the kinetics of a test substance, it is administered to animals by a relevant route, followed by observation of the animals, blood sampling at specific timepoints, sampling of excreta and/or organs/tissues at specific timepoints, and possible collection of other body fluids for subsequent analysis. The study design depends upon which kinetic parameters need to be studied (Absorption, Distribution, Metabolism and/or Excretion) and can also depend on the applicable guideline used. The specifications will be defined in the study plan and discussed with the AWB.

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

Guidelines and Technical Documents e.g. from the ICH (International Conference of Harmonisation) and OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) provide guidance on animal species selection, dose level selection, frequency of dosing, and duration of treatment.

During the study the following animal procedures may be conducted:

- *Administration:* to achieve the study objectives animals may be sham dosed or receive vehicle, placebo or other appropriate substances in the pretest period. In the treatment period, co-administration of test-substances (e.g. to study anticipated combination treatments) or adjunctive administration of 'challenge substances' (adjuvants or positive control compounds for e.g. assessment of organ function or immunology) are possible as well.

Substances will be administered by several routes, including but not limited to: oral (gavage, capsule, dietary) / by inhalation (nose only) / dermal (topical) / intra- intestinal via implanted cannula / buccal (oromucosal) / ocular / intranasal / intratracheal / rectal / vaginal / (amongst others), and by injection (intramuscular, intravenous, intra-arterial, perivenous, subcutaneous, intraperitoneal, intradermal) / infusion (intravenous, intra-arterial).

The most relevant route of exposure, in humans or in animals, is in most cases also the route of administration in the animal study. If justified, another administration route may be chosen; in that case it will be ensured that the project data remain valid for its intended use. In some cases, multiple administration routes are relevant (for instance, to compare with the intended parenteral human route of exposure), in order to determine absolute bioavailability/absorption. Unless otherwise specified, the administration of substances and the sampling procedures will be applied such that the severity will no more be than transient mild and that no lasting harm occurs.

Frequency of administration may vary from a single to repeated dose depending on study objectives. The most commonly used frequency is once daily, but it may range from once every selected period (e.g. once every two weeks) to multiple times per day. The frequency is based upon available literature, expected dosing regime in humans, experience, animal welfare considerations and advice of the AWB.

The duration of treatment is driven by applicable guidance documents. For pharmaceuticals, the duration of repeated dose toxicity studies depends on the duration of the proposed therapeutic use in humans or animals; for industrial chemicals, -amongst others- it depends upon the tonnage of production and/or import.

- *Radio-active treatment:* applied in the case of ADME studies, where a 100 ± 10% recovery of the administered test substance is required per guideline. Usual isotopes are <sup>14</sup>C and <sup>3</sup>H.
- *Clinical observation:* clinical signs will be determined at least once daily to assess the health condition of the animal. A functional observational battery like ECG, ophthalmoscopy or (modified) Irwin might be performed. These methods are being applied according to guidelines. Frequency of observations may be increased in case severity is increasing from mild to moderate.
- *Blood sampling:* blood may be sampled on one or more occasions (under anesthesia if applicable)



using peripheral / superficial vessels, major blood vessels / an implanted cannula / cardiac puncture (procedure under terminal anesthesia). The purpose for blood collection is mostly to assess clinical pathology and to derive toxicokinetic parameters. The amount of blood collected will remain within the internationally accepted limits, according to animal ethical standard procedures and approved by the AWB.

- *Body fluids or excreta sampling:* may be performed at any time, as follows: excreta (faeces), urine by catheter, or voluntary using metabolism cages, gut lumen contents, expired air using a face mask, cerebrospinal fluid, tear fluid, vaginal smears or swabs, bronchoalveolar lavage fluid.
- *Confinement and restraint:* one or more of the following methods may be used: manual restraint, anti-interference collar or bag, application (followed by removal) of an occlusive/semi-occlusive dressing, fitting and removal of a jacket, purpose-made cradle or sling, short term separation (e.g., for observation purposes), single housing in case of males fighting or with scientific justification and permission of the AWB. For restraint regimes (e.g. in a restraining tube for dosing purposes i.e. in inhalation or infusions), this may be up to a total of 8 hours in a 24-hour period. For less confinement (e.g. single housing/metabolism cage) this may be up to 7 days, but on very rare occasions may be a maximum of 4 weeks i.e. dermal studies. In case studies are performed for registration of veterinary drugs at CVM (Center for Veterinary Medicine, FDA, US) single housing is required from randomization until last blood collection (anticipated maximum of 4 weeks). If the route of administration requires a long duration of restraint, the animals will be trained for this restraint. Confinement will only applied after consultation with the AWB. In any case, species/sex behavioural requirements will be taken into account.
- *Food and/or water deprivation:* may be withheld, and will be clearly documented in the study plan. Treatment under fasted or fed conditions might be referred depending on compound characteristics. The duration of fasting depends on the species and aim of the study and will be according to best practice procedures. If the maximum withholding period for water (8 hours) and of food (24 hours) is applied, this would usually be no more than once in a 1-day for water and 7-day period for food (exceptionally twice but not on successive days - unless food and water is being provided in the interim period).
- *Scarification/dermal abrasion* (e.g. tape stripping): may be performed but not exceeding 10% of the body surface area.
- *Patch, clamp or cuff application:* may be performed for a short duration for e.g. ECG or blood pressure recordings.
- *Removal of hair:* may be performed by chemical or mechanical procedures, in order to facilitate test substance administration (e.g. dermal dosing), to facilitate local observations and better exposure to light/air, as preparation for surgery and to improve recovery of underlying surface.
- *Temperature:* body temperature (e.g. rectal) may be measured using suitable devices.
- *Surgical preparation:* animals may undergo surgical cannulation of blood vessels, ducts, tracts (airway or esophagus) or hollow organs, with or without exteriorization. An adequate recovery time will be implemented.

All the above-mentioned procedures are described in Standard Operation Procedures (SOPs) which contain best practice procedures and are at least reviewed by Animal Welfare Body and study director. Compliance to these present SOPs will be monitored by Quality Assurance Officers, management, the study director and the Animal Welfare Body.

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

The total number of animals per group is mostly based on recommendations in applicable guidelines (when available), experience (i.e. species, experimental set-up) with ADME and DMPK studies, and are commonly accepted group sizes by regulatory bodies across the world.

As a guidance, a commonly used number of animals is mentioned in the table below (based on guidelines and/or good practice). Since the design of any ADME and/or DMPK study is flexible, there is no standard number of animals per study. In addition, in certain cases spare animals, reference, positive or negative control groups may be added to the study. Pilot ADME studies can be performed in order to check e.g. the formation of volatiles, the optimal blood sampling times and duration of excreta/ bile collection. The precise number of animals per study will be justified in the study plan.

Studies conducted under this Project are often part of an early stage of the product development, but may occur at further stages of the development/registration process. For test substances that are at an early stage, little or no animal data will be available. In that case, study design decisions have to be based on data from in vitro studies or from any available in vivo studies performed with the test substance. A prudent approach will therefore be adopted to minimise the number of animals and the severity of any discomfort and use of animals. For studies that are being performed at a later stage of development, when studies in the rodent (and other) species may have been performed already, decisions on study design can usually be made with confidence. Scientists review the available data and – if relevant - advise clients on the number of animals, the selection of appropriate dose levels, and develop the optimal study design, to ensure that number of animals and animal severity, related to the procedures, is as minimal as possible. Additional information which can influence the number of animals used are: information from previous (pilot) studies by the manufacturer or other companies, product information and literature data about similar compounds. In addition, animal numbers can also be chosen on the basis of previous studies with a similar format and/or by power analysis.

To optimize the study design and/or to refine the methods used in animals it might be necessary to perform an orientating experiment (condition finding test) prior to the start of the main study to find the correct conditions for the main study. Examples of a condition finding test are: verifying the suitability of the animals concerned (condition of the animal, new strain, other provider of animals or instrumentation) and/or the appropriateness of used compounds (e.g. anesthesia, vehicle) or procedures. When a condition finding test is a reduced version of the main study regarding total number of animals, treatments, test items and the discomfort does not exceed the maximum discomfort in the main study. A condition finding test may only be performed after approval by the Animal Welfare Body.

## **B. The animals**

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

### **Species and origin:**

*Rodents:* Mice, rats, guinea pigs and hamsters.

*Non-rodents:* rabbits, cats, dogs, (mini) pigs.

Animals will be obtained from certified international breeders/suppliers and will be transported by a registered and approved animal courier. External surgery models may be used and might be done internal or external (e.g. with implanted jugular vein catheter), which will be decided by AWB. If the study design, animals and severity allows, animals will be re-used or re-used animals will be included in accordance with legislation. The policy on the re-use of animals is documented in SOPs. Animals that had severe discomfort will not be re-used. [Next paragraph is no longer applicable. Only 10.2g a 10.2g are used and housed in the 10.2g facility] In case of bioequivalence studies or PK studies with a non-terminal endpoint and no or mild adverse effects, 10.2g from a 10.2g are used and are returned to this facility after study termination without (lasting) effects. This facility is located in The Netherlands and is known and registered by NVWA. 10.2g a closed colony and undergo regular health monitoring. The use of these 10.2g advantages over the use of 10.2g from a 10.2g: no 10.2g need to be bred, no international transport is necessary and no 10.2g need to be unnecessarily euthanized (since it concerns non-terminal studies) or adopted. The AWB will monitor the animal welfare, wash out and return of these non-rodents cats to the colony facility.

In some cases, it might be necessary to generate pharmacokinetic data in genetically-modified animals, e.g. if toxicity or pharmacology studies have been performed in genetically-modified animals and supporting pharmacokinetic data are necessary for data interpretation. Genetically altered rodent strains used under this protocol are not expected to exhibit any harmful phenotype.

The selection of the species necessary for the study depends on the following:

- Applicable guideline;
- Species used in previous (toxicity) studies;
- In-vitro metabolism data;
- Intended use of the compound;
- Pharmacodynamic or other properties of the compound;
- Species-specific properties [redacted] warranting the same species).

**Age and sex:**

Age and sex of the selected animal species depends on the applicable guidelines like OECD. In general the age of the animals should be representative for the human situation. Usually, young adult animals used, but if necessary the age of the animals may be adapted to the required study design. Pregnant rats and /or rats with litters can be used, in order to determine placental transfer and/or milk secretion of a compound.

**Number of animals:**

As a guidance, a "default" number of animals per study (type) is mentioned in the table (1) below.

**Table 1: examples of species, number of animals per type of study**

<b>Type test</b>	<b>Number of animals/ group</b>	
	<b>Non-rodent (dogs, cats, minipigs, rabbits)</b>	<b>Rodent (mice, rats, guinea pigs, hamster)</b>
(DM)PK study (ICH/OECD) <sup>a, 3</sup>	3 – 6/sex/groep	3 – 6/sex/group or timepoint <sup>1, 2</sup>
<i>Examples of PK studies: PK bioavailability</i>	3 dogs/sex, 6 in total/study	3 rats/sex/group; 8 timepoints; Max 12 animals (serial sampling) /study 24 animals (composite sampling) /study
<i>Examples of PK studies: PK dose proportion study</i>	4 dose levels, 4 rabbits/sex/dose levels 32 animals/study	
<i>Examples of PK studies: PK tissue distribution study</i>		4 mice (one sex)/group/timepoint 4 groups (3 dose levels human route and one dose level i.v.) 9 timepoints 144 animals /study
Pilot ADME study		2-4 animals/sex/group
ADME study <sup>b, 3</sup> (OECD417/OECD427/ ICH)	4 animals/sex/group	2-6 animals/sex/group or timepoint
<i>Examples of ADME studies</i>	<i>ADME study example 1: Mass-balance/kinetics: 4 animals/sex/route 2 routes (wash-out period) In total 8 animals/study</i>	<i>ADME study example 1: 4 animals/sex/group 5 groups: 3 mass-balance (low and high dose and repeated administration), 2 kinetic (low and high dose) groups In total 20 animals/sex</i>  <i>ADME study example 2: Mass-balance: 4 animals/sex/route Kinetic/tissue: 2 animals/sex/timepoint/route 2 routes (p.o. and i.v.); 12 timepoints. In total 112 animals</i>
Bioequivalence studies (VICH, EMA/CVMP) <sup>c</sup>	A power analysis is performed in order to determine the number of animals needed. A commonly used group size is 24 animals (can be of either sex or a combination)	

1 In case the rodent species is smaller than a rat, e.g. mice, more animals will be included, as only a limited amount of blood can be collected from these small animals. As a guidance 3 animals per timepoint will be taken.

2 Sample volumes will be kept as small as possible (depending on the compound and the sensitivity of available bioanalytical method) to keep the number of animals as low as possible. When higher sample volumes are required, the number of animals needs to be increased accordingly.

3 The number of groups/animals within a study depends upon the number of compounds, formulations, routes, dose levels or treatment regimens that will be tested in the study.

<sup>a</sup> ICH S3A: The number of animals to be used should be the minimum consistent with generating adequate toxicokinetic data. Where both male and female animals are utilised in the main study it is normal to estimate exposure in animals of both sexes unless some justification can be made for not so doing.

<sup>b</sup> OECD417: A minimum of four animals of one sex should be used for each dose tested. Justification should be provided for the sex of the animals used. The use of both sexes (four males and four females) should be considered if there is evidence to support significant sex-related differences in toxicity.

OECD427: A group of at least four animals of one sex should be used for each test preparation and each scheduled termination time. If there are data available that demonstrate substantial differences in dermal toxicity between males and females, the more sensitive sex should be chosen. If there are no such data, then either gender can be used.

<sup>c</sup> VICH GL52: It should be noted that for a study to be internationally acceptable, a minimum of n=6 is necessary (i.e., the total number of study animals in a two-period, two-sequence crossover study, N, should be equal to or greater than 12)

In case of unexpected toxicity or health issues, more animals may be required, either as addition or replacement. This will be verified by the Animal Welfare Body and may imply an amendment to this project. In case of euthanasia of an animal(s), which is not related to the study or treatment, this animal(s) can be replaced by a spare animal.

### C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

In general, non-rodents like dogs, cats and minipigs will be re-used for DMPK studies, when these studies have no terminal endpoint and the severity levels are mild. A commonly used washout period between studies is two weeks. The policy on the re-use of animals is documented in facility SOPs. In these SOP's, e.g. minimal wash-out period, maximal times for re-use, maximal overall number of blood samples has been described in close collaboration with the veterinarian and the AWB.

Animals that had severe discomfort in retrospect will not be re-used. The evaluation of re-use of animals will be made by the responsible technician, veterinarian and the Animal Welfare Body. The veterinarian will be notified in case any alterations had been observed in the previous study or the discomfort score was severe.

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

No

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

### D. Replacement, reduction, refinement

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

1026 is actively involved within the Dutch Three Rs centre, and regularly interacts with global regulatory agencies and European Lab Animal Science (FELASA) network, and thus is well positioned to encourage adoption and improvement of animal welfare best practice within regulatory

testing and [REDACTED].

In the light of the NCad guideline 'Transitie naar proefdiervrij onderzoek', study designs are reviewed at regular intervals (in conjunction with changing guidelines or recommendations) as well as on an ad-hoc basis (in conjunction with the client) to incorporate available refinements, to minimise animal numbers or to reduce severity of discomfort. The company is actively involved in cross-industry initiatives, aimed at sharing best practice and application of the 3Rs.

#### Replacement

These studies are obligatory for registration of a test substance according to guidelines or in support of clinical trials. If the guidelines describe to use alternatives, which do not involve animals, then these type of tests will be used for registration purposes. Some in vivo study types are already replaced by in vitro studies. However, in the most recent guidelines no authority-approved alternatives are available for the described ADME and DMPK studies.

For meaningful and reliable evaluation of compound kinetics, the target physiological systems must be intact, with complete neural and humoral controls modulating any responses. In vitro and ex-vivo test systems in isolation are inadequate for comprehensive determination of kinetics.

#### Reduction

The minimal amount of animals used in a study is mentioned in international guidelines or based upon common practice. Studies are designed to obtain maximum data from the smallest number of animals. In general, the number of animals used in each study is considered to be the minimum needed to satisfy statistical design; however they are also based upon international guidelines, where existent, which mandate the number of groups and animals therein, to guarantee correct determination of kinetic processes. As mentioned above, study designs are further refined, in consultation with our statisticians, to identify the optimum animal number to achieve study objectives.

When a study design has no terminal requirement, animals may be suitable for re-use thereby saving the use of a naive animal. Animals used previously under this or other project licenses at this establishment may only be re-used subject to meeting the legal conditions for re-use. The evaluation of re-use of animals will be made by the responsible technician, designated veterinarian and the Animal Welfare Body.

#### Refinement

The selected animal species depends on guidelines and laws, previous work done with the same compound, in-vitro metabolism data, intended compound use and compound properties.

Animal welfare is of utmost importance and Good Surgical Practice will be observed for any animal undergoing surgical procedures. In addition, care is taken to provide as much environmental enrichment as possible (e.g. play items and shelters for rodents and human interaction for dogs or chew blocks) and the company has working parties that regularly test and evaluate environmental enrichment items or practices.

Measures are in place to minimise animal suffering, the results of each study influencing the design and dose-selection in subsequent related studies. This allows progressive characterization of adverse effects so that unnecessary testing or use of inappropriate dosages will be avoided.

The involvement of experienced and qualified (art. 13f2a and b) animal care staff, and statisticians occurs at an early stage, so that advice can be given on implementation of the 3Rs and any appropriate refinements are being implemented.

---

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

The majority of animals are not expected to show signs of (severe) effects that have impact on their general well-being. In the event of an animal showing severe signs of an adverse reaction, immediate veterinary advice will be sought (e.g. modification of study design/ withdrawal from treatment, provision of palliative or therapeutic treatments) or humane end-points (ENV/JM/MOMO/ 2000/7) applied where appropriate. In response to developing problems/unusual events, involvement of Veterinary Services and Animal Welfare Body will be sought at the earliest possible stage when potential issues of concern arise or when unusual events (within the context of the study) first occur.

Studies involving potential therapeutic agents (pharmaceuticals and animal health products) may produce pharmacological or pharmacodynamic effects with certain discomfort (max moderate), but these would not be expected to persist for longer than 24 hours. Studies involving non-therapeutic substances (agrochemicals, food additives and industrial chemicals) may, as a side effect not directly related to their proposed biological or chemical action, also produce pharmacological or pharmacodynamic effects which would not be expected to persist for more than 24 hours either.

Unless otherwise specified, the administration of substances and the sampling procedures will be undertaken using a combination of volumes, routes and frequencies that of themselves will result in no or at most transient mild or moderate discomfort and no lasting harm.

## Repetition and duplication

### E. Repetition

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

Repetition of studies will be avoided as much as possible, which is also supported by legislation. The study history of the test substance will be queried (with the 15-item checklist) from the sponsor to avoid repetition. In case of (agro)chemicals the sponsor need to register a test substance at the authorities prior to study execution.

Repetition of a certain study could occur on incidental basis, for example when a previous study failed because of a contamination or poor execution by [REDACTED]. In case of a significant alteration of the test substance or vehicle, which requires additional testing and consultation of the responsible regulatory authorities, this is not considered to be 'repetition'.

If a regulatory accepted study is already available, repetition of the study will not be beneficial for the client/customer/sponsor and therefore no repetition will be performed. For industrial chemicals, agrochemicals and biocides to be authorized in the European Union, there are specific Articles in Regulations and Directives to avoid duplicate testing. However, performance of studies in accordance with the latest test guidelines or on request of authorities or another jurisdiction cannot be completely excluded.

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

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

No

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

Male mice, rabbits, (surgically) instrumented animals and animals with dermal/topical applications will be housed single in order to prevent fighting and/or damage to the instrumentation or dermal application. In case studies are performed for registration of veterinary drugs at CVM (Center for Veterinary Medicine, FDA, US) single housing is required from randomization until last blood collection (anticipated maximum of 4 weeks). Allowing an animal for interaction such as social housing during the study period, might possibly result in one treatment animal consuming another treatment animal's excreta due to coprophagic habit of dog, which might eventually impact the study outcome and main objective of study would be maligned.

Other housing and care conditions will be in accordance with Directive 2010/63/EU. Animals will have visual, auditory and olfactorial contact where possible. In addition, animals in the mass-balance phase of an ADME study will be single-housed in metabolism cages for a maximum of 7 days and animals in the kinetic phase of an ADME study will be single-housed on a bottom grid for maximally 7 days in order to prevent coprophagy. Other housing and care conditions will be in accordance with Directive 2010/63/EU.

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

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

## Classification of discomfort/humane endpoints

### H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Anesthesia will be used during surgery, prior to euthanizing animals and/or during blood collection (if applicable for the species). Analgesia might be used prior to and after surgery, this will depend on the type of surgery.

In general, no anesthesia or analgesia will be used as a relief for pain caused by test substance, as this is not compliant with the study objectives.

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

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

Adverse effects caused by the test substance are commonly observed. In addition, some adverse effects caused by the method of dosing, sampling of body fluids, single housing/metabolism cage, surgical instrumentation and restraining could occur.

Explain why these effects may emerge.

For test substances that are at an early stage of development, there will be little or no animal data available. Hence, occasionally unexpected toxic effects might occur. In addition, when kinetic data are necessary to support toxicological studies, it might be necessary to administer high dose levels.

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

A cautious approach will be adopted to minimize the severity of any discomfort, animals are being monitored, and humane end-points (ENV/JM/MOMO/ 2000/7) will be applied where appropriate.

In response to developing unexpected discomfort, involvement of the Animal Welfare Body will be sought at the earliest possible stage when potential issues of concern arise or when unusual events (within the context of the study) first occur.

### J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

Animals showing pain, distress or discomfort which is considered not transient in nature or is likely to become more severe, will be killed for humane reasons, based on OECD guidance document on humane endpoints (ENV/JM/MONO/ 2000/7).

Indicate the likely incidence.

The incidence is estimated as minimal and is expected < 1%.

**K. Classification of severity of procedures**

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

The expected cumulative discomfort for these studies will be mild or moderate, or in limited number of animals 'severe' based on the animal procedures. For the large majority of studies it is not expected that the severity will increase by test substance related effects.

**Table 2:** Percentage of animals & expected levels of discomfort

Species	% mild	% moderate	% severe
Used in DM(PK) studies	45-50	40-50	<1

**End of experiment**

**L. Method of killing**

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

Large animals (dogs, cats and minipigs) will mostly be re-used after a (DM)PK study. In case of rodent studies or in case of collection of organs/tissues, animals will be killed at the end of the treatment period.

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

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

X Yes





## Appendix

### Description animal procedures

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

#### 1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.

1020

1.2 Provide the name of the licenced establishment.

1020

1.3 List the serial number and type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
4	Ecotoxicology

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

#### 2 Description of animal procedures

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

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

(Adjustments are printed in red)

The study procedures are performed to determine the toxicity of a test substance in a specific animal species (fish or frog), which provide part of a rational basis for environmental risk assessment. Ecotox testing focusses on the three trophic levels in the food chain, being algae, daphnia and fish. Effects of test substances on either of these species will affect the environment. It is of high importance to know the toxicity of a test substance before and during production, transportation and use to prevent, were possible, any unwanted effects on the environment.

Testing can include a range-finding test, a full test, a limit test or a combination of these.

The study design and selected parameters depend on the applicable guideline used. In aquatic toxicity studies substances are tested up to 100 or 1000 mg/L or, if applicable, the maximum soluble concentration in test medium if this is lower. Static, semi-static and flow-through designs can be applied depending on the test substance properties and/or the guideline specifications and as explained in the project proposal.

**Animal procedures:** Fish & frogs are habituated in tanks with test substance. Interventions: blood samples and post mortem tissue collection for histopathology. Formulation of the substance, concentration selection, frequency of renewal, duration of the test, fish species, etc. are based on applicable guidelines (e.g. OECD, EC, OPPTS, JMAFF, ENV / JM / MONO / (2000)7). Acute toxicity tests with fish are performed to determine the concentration that results in 50% effect (e.g. mortality; LC50), while chronic studies focus more on the No Observed Effect Concentration (NOEC).

**Outcome parameters:**

Fish and frogs are daily observed for survival, appearance (e.g. weight and length at study end) and any other behavioral effects (e.g. swimming behavior).

The following study types are included in this appendix: acute toxicity to fish, chronic toxicity to fish, endocrine disruptor testing with fish and frogs.

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

The maximum concentration to be tested in acute toxicity tests are based on the guideline and guidance documents and included in Tables 1 – 7. Testing is performed up to the limit of solubility in test medium or 100 mg/L (occasionally depending on guideline up to 1000 mg/L), whichever is lower. Typically, a study starts with a range-finding testing with a spacing factor of 10 (e.g. 0.10 to 100 mg/L). In case data are available on expected toxicity and/or solubility, a different range might be tested. The study will continue with a final test with typically 5 concentrations and a control group. If no effects are observed in the range-finding a limit test can be performed at the regulatory limit concentration. Alternatively, a project can start with a range-finding in combination with a limit or directly with a limit test in case information is available indicative of the fact that no toxicity is expected. The studies can be performed without renewal of test solutions (static), with daily renewal (semi-static) or with continuous renewal (flow-through), which depends on the stability of the test substance in water. Fish will be observed on a daily basis for effects, which include but are not limited, to survival, appearance and behavioral effects. Fish showing forms of distress not considered transient in nature and likely to become more severe before the exposure is terminated, will be sacrificed for humane reasons based on the OECD guideline on humane endpoints

Concentrations per type of study and aim based on the required guidelines:

1. **Chronic studies** sub-lethal concentrations applied by renewal systems to assess possible long-term effects using five types of studies:

1.1. a juvenile growth test (28 days);

1.2. an early life stage test (28 day post-hatch);

1.3. and a bioaccumulation test (up to a maximum of 90 days).

1.4. Screening tests for endocrine disruption with fish and amphibians (21 days)

1.5. Growth and developmental studies for risk assessment of endocrine disruption (up to 17 weeks)

#### **Parameters per type of study:**

**1.1. In the juvenile growth test:** fish length and weight will be determined at the start and the end of the test to assess the growth effects relative to the control and to find a No Effect Concentration (NOEC) and if applicable effect parameters resulting in 10, 20 and/or 50% effect parameters.

**1.2. In the early life stage test:** exposure starts with eggs and effects are monitored until 28 (Fathead minnow) or 30 (Zebrafish)-days post-hatch. At the end, fish are weighed, and length is determined. All observations are compared to the control to find NOEC and if applicable ECx parameters.

**1.3. In the bioaccumulation study:** fish are exposed to very low, non-toxic, concentrations to assess whether, and if so, how fast the test substance accumulates in fish tissues. Fish can be exposed either through water spiking (substances introduced to the test medium) or diet spiking (substances introduced via the food). The study duration is dependent on the accumulation in fish tissues. Fish are euthanized at regular intervals and the total test substance in the fish mass is analytically determined.

With water spiking the uptake phase (exposure phase) typically lasts for 28 days and with diet spiking for 14 days. If no or limited accumulation is observed the study can stop after 28 or 14 days, respectively. If accumulation occurs, the uptake phase is followed by a depuration phase in blank test medium using non spiked diet. The depuration phase for a water spiked study typically lasts 56 days and for a diet spiked study 28 days. The depuration phase is performed to check if, and if so, how fast test substance is removed by the fish.

To assess potential endocrine effects from substances, ~~two~~ chronic studies with two different species are performed. ~~One A study~~ with fish (Table 7, either the Fish short term reproduction or the 21-Day Fish Assay) and ~~one study a study~~ with tadpoles (either the Amphibian metamorphosis test assay) ~~as mentioned in Table 8~~ or the Larval Amphibian Growth and Development Assay (Table 9).

**The short-term reproduction test** assesses the effects on survival, reproductive behavior, secondary sexual characteristics, fecundity and fertility of the fresh water fish species *Pimephales promelas* (fathead minnow) or *Danio rerio* (zebrafish) exposed to various concentrations for a period of 21 days under flow-through conditions. At the end of the test, post mortem measurements are made that are reflective of the status of the reproductive endocrine system, including male secondary sex characteristics, gonadal histopathology, gonado-somatic index and plasma concentrations of vitellogenin (VTG).

The 21-day fish assay is similar in its design to the short-term reproduction test with an exception for the assessment of reproductive behavior, fecundity and fertility.

**The Amphibian Metamorphosis Assay** is a screening assay intended to empirically identify whether test substance may interfere with the normal function of the hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis. The developmental stage will be recorded on day 0. On days 7 and 21 developmental stage, Hind Limb length,

Snout-Vent length and Wet weight will be recorded. All measurements on days 7 and 21 will be performed directly after euthanizing the animals.

**The Larval Amphibian Growth and Development Assay** serves as a higher tier test with an amphibian for collecting more comprehensive concentration-response information on adverse effects suitable for use in hazard identification and characterization, and in ecological risk assessment. This assay targets both hypothalamic-pituitary-thyroid and hypothalamic-pituitary-gonadal axes. Exposure is preferably initiated at stage 8-10 of development and continues for 10 weeks after median stage 62 is reached in the control, with a maximum of 17 weeks. The endpoints collected in this study consist of: daily mortality and abnormalities assessments, time to NF stage 62, histopathology of thyroid gland (at stage 62 and end of the test), growth (weight and length at NF stage 62 and end of the test). At the end of the exposure liver-somatic index (LSI), histopathology of gonads, reproductive ducts, kidney and liver is assessed as well as vitellogenin concentration.

During the studies one or more of the following types of animal procedures may be conducted:

- **Food deprivation;** in cultured fish for 24 hours preceding start of a fish study as to prevent fish producing feces in the test tanks during the study, which might interact with the test item as per the guideline. This has no impact on the fish as they don't need daily food.
- **Blood sampling;** under anesthesia by caudal vein/artery or alternatively by cardiac puncture. Fish are euthanized after blood collection.
- **Clinical observations;** clinical signs will be determined on a daily basis (at least once daily) to determine the health condition of the animal. In case side effects are monitored, the frequency might be increased in consultation with the veterinarian and/or AWB. More specific study related effects are set up according to guidelines.
- **Euthanasia;** at the end of the study.
- **Tissue sampling;** post mortem tissue sampling.

As stated in the main part of the project proposal, each project will be evaluated according the 15-items checklist and managed by a study director. The study director works together with the client, collaborating scientists, technicians, veterinarians and the AWB. Before study start, the final study plan will be approved by the AWB. The AWB and designated veterinarians are consulted on issues of animal health and welfare. The study director will notify the involved personnel prior to start of a study (the first collection of raw data, e.g. weighing of test substance) to ensure understanding of the study objectives and design.

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

The total number of animals per group is based on recommendations in applicable guidelines and are routinely required group sizes by regulatory bodies across the world. The numbers used are the minimum required numbers according to the guidelines that are needed to evaluate results with sufficient statistical reliability. To reduce the use of fish, a control is only required in final/main studies, the numbers of fish are standardly minimized by excluding a control group when running a range-finding test. In addition, based on known toxicity or known (very) low solubility, the study director might decide to exclude some test groups in the range-finding or start directly with a limit test.

## B. The animals

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

**Species:** The species used for ecotoxicity studies is depending on the specific guideline requirements and the type of test substance and regulatory purpose (industrial, pharmaceutical or agrochemical). For acute fish studies a number of fresh-water fish can be used, amongst other Carp, Zebra-fish, Fathead minnow and Rainbow trout, which are the most commonly used species at [REDACTED]. For the chronic fish tests the same fish can be used but most commonly used species are Fathead minnow and Zebra-fish for the early life stage test and Carp or rainbow trout for the bioaccumulation test and Juvenile growth test.

**Origin:** Fish are obtained from approved commercial national and international suppliers. Fathead minnow are also bred and reared at [REDACTED] starting with newly obtained fish from an international supplier. Rearing is performed for a maximum period of 2 years before a new batch of fish is obtained to prevent in-breeding. ~~One day old~~ Fertilized frog eggs (*Xenopus laevis*) are obtained from a [REDACTED] authorized breeder/supplier.

**Age** of the selected animal species depends on the applicable guidelines and is often not prescribed.

Generally, for fish juveniles are used and the guideline prescribes length instead of age as a parameter for use. For the Fish short term reproduction test, fish should preferably be 4.5-6 months old and in active spawning condition. For defined studies, ~~early life stages the amphibian metamorphosis test as eggs are used to~~ with amphibians either fertilized eggs or tadpoles of developmental stage 51 are used to initiate these studies.

The number of animals and species are defined per study type with the relevant guideline in tables below.

**Table 1: Acute toxicity to fish (OECD guideline 203):**

<b>Expected toxicity</b>	<b>Type test</b>	<b>Number of groups</b>	<b>Number of fish per group</b>	<b>Total number of fish/study</b>
Unknown	Range-finding	4	3	12
Expected not toxic with uncertainty <sup>1</sup>	Combined limit / range finding	5	7 in control and highest concentration, 3 in remaining group(s)	23
Expected not toxic <sup>1</sup>	Limit	2	7	14
Toxic (base on range-finding)	Full	6	7	42

*1: In case the study was started with a range-finding test or effects were seen in the combined limit/range-finding test or limit test a full test is performed. Seven fish per group are exposed for 96 hours to, at least, five concentrations of substance and to a control group (total 42 fish). Therefore, the number of fish needed will vary between 14 (limit) and 65 (for a combined limit/range-finding test followed by a full test).*

*2: In case the results are not conclusive, classification is not possible and/or the validity criteria with respect to e.g. control mortality are not met, the study may be repeated once with the same number of animals*

**Species:** All types of fish species can be used. Selection of sub-species depends either on the regulatory purpose and authority or if not prescribed, carp will be selected.

**Table 2: Acute toxicity to fish (OPPTS guideline 850.1075):**

<b>Expected toxicity</b>	<b>Type test</b>	<b>Number of groups</b>	<b>Number of fish per group</b>	<b>Total number of fish/study</b>
Unknown	Range finding	(no control)	X	15
Expected not toxic with uncertainty <sup>1</sup>	Combined limit/range-finding	5	7 in control, 14 in the highest concentration, 3 in the remaining groups	30
Expected not toxic <sup>1</sup>	Limit	2	7 in control, 14 in the highest concentration	21

Toxic (based on range-finding)	Full	6	7 in control, 14 in the test concentrations	77
--------------------------------	------	---	---------------------------------------------	----

1: In case the study was started with a range-finding test or effects were seen in the combined limit/range-finding test or limit test a full test is performed. Fourteen fish per group are exposed for 96 hours to, at least, five concentrations of test substance and seven fish are exposed to a control group (total 77 fish). Therefore, the number of fish needed per study will typically vary between 21 (limit test) and 107 (combined limit/range-finding- followed by a full test).

2: In case the results are not conclusive, classification is not possible and/or the validity criteria with respect to e.g. control mortality are not met, the study may be repeated once with the same number of animals

**Species:** All types of fish species can be used. Selection of sub-species depends either on the regulatory purpose and authority or if not prescribed, carp will be selected.

**Table 3:** Fish Juvenile growth test (OECD 215)

Type test	Number of groups	Number of fish per group	Total number of fish/study
Full protocol	Max 7	16	96 - 112

1: In case the results are not conclusive, classification is not possible and/or the validity criteria with respect to e.g. control mortality are not met, the study may be repeated once with the same number of animals

**Species:** Different fish species like Carp, Zebra-fish or Rainbow trout) depending the guidelines can be used for this type of study. One or two controls and 5 test groups are used.

**Table 4:** Fish early life stage test (OECD 210)

Type test	Number of groups	Number of fish per group	Total number of fish/study
Full protocol	Max 7	80	480 - 560
Limit protocol	max 3	80	160 - 240

1: In case the results are not conclusive, classification is not possible and/or the validity criteria with respect to e.g. control mortality are not met, the study may be repeated once with the same number of animals

**Species:** Fathead minnow or zebra fish eggs are exposed for 28-30 days post-hatch.

**Table 5:** Bioaccumulation test (OECD 305; water spiking):

Type test	Number of groups	Number of fish per group	Total number of fish/study
Pilot to set-up extraction of substance from fish	1		Max 30
Full protocol	3	Variable, depending on length and weight of the fish	Max 150

1: In case the results are not conclusive, classification is not possible and/or the validity criteria with respect to e.g. control mortality are not met, the study may be repeated once with the same number of animals

**Species:** Carp or Rainbow trout.

**Table 6:** Bioaccumulation test (OECD 305; diet spiking):

Type test	Number of groups	Number of fish per group	Total number of fish /study
Edibility test	1		Max 10

Pilot to set-up extraction of substance from fish and or edibility check	1		Max 30
Full protocol	2	Variable, depending on length and weight of the fish	Max 125

*1: In case the results are not conclusive, classification is not possible and/or the validity criteria with respect to e.g. control mortality are not met, the study may be repeated once with the same number of animals*

**Species:** Carp or Rainbow trout.

**Table 7:** Fish short term reproduction (FSTRA, OECD 229; OPPTS 890.1350) and 21-Day Fish Assay (OECD 230)<sup>1</sup>

Type test	Number of groups	Number of fish per group	Total number of fish
Range-finding test	Max 7	3	21
Full protocol	Max 5 7	24	96 - <del>120</del> 168

*1: In case the results are not conclusive, classification is not possible and/or the validity criteria with respect to e.g. control mortality are not met, the study may be repeated once with the same number of animals*

**Species:** Fathead minnow, Zebra fish. <sup>1</sup> Both tests have the same setup regarding the number of groups, fish per group, replication and duration. They only differ in measured endpoints.

**Table 8:** Amphibian metamorphosis test (AMA, OECD 231, OPPTS 890.1100)

Type test	Number of groups	Number of amphibia per group	Total number of amphibia
Range-finding (optional)	Max 4 7	5-10	20-70
Full protocol	max 5 7	80	320 - 400 560

*1: In case the results are not conclusive, classification is not possible and/or the validity criteria with respect to e.g. control mortality are not met, the study may be repeated once with the same number of animals*

**Species:** *Xenopus laevis*, 80 per test group (4 replica's each containing 20 tadpoles), exposure via water with dissolved test substance.

**Table 9:** Larval Amphibian Growth and Development Assay (LAGDA, OECD 241)

Type test	Number of groups	Number of amphibia per group	Total number of amphibia
Range-finding (optional)	Max 7	10	70
Full protocol	max 7	80 per concentration 160 per control treatment (blank and solvent)	480 - 720

*1: In case the results are not conclusive, classification is not possible and/or the validity criteria with respect to e.g. control mortality are not met, the study may be repeated once with the same number of animals*

**Species:** *Xenopus laevis*, 80 per test concentration (4 replica's each containing 20 tadpoles), 160 per control treatment (8 replicates per treatment, each containing 20 tadpoles) exposure via water with dissolved test substance.

Clarification for the increased number of animals used in an FSTRA (OECD 229, 230, OPPTS 890.1350):

Range-finding test was added. Occasionally insufficient or no acute toxicity data are present for fish, which was not anticipated at the time of the first application. A minimum of 3 fish per group and a maximum of seven groups is sufficient for setting the range for the full test. Five groups were mentioned in the original application for the full test. However, this can be insufficient in case of a very shallow dose-response or if there is evidence from other studies that may suggest a non-monotone dose-response. Authorities (e.g. ECHA) may also request to test more than 3 test concentrations. Therefore, two additional groups were included, which results in a maximum of seven groups per full test.

Clarification for the increased number of animals used in an AMA (OECD 231, OPPTS 890.1100):

Range-finding test: The guideline is not specific with respect to the range-finding test. It only mentions its duration and character (acute toxicity). Therefore, originally, a low number of tadpoles was requested for this purpose. However, as AMA investigates sub-toxic effects rather than sub-lethal effects, this approach seems not to be appropriate. In order to correctly choose concentrations for the full test, not only mortality but rather sublethal effects, such as inhibition of growth should be investigated. As the early developmental stadia used in this test show considerable variability, 5 organisms per group is not sufficient to make a strong decision. With 5 animals per group, a difference of 41% in growth can be detected, while with 10 animals per group a difference of 28-30% can be detected using one a sided test. Moreover, in order to cover a broader range of concentrations, the maximum number of groups was increased. It should be noted that there are hardly any published data on studies with amphibians as AMA is the only available internationally recognized test covering the entire metamorphosis.

Full test: The guidelines mentions that the minimum number of groups should be three plus control treatments (blank and solvent, if applicable). The maximum spacing factor can be 10. Therefore, five groups were mentioned in the original application. However, this can be insufficient in case of a very shallow dose-response or if there is an evidence from other studies that may suggest a non-monotone dose-response. Authorities (e.g. ECHA) may also request to test more than 3 test concentrations. Therefore, two additional groups were included, which results in a maximum of seven groups per full test.

The Larval Amphibian Growth and Developmental Assay (LAGDA) is required by the regulation for the biocides as the only amphibian test. High demand for this test is expected in the coming years.

The proposed changes in study design helps to build stronger conclusions regarding the possible endocrine disrupting effects of plant protection products (PPP) and biocides. According to new European requirements<sup>1,2,3</sup> all these substances need to be scrutinized with this test.

#### References:

1. PPP: Commission Regulation (EU) 2018/605 of 19 April 2018, entry into force from 10 November 2018
2. Biocides: Commission Delegated Regulation (EU) 2017/2100 of 4 September 2017, entry into force from 7 June 2018
3. Guidance for the identification of endocrine disruptors published jointly by EFSA and ECHA on 5 June 2018 (135 pages, 7 Appendices (A-G), 1 Excel template – update published in February 2019)

Total estimated number of animals for this appendix over a 5-year period: 24750 40800.

#### C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

#### **D. Replacement, reduction, refinement**

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

██████████ is actively involved within the Dutch Three Rs centre, and regularly interacts with global regulatory agencies and European Lab Animal Science (FELASA) network, and thus is well positioned to encourage adoption and improvement of animal welfare best practice within regulatory testing and ██████████

Within the light of the NCad guideline 'Transitie naar proefdiervrij onderzoek', study designs are reviewed at regular intervals (in conjunction with changing guidelines or recommendations) as well as on an ad-hoc basis (in conjunction with the client) to incorporate available refinements, to minimise animal numbers or to reduce severity of discomfort. The company is actively involved in cross-industry initiatives, aimed at sharing best practice and application of the 3Rs.

##### **Replacement**

Only for the fish acute toxicity test an alternative is presented in the guideline (OECD 236) that describes a fish egg toxicity test. This study is available at 10.2g ██████████ might be accepted by authorities (i.e. EMA) as an accepted alternative for the standard study. In the most recent guidelines of the other fish and frog studies, as presented earlier, no authority approved alternatives are available.

##### **Reduction**

The minimal number of animals used in a study is mentioned in international guidelines. Studies are designed to obtain maximum data from the fewest number of animals. In general, the number of animals used for each study is considered to be the minimum needed to satisfy statistical criteria, however they are also based upon international guidelines, where extant, which mandate the number of groups and animals therein, to guarantee clear demonstration of any test substance effects.

Additional information which can reduce the number of animals used are: information from other aquatic studies by the manufacturer or other companies, product information and literature about similar compounds, physico chemistry data, etc. and will then be applied. The number of test concentrations might be reduced or a study might be performed as a limit test in case no toxicity is expected, this will be discussed with the client.

As the check of fish's sensitivity to reference substance is not required by any of the OECD guidelines, this will no longer be performed.

~~For fish a sensitivity check to the substance should be performed. This test is based on the OECD 203 and the ISO international Standard 7346-1, but with a limited number of fish and groups. At 10.2g ██████████ this is performed on a yearly basis with the standard species. Historical data have proven that sensitivity of these fish is similar over the past 30 years. Consequently, instead of running multiple sensitivity checks per batch, this is only performed once per year and with a limited number of fish (5 fish per group, 3 test groups, no control). Fish used in a control group of acute fish toxicity tests, can be maintained for development/validation of an analytical method for bioaccumulation studies.~~

##### **Refinement**

In the interest of animal welfare and to minimize any testing likely to produce severe responses in animals, a weight of evidence analysis will be performed prior to start of this study. All available information will be evaluated (e.g. existing environmental and aquatic toxicity data, literature, substance data supplied by the sponsor, analysis of structure activity relationships (SAR), physicochemical properties and reactivity with water to determine the need for *in vivo* testing and the concentrations to be tested. The data will also be used to decide whether a full or limit final test can be performed without a prior range-finding.



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

In order to reduce any possible adverse effects to fish from the environment, no tap-water or water from natural sources are used. We use reversed osmosis water and add salts to it to have a constant stable quality without contaminants. In addition, the medium quality is controlled by taking samples and measure pH, nitrate, nitrite and ammonia concentration on a weekly basis. Further, temperature in holding tanks is monitored continuously. Animals (fish or tadpoles/froglets) that are kept in holding tanks are observed daily for any abnormalities. In case of any abnormalities on one or a few individuals fish, these will be observed for clinical signs and if effects rise above the severity threshold level as outlined in the study plan, fish will be humanely euthanized. In case of higher number of animals showing abnormalities or specific signs that seem not normal, the designated veterinarian and AWB are consulted. During the actual fish experiments with test substance, animals are monitored at least twice daily. Dead fish animals are removed when observed. ~~Fish~~ Animals that are convulsing or showing other severe forms of distress not considered transient in nature and likely to become more severe, will be killed for humane reasons.

### Repetition and duplication

#### E. Repetition

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

The study history of the test substance will be queried from the sponsor to avoid repetition. For (agro)chemicals the Sponsor need to register a test substance at the Authorities prior to study execution. Repetition of a certain study could occur on incidental basis, for example when a previous study was poorly executed by another company. Another possibility is significant alteration of the test substance or vehicle from previous batches, which required additional testing. This repetition will normally be performed after the sponsor consulted the responsible authorities. Repetition of studies is not allowed unless specified and justified by the study director and approved by the AWB.

### Accommodation and care

#### F. Accommodation and care

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

No

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

Note: Fish and frogs are housed in glass tanks with a volume large enough to guarantee a sufficiently high oxygen level. In general a loading of maximal 1 gram test organism/litre medium is applied. If needed, aeration may be introduced to raise the oxygen level. Guidelines don't allow any additions (enrichment) in the tank. Temperature is controlled in the test room with a 16 hours light, 8 hours dark cycle. All housing conditions are without adverse effects on animal welfare.

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

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

### Classification of discomfort/humane endpoints

## H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

No anesthesia or analgesia will be used as a relief for pain caused by test substance as this is not compliant with ecotox study objectives. Terminal anesthesia is only applied to fish exposed in the endocrine disruption test (Fish short term reproduction test) immediately before blood sampling from the caudal vein/artery. Fish in the short term reproduction test are rapidly anesthetized by exposing them to Tricaine.

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

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

The most commonly observed adverse effects are caused by exposure to the test substance when testing fish or tadpoles at 10.2 g. Occasionally, poor environmental conditions (indirectly due to test substance affecting water quality parameters) might cause discomfort, e.g. decreasing oxygen concentrations in fish tests. However, due to the daily monitoring and daily measurement of these environmental conditions (i.e. temp, pH and oxygen) this will normally only be for a short time and not likely to result in severe effects. If oxygen concentrations tend to decrease below 5 mg/L aeration is introduced to prevent discomfort. pH levels of test solutions will be adjusted before the study start (if outside 6-9) to prevent pH related discomfort.

Explain why these effects may emerge.

The aim of most of the ecotox studies is to determine toxicity of a test substance. Adverse effects after exposure of substance(s) can occur during studies. Depending the effects, actions will be implemented according the SOP which might include HEP and in consultation with the AWB.

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

The animals will be closely monitored in order to make sure that animals will be timely euthanized according to humane endpoints. A SOP is in place that describes severity ratings ('ongrief') and actions to be taken depending the severity. A veterinarian and the AWB will be involved during this process in case the severity level exceeds the expected severity level according to the study plan.

## J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

Animals that are showing stress or pain which is not expected to be temporary in nature or can become more transient, will be sacrificed based on OECD guidance document on humane end points (ENV / JM / MOMO / 2000/7). A SOP describing the procedures and when this should be applied is in place for both fish and frog testing.

Indicate the likely incidence.

The incidence depends highly on the type of study and the test substance examined. In acute toxicity studies incidence tends to be higher than in chronic studies when, in general, sub lethal low concentrations are tested. The Estimated percentage is <5% for acute studies and less than 1% for chronic studies.

## K. Classification of severity of procedures

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

The expected severity depends on the type of study. For acute toxicity tests in fish the clinical observations indicating discomfort can range between 'mildabsent' and 'severe' considering the nature of testing. For

chronic and endocrine disruptor studies (AMA, FSTRA, LAGDA), the maximum expected level of discomfort is 'mild' to 'moderate'. Incidentally, the severity could increase to severe in case effects are observed for multiple days and as such the severity rating gradually increases, which is prescribed in the applicable SOP.

**Table 8 10:** Percentage of animals & expected levels of discomfort

Species	% mild	% moderate	% severe
Fish/Amphibia - Acute	40-50	40-50	<10
Fish/Amphibia - Chronic	55-65	35-45	<1

### End of experiment

#### L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

Fish (~~used for the short term reproduction test; OECD 229~~) and tadpoles will be euthanized at the end of the exposure period ~~to use biological materials for further analysis (e.g. histopathology)~~. Surplus fish and tadpoles cannot be re-used in other studies. ~~and will be killed (or~~ However, they may be used for training/education purposes or as post-mortem biological material (in separate project proposal)).

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

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

X Yes

## Bijlage tabellen dieraantallen en ongerief

Wijzigingen in rood aangegeven

Aantallen dieren en ongerief per bijlage dierproeven behorende bij vergunning AVD 10.2.g

## Bijlage dierproeven 3.4.4.1

Type dierstudies en aantallen Appendix 1	Rodent (rat, mouse, hamster, guinea pig)			Ongerief
	Gemiddeld aantal studies per jaar	Gemiddeld aantal dieren per studie	Totaal aantal dieren voor 5 jaar	
Acute/short term studies	350	9.5	16625	Moderate / Severe
Range finding/pilot studies	26	15	1947	Moderate / Severe
Repeated dose studies up to 90 days	37	81.5	15078	Mild / Moderate
Repeated dose studies > 90 days	7	286	10010	Mild / Moderate

Type dierstudies en aantallen Appendix 1	Non-Rodent (dog, minipig, rabbit, cat)			Ongerief
	Gemiddeld aantal studies per jaar	Gemiddeld aantal dieren per studie	Totaal aantal dieren voor 5 jaar	
Acute/short term studies	47	3	705	Moderate / Severe
Range finding/pilot studies	22	5.8	635	Moderate / Severe
Repeated dose studies up to 90 days	20	31.8	3180	Mild / Moderate
Repeated dose studies > 90 days	3.5	42	735	Mild / Moderate

## Bijlage dierproeven 3.4.4.2

Type dierstudies en aantallen Appendix 2	Rodent (rat)			Ongerief
	Gemiddeld aantal studies per jaar	Gemiddeld aantal dieren per studie	Totaal aantal dieren voor 5 jaar	
Range finding for developmental studies	11	300	16500	Moderate / Severe
Developmental studies	11	1200	66000	Mild / Moderate
Range finding for reproduction studies	33	6	990	Moderate / Severe
Reproduction studies	38	755	143450	Mild / Moderate

Type dierstudies en aantallen Appendix 1	Non-Rodent (rabbit)			Ongerief
	Gemiddeld aantal studies per jaar	Gemiddeld aantal dieren per studie	Totaal aantal dieren voor 5 jaar	
Range finding for developmental studies	10.2	240	12240	Moderate / Severe
Developmental studies	10.2	960	48960	Mild / Moderate

**Bijlage dierproeven 3.4.4.3**

Type dierstudies en aantallen Appendix 3	Rodent (rat, mouse, hamster)			Ongerief
	Gemiddeld aantal studies per jaar	Gemiddeld aantal dieren per studie	Totaal aantal dieren voor 5 jaar	
(DM)PK study (ICH/OECD)	30	25	3750	Mild / Moderate
	10	60	3000	
ADME study (OECD417/OECD427/ICH)	12	40	2400	Moderate
	3	40	600	

Type dierstudies en aantallen Appendix 3	Non-Rodent (dog, minipig, cat, rabbit)			Ongerief
	Gemiddeld aantal studies per jaar	Gemiddeld aantal dieren per studie	Totaal aantal dieren voor 5 jaar	
(DM)PK study (ICH/OECD)	25 (hond; hergebruik)*	8	120	Mild / Moderate
	5 (mini-varken)	6	150	
ADME study (OECD417/OECD427/ICH)	2 (konijn)	8	80	
	2 (kat; hergebruik)**	8	20	
(DM)PK study (ICH/OECD)	3 (hond; hergebruik)*	8	16	Mild / Moderate
	2 (mini-varken)	8	80	
ADME study (OECD417/OECD427/ICH)	5 (hond; hergebruik)*	24	24	Moderate
	5 (kat; hergebruik)**	24	55	

\*Pool van 32 honden, max 12x hergebruik. Ongeveer 340 dieren per jaar nodig, =10 studies. Voor 5 jaar dus 5\*32 honden = 160 honden nodig. Verdeeld over PK, ADME en BE.

\*\*Pool van 30 katten, max 12x hergebruik. Ongeveer 14 studies per jaar met 32 katten. Dus voor 5 jaar: 2,5\*30 = 75 katten voor 5 jaar. Verdeeld over PK en BE.

**Bijlage dierproeven 3.4.4.4**

Type dierstudies en aantallen Appendix 4	Fish - Clawed Frog			Ongerief
	Gemiddeld aantal studies per jaar	Gemiddeld aantal dieren per studie	Totaal aantal dieren voor 5 jaar	
Acute Fish Tests	43	30	6450	Mild / Moderate / Severe
Fish Early Life Stage studies	8.4	400	16800	Mild / Moderate
Bioaccumulation studies	4.8	125	3000	Mild / Moderate
Fish Chronic ED studies	6	125	3750	Mild / Moderate
Amphibian Chronic ED studies (klauwkikker)	4.8	450	10800	Mild / Moderate

Overzicht aantallen en geschat ongerief per diersoort over Appendices 1,2,3 en 4.

Diersoort	In projectaanvraag (voor 5 jaar)	Ongerief: % Mild-Moderate-Severe
Muis	22500	50-45-5
Rat	256000	50-45-5
Hamster	200	50-49-1
Cavia	1600	50-49-1
Konijn	62500	50-45-5
Hond	2600	50-45-5
Kat	750	50-49-1
Minivarken	1200	50-45-5
Klauwkikker	10800	50-45-5
Vis	30000	50-45-5

**doc 8 nts niet ingevoegd**

10.2.g

9

Aan: Centrale Commissie Dierproeven  
Postbus 93118  
2509 AC Den Haag

Van: 10.2.e  
Vergunninghouder 10.2.g  
10.2.g

Betreft: Wijzigingsaanvraag behorende bij project(vergunning) AVD 10.2.g  
Bijlagen: 7

Datum: 6 augustus 2020

Geachte CCD,

Gaarne verzoeken wij u de onderhavige wijzigingsaanvraag behorende bij project(vergunning) AVD 10.2.g (*In vivo studies to enable and support regulatory testing programs for the safety evaluation of medicinal products, chemicals, plant protection products, biocides, medical devices, feed and foods*) te beoordelen.

Samengevat vragen wij u toestemming om de verleende vergunning -over de periode 1 januari 2018 tot en met 31-december 2022- aan te passen ten aanzien van het aantal proefdieren, uit te breiden met een nieuwe regulatoire test voor onderzoek met de klauwkikker, alsmede het aanbrengen van een tweetal technische aanpassingen.

De reden voor dit verzoek is gebaseerd op de ervaring opgedaan in de eerste twee jaren van de projectvergunningsperiode en op de huidige inschatting van de (inter)nationale marktvrage en de ontwikkelingen op het gebied van regelgeving.

Onze inschatting van het aantal benodigde proefdieren gemaakt in augustus 2017, blijkt na twee jaar voor een aantal diersoorten (muis, hamster, cavia, hond, kat) adequaat te zijn met een verbruik van minder dan 40% van het aangevraagde totaal. De huidige verwachting is dat voor deze diersoorten de (5-jaars) totalen afdoende zullen zijn.

Echter, voor de diersoorten rat (49%), konijn (80%) en vis (45%) ligt het verbruikpercentage nu reeds hoger dan destijds ingeschat en is de verwachting dat deze trend zich versterkt zal voortzetten. Een aparte vermelding verdient de klauwkikker (in voorgaande documentatie incorrect als klauwpad



aangeduid), waarmee in de eerste twee jaren nog geen studies werden uitgevoerd, maar waar gebaseerd op nieuwe vereisten in de regelgeving<sup>1\*</sup>, aanpassing in testdesigns en toevoeging van de OECD 241 Test (The Larval Amphibian Growth and Developmental Assay), naar verwachting de vraag vanaf dit jaar ruim zal stijgen boven het oorspronkelijk aangevraagde totaal (zie ook tabel 1).

Voornoemde ontwikkelingen hangen ons inziens nauw samen met een verhoogde vraag vanuit de (agro)chemische en farmaceutische industrie voor uitvoer van regelgedreven studies op basis van besluiten van de Europese Commissie voor chemische producten (ECHA) en instanties voor toelating van geneesmiddelen (EMA, FDA).

Meenden wij drie jaar geleden nog rekening te moeten houden met een klein aantal zogenoemde 'Extended One Generation Studies' (EOGRTS) met ratten, inmiddels worden er tientallen van deze omvangrijke (OECD 433) studies (tot ca 2370 ratten/studie) door de ECHA van de industrie gevraagd. Vaak met nog noodzakelijke voorstudies. Testcapaciteit in Nederland is met het wegvallen van de organisatie 10.2 g verder afgenomen. Mogelijk dat dit mede een rol heeft gespeeld bij de grote vraag die wij, 10.2 g, mogen ervaren, naast het feit dat onze opdrachtgevers aangeven deze specialistische en logistiek uitdagende studies graag aan ons toe te vertrouwen. Dit moge ook blijken uit het feit dat onze planning al tot ruim in 2021 reikt.

De verhoogde vraag naar de EOGRT studies betreft verder ook (OECD 414) teratologiestudies met ratten (max ca. 1520 ratten in hoofdstudie) en konijnen (max ca 960 konijnen in hoofdstudie). Aanleiding voor deze toename kan mede gelegen zijn in het feit, dat de ECHA een aanzienlijk percentage (32% van de stoffen met een tonnage van >1000 ton) van de ingediende dossiers als onvolledig heeft bestempeld (constatering gemaakt tijdens een REACH Compliance Workshop in Duitsland (BfR Communication No 030/2018, 25 September 2018). Hierdoor is extra onderzoek vereist voordat tot evaluatie en (her)registratie kan worden overgegaan.

Als eerder aangegeven, is de aandacht en marktontwikkeling voor studies naar effecten op het milieu met vissen en klauwkickers sterk groeiende. Eenzelfde beeld zien wij op het gebied van de ontwikkeling van nieuwe medicijnen en vaccins, waarbij voor de studies met vaccins veelal het konijn als proefdier wordt ingezet.

Op basis van de opgedane ervaringen en geschetste (markt)ontwikkelingen komen wij in onderstaande tabel (1) tot de aangepaste aantallen proefdieren voor de diersoorten rat, konijn, klauwkikker en vis.

---

<sup>1</sup> \*PPP: Commission Regulation (EU) 2018/605 of 19 April 2018, entry into force from 10 November 2018

\*Biocides: Commission Delegated Regulation (EU) 2017/2100 of 4 September 2017, entry into force from 7 June 2018

\*Guidance for the identification of endocrine disruptors published jointly by EFSA and ECHA on 5 June 2018 (135 pages, 7 Appendices (A-G), 1 Excel template – update published in February 2019)

Tabel 1: Geschat aantal proefdieren over 5-jaars projectvergunningsperiode. In rood staan de bijgestelde getallen weergegeven.

Geschat aantal proefdieren voor periode van 5 jaar	
Muis	22500
Rat	<del>190000</del> 256000
Hamster	200
Cavia	1600
Konijn	<del>22250</del> 62500
Hond	2600
Kat	750
Minivarken	1200
Klauwkikker	<del>2750</del> 10800
Vis	<del>22000</del> 30000

Bij dit schrijven is een zevental bijlagen toegevoegd, zijnde de complete oorspronkelijke projectvergunningsaanvraag inclusief aanpassingen in rood.

- 1) ~~10.2.g~~-format-nts-~~10.2.g~~-W-f (met aanpassing in § 3.3)
- 2) ~~10.2.g~~-aanvraag-projectvergunning-1.1-~~10.2.g~~-W-f (als wijzigingsaanvraag; punt 1-6)
- 3) ~~10.2.g~~-project-proposal-form-1.2-~~10.2.g~~-W-f (met aanpassing in § 3.4)
- 4) ~~10.2.g~~-appendix-description-animal-procedures-1.3-Appendix 1-General Toxicology-~~10.2.g~~-W-f (met aanpassing in F)
- 5) ~~10.2.g~~ appendix-description-animal-procedures-1.3-Appendix 2-Developmental and Reproductive Toxicology-~~10.2.g~~ W-f (geen aanpassing)
- 6) ~~10.2.g~~-appendix-description-animal-procedures-1.3-Appendix 3-ADME and DMPK-~~10.2.g~~W-f (met aanpassing in § 2A, 2B en F)
- 7) ~~10.2.g~~-appendix-description-animal-procedures-1.3-Appendix 4-Ecotoxicology-~~10.2.g~~-W-f (met aanpassing in § 2A, 2B, D, K en L).

Vertrouwende u hiermee voldoende te hebben geïnformeerd, zien wij gaarne uw reactie tegemoet.

Met vriendelijke groet,

10.2.e

~~10.2.g~~

~~10.2.g~~

~~10.2.e~~

~~10.2.e~~

~~10.2.g~~

~~10.2.g~~

**Van:** 10.2.g  
**Aan:** info@zbo-ccd.nl  
**Onderwerp:** RE: Verzoek om advies over projectvergunningsaanvraag AVD 10.2.g  
**Datum:** dinsdag 11 augustus 2020 18:24:37

---

Geachte commissie en medewerkers,  
Bedankt voor uw verzoek. Wij nemen dit dossier in behandeling. Ik kan nog niet zeggen wanneer. Wegens corona spreken wij incidenteel online af als iedereen de stukken heeft gelezen. Dit zal ongeveer binnen een week gebeuren.

Met vriendelijke groet,

10.2.e

10.2.g

10.2.e

**From:** info@zbo-ccd.nl

**Sent:** Monday, August 10, 2020 10:22

**To:** 10.2.g 10.2.g 10.2.g

**Subject:** Verzoek om advies over projectvergunningsaanvraag AVD 10.2.g

Geachte leden van 10.2.g

De Centrale Commissie Dierproeven (hierna: CCD) verzoekt u in het kader van wijziging van een vergunning advies te geven over het project met als titel: "In vivo studies to enable and support regulatory testing programs for the safety evaluation of medicinal products, chemicals, plant protection products, biocides, medical devices, feed and foods" en aanvraagnummer: AVD 10.2.g

Uw commissie wordt verzocht op grond van artikel 10.a.2 van de Wet op de dierproeven de aanvraag te beoordelen en een ethische toetsing uit te voeren waarbij wordt afgewogen of de doelstelling van het project, de verwachte voordelen voor mens, dier of milieu en de haalbaarheid van de doelstellingen, het gebruik van dieren en de schade die zal worden toegebracht aan de dieren in de vorm van lijden, pijn en angst kan rechtvaardigen.

Graag ontvangen wij van u bericht dat deze e-mail goed is ontvangen en wanneer u dit advies in de vergadering gaat bespreken.

Voor het in te dienen advies dient de DEC gebruik te maken van de meest actuele versie van het op de website van de CCD gepubliceerde Format DEC-advies en de toelichting daarbij. U dient deze aanvraag vertrouwelijk te behandelen. Voor de communicatie met de CCD dient u gebruik te maken van FileSecure.

De CCD verzoekt u uiterlijk binnen 20 werkdagen, na 10-08-2020, uw advies bij de CCD in te dienen. Indien de aanvraag door uw commissie niet in behandeling kan worden genomen, dient u dit per ommekeer per e-mail aan de CCD te melden.

Ingeval uw commissie tussentijds aanvullende informatie wil inwinnen bij de aanvrager wordt de termijn opgeschort en geeft u in uw advies aan wanneer dit is geweest. Opschorting van de adviestermijn vindt niet plaats ingeval u ten behoeve van uw advies een onafhankelijk extern expert raadpleegt. Mocht u verwachten door een andere reden dan opschorting uw advies later

dan 20 werkdagen na 10-08-2020 bij de CCD in te dienen, dan verzoeken wij u dit direct aan de CCD te melden.

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

Met vriendelijke groet,  
Centrale Commissie Dierproeven

[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

.....  
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag  
.....

T: 0900 2800028

E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl) Dit bericht kan informatie bevatten die niet voor u is bestemd. Indien u niet de geadresseerde bent of dit bericht abusievelijk aan u is gezonden, wordt u verzocht dat aan de afzender te melden en het bericht te verwijderen.

De Staat aanvaardt geen aansprakelijkheid voor schade, van welke aard ook, die verband houdt met risico's verbonden aan het elektronisch verzenden van berichten.

This message may contain information that is not intended for you. If you are not the addressee or if this message was sent to you by mistake, you are requested to inform the sender and delete the message.

The State accepts no liability for damage of any kind resulting from the risks inherent in the electronic transmission of messages.

**Van:** 10.2.e  
**Aan:** info-zbo  
**Cc:** 10.2.e  
**Onderwerp:** RE: [External]: OntvangstBevestiging wijziging aanvraag AVD 10.2.g  
**Datum:** dinsdag 11 augustus 2020 18:08:10

---

Beste mevrouw 10.2.e  
 Dank voor uw bericht en ontvangstbevestiging.  
 Met vriendelijke groet,  
 10.2.e  
 Vergunninghouder 10.2.g

-----Original Message-----

**From:** Info-zbo <info@zbo-ccd.nl>  
**Sent:** Tuesday, August 11, 2020 9:05 AM  
**To:** 10.2.e  
**Cc:** 10.2.e  
**Subject:** RE: [External]: OntvangstBevestiging wijziging aanvraag AVD 10.2.g

Beste meneer 10.2.e

Hierbij bevestig ik dat wij de originele aanvraagformulier hebben ontvangen. Ik dank u voor uw medewerking en voor het toesturen van het formulier.

Met vriendelijke groet,

10.2.e  
 CCD

-----Oorspronkelijk bericht-----

**Van:** 10.2.e  
**Verzonden:** maandag 10 augustus 2020 12:39  
**Aan:** Info-zbo <info@zbo-ccd.nl>  
**CC:** 10.2.e  
**Onderwerp:** Re: [External]: OntvangstBevestiging wijziging aanvraag AVD 10.2.g

Geachte mevrouw 10.2.e

dank voor de bevestiging. Vorige week donderdag is het originele document met handtekening reeds aan u gezonden. Verneem graag ook hiervan de goede ontvangst. Met vriendelijke groet,

10.2.e  
 Vergunninghouder  
 10.2.g

iP-EMH

> Op 10 aug. 2020 om 10:27 heeft Info-zbo <info@zbo-ccd.nl> het volgende geschreven:  
 >  
 > Geachte drs. 10.2.e,  
 >  
 > In de bijlage treft u de ontvangstbevestiging van uw wijziging aanvraag aan, waarnaar wij gemakshalve naar verwijzen.  
 > Graag verzoeken wij u om het getekend originele aanvraag met het AVD-nummer naar ons toe te sturen.  
 >  
 >  
 > Met vriendelijke groet,  
 >  
 > 10.2.e

>

> Namens:

> Centrale Commissie Dierproeven

> 10 2 e



>

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

>

> T: 0900 2800028

> E: info@zbo-ccd.nl

>

>

>

> Dit bericht kan informatie bevatten die niet voor u is bestemd. Indien

> u niet de geadresseerde bent of dit bericht abusievelijk aan u is

> gezonden, wordt u verzocht dat aan de afzender te melden en het

> bericht te verwijderen.

> De Staat aanvaardt geen aansprakelijkheid voor schade, van welke aard

> ook, die verband houdt met risico's verbonden aan het elektronisch

> verzenden van berichten.

>

> This message may contain information that is not intended for you. If

> you are not the addressee or if this message was sent to you by

> mistake, you are requested to inform the sender and delete the message.

> The State accepts no liability for damage of any kind resulting from

> the risks inherent in the electronic transmission of messages.

> <OntvangstBevestiging.pdf>

Dit bericht kan informatie bevatten die niet voor u is bestemd. Indien u niet de geadresseerde bent of dit bericht abusievelijk aan u is gezonden, wordt u verzocht dat aan de afzender te melden en het bericht te verwijderen.

De Staat aanvaardt geen aansprakelijkheid voor schade, van welke aard ook, die verband houdt met risico's verbonden aan het elektronisch verzenden van berichten.

This message may contain information that is not intended for you. If you are not the addressee or if this message was sent to you by mistake, you are requested to inform the sender and delete the message.

The State accepts no liability for damage of any kind resulting from the risks inherent in the electronic transmission of messages.

**Van:** 10.2.e  
**Aan:** 'Info-zbo'; 10.2.g  
**Onderwerp:** RE: Verzoek om advies over projectvergunningsaanvraag AVD 10.2.g  
**Datum:** dinsdag 11 augustus 2020 16:46:34

---

Beste mw 10.2.e

Vriendelijk dank voor het begeleidend schrijven.

Zou u ook nog zo vriendelijk willen zijn het oorspronkelijke advies te willen versturen via Filesecure?

Met vriendelijke groeten,

10.2.e

**From:** Info-zbo

**Sent:** Tuesday, August 11, 2020 9:15 AM

**To:** 10.2.e 10.2.g

**Subject:** RE: Verzoek om advies over projectvergunningsaanvraag AVD 10.2.g

Beste mevrouw 10.2.e

Hierbij alsnog de begeleidende brief van desbetreffende onderzoeker. Excuus dat het niet automatisch is meegestuurd met de andere bestanden die u al heeft ontvangen.

Met vriendelijke groet,

10.2.e

Centrale Commissie Dierproeven

[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

.....  
 Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag  
 .....

T: 0900 2800028

**Van:** 10.2.e

**Verzonden:** maandag 10 augustus 2020 14:13

**Aan:** 10.2.g 'Info-zbo' <[info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)>

**Onderwerp:** RE: Verzoek om advies over projectvergunningsaanvraag AVD 10.2.g

Beste medewerkers CCD,

Via de secretaris van 10.2.g ontvang ik de beveiligde stukken over een wijziging.

In de projectaanvraag wordt verwezen naar een begeleidende brief voor de onderbouwing van de wijzigingen, helaas is deze brief niet naar ons meegestuurd.

Zonder die brief kunnen wij de rechtvaardiging van de wijziging echter niet beoordelen. Zou u zo vriendelijk willen zijn ons ook deze brief te sturen? Anders moet ik die bij de onderzoeker alsnog weer opvragen.

Daarnaast zou ik graag een afschrift van het oorspronkelijke advies ontvangen, zodat we in dat advies de wijzigingen kunnen opnemen en onze afweging toevoegen.

Met vriendelijke groeten,

10.2.e

Voorzitter 10.2.g

**From:** [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl) <[info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)>

**Sent:** Monday, August 10, 2020 10:22

**To:** 10.2.g 10.2.g 10.2.g

**Subject:** Verzoek om advies over projectvergunningsaanvraag AVD 10.2.g

Geachte leden van 10.2.g

De Centrale Commissie Dierproeven (hierna: CCD) verzoekt u in het kader van wijziging van een

vergunning advies te geven over het project met als titel: "In vivo studies to enable and support regulatory testing programs for the safety evaluation of medicinal products, chemicals, plant protection products, biocides, medical devices, feed and foods" en aanvraagnummer:

AVD102g

Uw commissie wordt verzocht op grond van artikel 10.a.2 van de Wet op de dierproeven de aanvraag te beoordelen en een ethische toetsing uit te voeren waarbij wordt afgewogen of de doelstelling van het project, de verwachte voordelen voor mens, dier of milieu en de haalbaarheid van de doelstellingen, het gebruik van dieren en de schade die zal worden toegebracht aan de dieren in de vorm van lijden, pijn en angst kan rechtvaardigen.

Graag ontvangen wij van u bericht dat deze e-mail goed is ontvangen en wanneer u dit advies in de vergadering gaat bespreken.

Voor het in te dienen advies dient de DEC gebruik te maken van de meest actuele versie van het op de website van de CCD gepubliceerde Format DEC-advies en de toelichting daarbij. U dient deze aanvraag vertrouwelijk te behandelen. Voor de communicatie met de CCD dient u gebruik te maken van FileSecure.

De CCD verzoekt u uiterlijk binnen 20 werkdagen, na 10-08-2020, uw advies bij de CCD in te dienen. Indien de aanvraag door uw commissie niet in behandeling kan worden genomen, dient u dit per ommegaande per e-mail aan de CCD te melden.

Ingeval uw commissie tussentijds aanvullende informatie wil inwinnen bij de aanvrager wordt de termijn opgeschort en geeft u in uw advies aan wanneer dit is geweest. Opschorting van de adviestermijn vindt niet plaats ingeval u ten behoeve van uw advies een onafhankelijk extern expert raadpleegt. Mocht u verwachten door een andere reden dan opschorting uw advies later dan 20 werkdagen na 10-08-2020 bij de CCD in te dienen, dan verzoeken wij u dit direct aan de CCD te melden.

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

Met vriendelijke groet,  
Centrale Commissie Dierproeven

[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

.....  
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag

.....  
T: 0900 2800028

E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl) Dit bericht kan informatie bevatten die niet voor u is bestemd. Indien u niet de geadresseerde bent of dit bericht abusievelijk aan u is gezonden, wordt u verzocht dat aan de afzender te melden en het bericht te verwijderen.

De Staat aanvaardt geen aansprakelijkheid voor schade, van welke aard ook, die verband houdt met risico's verbonden aan het elektronisch verzenden van berichten.



This message may contain information that is not intended for you. If you are not the addressee or if this message was sent to you by mistake, you are requested to inform the sender and delete the message.

The State accepts no liability for damage of any kind resulting from the risks inherent in the electronic transmission of messages.

Dit bericht kan informatie bevatten die niet voor u is bestemd. Indien u niet de geadresseerde bent of dit bericht abusievelijk aan u is gezonden, wordt u verzocht dat aan de afzender te melden en het bericht te verwijderen.

De Staat aanvaardt geen aansprakelijkheid voor schade, van welke aard ook, die verband houdt met risico's verbonden aan het elektronisch verzenden van berichten.

This message may contain information that is not intended for you. If you are not the addressee or if this message was sent to you by mistake, you are requested to inform the sender and delete the message.

The State accepts no liability for damage of any kind resulting from the risks inherent in the electronic transmission of messages.

## Format DEC-advies

---

### A. Algemene gegevens over de procedure

Aanpassingen voor wijziging 10.2.g in rood

1. Aanvraagnummer 10.2.g
2. Titel van het project: In vivo studies to enable and support regulatory testing programs for the safety evaluation of medicinal products, chemicals, plant protection products, biocides, medical devices, feed and foods.
3. Titel van de NTS: 10.2.g
4. Type aanvraag:
  - nieuwe aanvraag projectvergunning
  - wijziging van vergunning met nummer 10.2.g
5. Contactgegevens DEC:
  - naam DEC: 10.2.g
  - telefoonnummer contactpersoon: 10.2.g
  - e-mail adres contact persoon: 10.2.g
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
  - ] ontvangen door DEC: 11-7-2020
  - ] aanvraag compleet: 11-7-2020
  - ] in vergadering besproken: schriftelijk behandeld (e-maildiscussie)
  - ] anderszins behandeld:
  - ] termijnonderbreking(en) van / tot: van 27-8-2020 tot 4-9-2020
  - ] besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
  - ] aanpassing aanvraag: 4-9-2020
  - ] advies aan CCD: 14-8-2020
7. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.

De aanvraag is afgestemd met de IvD.

*Bij de punten 8 t/m 10 kan worden volstaan met 'n.v.t.' wanneer de betreffende acties niet aan de orde zijn geweest.*

8. Eventueel horen van aanvrager n.v.t.
  - Datum: n.v.t.
  - Plaats: n.v.t.
  - Aantal aanwezige DEC-leden: n.v.t.
  - Aanwezige (namens) aanvrager: n.v.t.
  - Gestelde vraag / vragen: n.v.t.
  - Verstrek(e) antwoord(en): n.v.t.
  - Het horen van de aanvrager heeft wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag n.v.t.

3 augustus 2017

9. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: 4-9-2020 (vragen gestuurd, zie termijnonderbreking bij 6)
- Gestelde vraag/vragen: zie onder vraag 9
- Datum antwoord: 4-9-2020
- Verstrek(e) antwoord(en): zie onder vraag 9
- De antwoorden hebben wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag

Onze vragen:

1. De DEC heeft vragen over de rechtvaardiging van de aantallen dieren en de onderbouwing van met name het aantal extra benodigde konijnen. Kunt u de aantallen extra dieren nader onderbouwen, bijvoorbeeld met schattingen van aantallen studies die ten grondslag liggen aan de gewijzigde aantallen?

De voorgestelde aanpassingen hangen nauw samen met een verhoogde vraag vanuit de (agro)chemische en farmaceutische industrie voor uitvoer van regelgedreven studies op basis van besluiten van de Europese Commissie voor chemische producten (ECHA) en instanties voor toelating van geneesmiddelen. Aanleiding voor deze verhoogde vraag kan mede gelegen zijn in het feit dat de ECHA meer dan 30% van de ingediende dossiers als incompleet heeft bestempeld (oktober, 2018) en zonder aanvullend onderzoek niet accepteert voor evaluatie en registratie (zie ook punt 4). Dit betreft met name de uitvoer van studies met ratten naar effecten op het nageslacht, studies met konijnen en ratten naar ontwikkelingsstoornissen en aangeboren afwijkingen, als ook studies naar effecten op het milieu met vissen en klauwkickers.

Inzake de verhoogde vraag naar het aantal konijnenstudies betreft dit voor het grootste deel (80-90%) de OECD 414 test. Per te onderzoeken stof bestaat de studie in de regel uit een Tolerability Study (met gemiddeld 6 konijnen), een Dose Range Finding Study (met gemiddeld 216 konijnen (=4 groepen x 6 drachtige konijnen + 24 nesten x foeten/nest)) en een Main Study (met gemiddeld 792 konijnen (=4 groepen x 22 drachtige konijnen + 88 nesten x 8 foeten/nest)). Per OECD 414 studiepakket betreft dit derhalve ca. 1000 konijnen. Met 12-15 studies per jaar betekent dit een aantal van 12000-15000 konijnen op jaarbasis.

2. Het konijn is een minder courant model in vaccinonderzoek, maar wordt voor sommige veterinaire vaccins gebruikt en voor de pyrogeniciteitstest. Voor deze laatste test bestaan alternatieven. Omdat de toename van aantallen konijnen zeer significant is, en u een relatie legt tussen konijnen en vaccinonderzoek, zou de DEC het gebruik van de extra konijnen graag verder toegelicht en onderbouwd willen zien.

In lijn met wat de DEC stelt, 'zijn er alternatieven voor pyrogeniciteitsstudies' en voeren wij dit type studies niet uit.

Wel voeren wij vaccin studies uit met konijnen, maar dit is percentueel gering in aantal (ca 10%) in vergelijking met het aantal OECD 414-studies als onder punt 1 en 4 van verdere onderbouwing voorzien.

3. Worden de extra dieren alleen gebruikt vanuit een wettelijke vereiste, of is er ook sprake van onderzoek dat niet wettelijk verplicht is?

Het antwoord hierop is, 'ja, alleen onderzoek in het kader van een wettelijke verplichting, aannemende dat hier ook de noodzakelijke validatiestudie (om aan te tonen dat met de testopzet het beoogde doel kan worden bereikt) mag worden

verstaan'. Dit heeft in de projectaanvraag betrekking op de OECD 241 studie (Appendix 4, Larval Amphibian Growth and Development Assay).

4. In de praktijk blijkt dat veel studies moeten worden uitgevoerd vanwege het feit dat registratiedossiers niet voldoen aan de wettelijke basisvereiste. Zie ook een recente publicatie, "*Checks on more than 3,800 REACH dossiers have found that 32% for substances at tonnage levels of 1,000tpa and above were found to be non-compliant*" (REACH registration project finds low compliance rates, 03 October 2018, Major German exercise finds one-third of dossiers lack data). Maakt dit onderzoek ook onderdeel uit van de gewijzigde vraag naar 0,2 g bij uw organisatie? Indien dit het geval is, kunt u dit dan vermelden in uw aanvraag en in de NTS? Wij hebben zeker de indruk dat dit een trigger vormt voor de verhoogde vraag naar 0,2 g die wij ervaren (en in deze projectwijzigingsaanvraag hebben verdisconteerd). Onze analyse is dat met name het aantal studies met konijnen een grote(re) toename ondervindt omdat deze in eerste instantie vaak door de indieners zijn 'gewaived', met als argument dat er reeds een OECD 414 studie in de rat beschikbaar is. De registratie autoriteiten accepteren deze redenatie evenwel niet. Dank voor de suggestie om dit punt in de aanvraag en NTS op te nemen (is doorgevoerd).

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

- Aard expertise
- Deskundigheid expert
- Datum verzoek
- Strekking van het verzoek
- Datum expert advies
- Advies expert

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

1. Is het project vergunning plichtig (dierproeven in de zin der wet)? Indien van toepassing, licht toe waarom het project niet vergunning plichtig is en of daar discussie over geweest is.  
*Indien niet vergunning plichtig, ga verder met onderdeel E. Advies.*  
Het project is vergunningplichtig. *Niet gewijzigd ten opzichte van oorspronkelijk advies.*
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag / een wijziging op een bestaande vergunning.  
De aanvraag betreft een wijziging op een bestaande vergunning.
3. Is de DEC competent om hierover te adviseren?  
De DEC heeft voldoende expertise om hierover te adviseren. *Niet gewijzigd ten opzichte van oorspronkelijk advies.*
4. Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies.  
Indien van toepassing, licht toe waarom.  
Er zijn geen DEC-leden uitgesloten van de behandeling van de aanvraag. Alle leden hebben onpartijdig en onafhankelijk deel kunnen nemen aan de advisering.

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

3 augustus 2017

1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft (*Zie handreiking 'Invulling definitie project'; zie bijlage I voor toelichting en voorbeeld*). De aanvraag is toetsbaar en heeft voldoende samenhang.

De aanvraag betreft richtlijn-gedreven onderzoek aan (dier)geneesmiddelen, (agro)chemicaliën, biociden, medische hulpmiddelen en voedingsingrediënten gericht op veiligheidsrisico's voor mens, dier en milieu. Het onderzoek wordt uitgevoerd om te voldoen aan de registratie eisen van overheden en autoriteiten wereldwijd die zijn vastgelegd in wet en regelgeving. Verschillende aspecten van de schadelijke werking worden onderzocht in diverse dierproeven. Welke dierproeven daartoe nodig zijn en hoe zij moeten worden uitgevoerd wordt bepaald door de aard van de stof en is beschreven in internationale wet en regelgeving. Voor de overzichtelijkheid zijn de dierproeven in deze aanvraag gegroepeerd in vier appendices. De DEC [REDACTED] is van mening dat deze terecht zijn ondergebracht in één project omdat zij voortvloeien uit wettelijke verplichtingen, en hetzelfde einddoel dienen. Verder ook omdat voor elke stof geldt dat resultaten van studies uit verschillende appendices nodig kunnen zijn voor de beoordeling van de veiligheid van stoffen/producten voor mens, dier en milieu en opgenomen worden in een registratiedossier van de betreffende stof/product en in die zin dan in samenhang worden uitgevoerd.

De aanvraag betreft een parapluaanvraag van een [REDACTED]. Dit betekent dat de DEC niet op stof/product-niveau kan toetsen, aangezien stof/product-informatie op voorhand niet beschikbaar is. Niettemin is de aanvraag toetsbaar, op basis van de samenhang van de diverse studies en het feit dat de studies richtlijn gedreven zijn.

*Niet gewijzigd ten opzichte van oorspronkelijk advies.*

Signaleer of er mogelijk tegenstrijdige wetgeving is die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan. Het gaat hier om wetgeving die gericht is op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort (bijvoorbeeld Wet dieren en Flora- en faunawet). Voor zover bij de DEC bekend is er geen tegenstrijdige wetgeving. *Niet gewijzigd ten opzichte van oorspronkelijk advies.*

2. Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Nevendoelstellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel.

De project aanvraag geeft helder aan dat het aanvraag betreft voor "wettelijk vereist onderzoek" en daarnaast voor "onderzoek ter bescherming van het milieu ter bescherming van de gezondheid van mens of dier". In het projectvoorstel is helder beschreven welke typen dierproeven met welke doelen worden aangevraagd. *Niet gewijzigd ten opzichte van oorspronkelijk advies.*

*Belangen en waarden*

3. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen. Beoordeel of het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C4; zie bijlage I voor voorbeeld*).

Het directe doel is het verzamelen van gegevens over de schadelijke werking van stoffen/producten. Verschillende aspecten van die schadelijke werking worden onderzocht in verschillende (typen) dierproeven die zijn beschreven in 4 appendices. Voor elke stof of product wordt vastgesteld welke gegevens exact nodig zijn (en dus welke dierproeven moeten worden uitgevoerd). Welke dat zijn, wordt bepaald door overheden en is vastgelegd in wettelijke kaders. Deze gegevens zijn nodig voor de (registratie) dossiers en zijn cruciaal voor de

inschatting van de risico's voor mens, dier en milieu (uiteindelijk doel). De wettelijke kaders in diverse landen geven aan welke aspecten beoordeeld moeten worden om de veiligheid van stoffen en producten vast te kunnen stellen. De relatie tussen het directe doel en het uiteindelijke doel voor alle dierstudies in dit project beschreven is dus vastgelegd in wet- en regelgeving. *Niet gewijzigd ten opzichte van oorspronkelijk advies.*

4. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 2.B en tabel 1; zie bijlage I voor voorbeeld*)

Belanghebbenden	Morele waarden
Maatschappij	Nieuwe stoffen en producten die op de markt komen moeten veilig zijn voor mens, dier en milieu. Nieuwe stoffen en producten zijn van belang voor bijvoorbeeld de gezondheid en/of voeding van mens en dier. Hierdoor kan de kwaliteit van leven verbeterd worden.
Proefdieren	Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal worden aangetast, de dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en pijn ondergaan.
Overheden	Verantwoordelijk voor de veiligheid van burgers Eist resultaten van dierproeven voor risico inschatting.
Industrie	Commerciële belangen. Belang om veilige producten op de markt te brengen.
Vergunninghouder (onderzoekers)	Commerciële belangen. Belang om kwalitatief goede dierproeven uit te voeren (borging onderzoekskwaliteit) in relatie tot dierenwelzijn.

*Niet gewijzigd ten opzichte van oorspronkelijk advies.*

5. Geef aan of er sprake kan zijn van substantiële milieueffecten. Zo ja, benoem deze, leg uit waarom daar sprake van kan zijn en geef aan of deze effecten afgedekt worden door specifieke wet- en regelgeving op het gebied van het omgaan met voor het milieu risicovolle stoffen of organismen.

De DEC gaat ervan uit dat de vergunninghouder voldoet aan alle voor de uitvoering van dit project relevante wettelijke milieu eisen. *Niet gewijzigd ten opzichte van oorspronkelijk advies.*

**Proefopzet en haalbaarheid**

6. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw beoordeling toe. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C5*).

De studies worden uitgevoerd volgens internationaal voorgeschreven test richtlijnen. De aanvrager heeft langdurende ervaring met richtlijn gedreven onderzoek. De DEC is ervan overtuigd dat voldoende ervaring en deskundigheid in het bedrijf aanwezig is om dit onderzoek uit te voeren. Ook is de DEC overtuigd van voldoende kennis en deskundigheid om 3V-beginselen te waarborgen mede gezien de vermelde activiteiten van de vergunninghouder in het 3V-centrum en het Europese Lab Animal Science netwerk. *Niet gewijzigd ten opzichte van oorspronkelijk advies.*

7. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw beoordeling toe. *Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C6).*

- Bij elk verzoek vanuit de industrie voor een dierproef wordt eerst specifieke informatie verzameld over de betreffende stof of product aan de hand van de 15 punten vragen lijst (zie project aanvraag paragraaf 3.4.2). Op grond van de verkregen informatie wordt vastgesteld of aanvraag richtlijn gedreven onderzoek betreft en welke dierproeven (beschreven in 1 of meer appendices) hiervoor noodzakelijk zijn. De DEC is ervan overtuigd, dat deze strategie en de afstemming van het studieplan met de IvD goede waarborgen geeft voor een optimale uitvoering van dierproeven voor het verkrijgen van de gegevens die door de registratieautoriteiten worden gevraagd en waarbij 3V aspecten optimaal worden geborgd (zie ook de beantwoording van vraag 3 in de bijlage).
- De uitkomstparameters van de dierproeven zijn helder en logisch beschreven in (inter)nationale uitvoeringsrichtlijnen en worden door de autoriteiten benoemd.
- Omdat richtlijngedreven dierproeven (in het algemeen) robuust zijn en de betrokken medewerkers deskundig en de infrastructuur adequaat, beoordeelt de DEC de uitvoerbaarheid van het project als zeer goed.

*Niet gewijzigd ten opzichte van oorspronkelijk advies.*

#### *Welzijn dieren*

8. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. Beoordeel of de keuze hiervoor voldoende wetenschappelijk is onderbouwd en of de aanvrager voldoet aan de in de Wet op de Dierproeven (Wod). voor de desbetreffende categorie genoemde beperkende voorwaarden. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C1; zie bijlage I voor toelichting en voorbeelden).*

- Bedreigde diersoort(en) (10e, lid 4)
- Niet-menselijke primaten (10e)
- Dieren in/uit het wild (10f)
- Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn), zie E1.
- Zwerfdieren (10h)
- Hergebruik (1e, lid 2): Bij sommige dieren kan na een wachtperiode sprake zijn van hergebruik, mits het ongerief beperkt is gebleven tot maximaal matig.
- Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
- Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
- Dodingsmethode niet volgens bijlage IV richtlijn (13c, lid 3)

*Niet gewijzigd ten opzichte van oorspronkelijk advies.*

9. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan, omdat het, om redenen van dierenwelzijn of diergezondheid of om wetenschappelijke redenen, noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. De dieren worden gehuisvest conform bijlage III van Richtlijn 2010/63/EU. In specifieke gevallen kan hiervan worden afgeweken om wetenschappelijke en/of dierenwelzijnsredenen. Deze worden in de aanvraag goed onderbouwd (tijdelijk

verblijf in metabolisme kooien, of individuele huisvesting om vechtgedrag te voorkomen, of om beschadiging van instrumentatie of beïnvloeding van dermale blootstelling te voorkomen. *Niet gewijzigd ten opzichte van oorspronkelijk advies.*

10. Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*).

Het ongerief is door de onderzoekers per appendix ingeschat, op basis waarvan een algemene inschatting voor de gehele project aanvraag is gemaakt. Het ongerief dat veroorzaakt wordt door de uitvoering van de dierproeven (procedures) is goed te voorspellen en zal zelden de classificatie matig overschrijden. Ongerief veroorzaakt door toxiciteit van de stof is niet altijd goed te voorspellen. De DEC is van oordeel dat de procedures zo worden ingericht en humane eindpunten zodanig worden toegepast dat ernstig ongerief door de stof/product tot een minimum wordt beperkt. De DEC is van oordeel dat het ongerief realistisch is ingeschat op basis van ervaring en historische data. De DEC kan zich vinden in de weergegeven cumulatieve inschattingen van ongerief zoals weergegeven in de NTS en appendices van de project aanvraag. *Niet gewijzigd ten opzichte van oorspronkelijk advies.*

11. Het uitvoeren van dierproeven zal naast het ongerief vaak gepaard gaan met aantasting van de integriteit van het dier. Beschrijf op welke wijze er sprake is van aantasting van integriteit. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*). (*zie bijlage I voor voorbeeld*).

De integriteit van de dieren kan fysiek worden aangetast, door bijvoorbeeld toedieningswijze van een stof, door onthouding van voedsel of door een operatieve ingreep. Maar ook kan de gedragsmatige integriteit worden aangetast bijvoorbeeld door beperking van natuurlijk gedrag, of bewegingsvrijheid of individuele huisvesting. Daarnaast kunnen stoffen/producten of procedures stress en pijn veroorzaken. *Niet gewijzigd ten opzichte van oorspronkelijk advies.*

12. Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

De DEC beoordeelt de criteria zoals gegeven voor humane eindpunten in de project aanvraag en appendices als adequaat, aangezien de dieren die pijn, stress of ongemak van 'niet tijdelijke aard' vertonen met kans op verergering, zullen worden geëuthanaseerd om langer of erger lijden te voorkomen. Hierin wordt gehandeld conform de Europese richtlijn als omschreven in het OECD Guidance document on humane end points (ENV/JM/MOMO/2000/7). *Niet gewijzigd ten opzichte van oorspronkelijk advies.*

3V's

13. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

In deze projectaanvraag wordt wettelijk vereist proefdieronderzoek beschreven, waarvoor (inter)nationale regelgevende instanties bepalen welke dierstudies benodigd zijn of waar alternatieven mogelijk zijn. Op basis van vraag 10 in paragraaf 3.4.2 van de project aanvraag, wordt door de studieleider onderzocht of er alternatieven beschikbaar zijn die worden geaccepteerd door de betreffende autoriteit(en). De resultaten hiervan worden vastgelegd. De DEC heeft voor de wijziging een vraag gesteld (vraag 2) over alternatieven voor de pyrogeniciteitstest. Echter, uit het antwoord blijkt dat de aanvrager deze test niet uitvoert.



14. Beoordeel of het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en of er een heldere strategie is om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

Het 'minimale' aantal dieren dat in de studies gebruikt moet worden, is voorgeschreven in de test richtlijnen. In deze projectaanvraag wordt dit minimale aantal geïnterpreteerd als maximale aantal mits er wetenschappelijke redenen zijn om daarvan af te wijken. Afwijkingen (meer of minder) worden mede bepaald door de informatie uit eerder onderzoek en beschikbare informatie over de betreffende stof of product. Deze gegevens worden door de studieleider verzameld (zie bovenstaande vraag 8) en verwerkt in een studieplan. Het studieplan wordt zo opgesteld dat betrouwbare informatie wordt verkregen met minimale aantallen dieren. De DEC is van mening dat de benodigde aantallen proefdieren per studie goed worden onderbouwd in de appendices. Echter de totale aantallen dieren die in het kader van dit project worden aangevraagd worden voornamelijk bepaald door schattingen van de aantallen studies die in de komende 5 jaar worden verwacht. De aanvragers baseren deze verwachting vooral op navolgbare argumenten zoals historische data en marktontwikkelingen.

De wijziging betreft o.a. het aanpassen van de aantallen dieren per diersoort. Het aantal gaat van 265.850 naar 388.150 dieren, een stijging van 122.300 dieren. In de begeleidende brief geeft de aanvrager aan dat de reden hiervan is dat de vraag naar bepaalde studies met bepaalde dieren is toegenomen door onvoorziene omstandigheden.

De [02g] heeft een vraag gesteld over de onderbouwing van de extra aantallen, met name van de konijnen (vraag 1). Het antwoord daarop was grondig en verhelderend.

15. Beoordeel of het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project zodanig is opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

De mogelijkheden voor verfijning zijn beperkt vanwege voorgeschreven uitvoeringsrichtlijnen. Daar waar verfijning mogelijk is zonder de waarde van de bevindingen voor de betreffende autoriteiten aan te tasten zal hierop worden gestuurd tijdens het opstellen van het studieplan.

De DEC is van mening dat de studies zoals opgenomen binnen de projectaanvraag voldoen aan de vereisten voor verfijning van dierproeven, onder andere door de toepassing van de criteria voor humane eindpunten, de training van biotechnici en de frequentie van monitoring. *Niet gewijzigd ten opzichte van oorspronkelijk advies.*

16. Beoordeel, indien het wettelijk vereist onderzoek betreft, of voldoende aannemelijk is gemaakt dat er geen duplicatie plaats zal vinden en of de aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om tijdens de uitvoering van het project te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt. Licht uw beoordeling toe.

Binnen de diverse wettelijke kaders zijn wetsartikelen opgesteld om het dupliceren van onderzoek te voorkomen, zoals bijvoorbeeld voor industriële chemicaliën (artikel 25 van Verordening 1907/2006), biociden (artikel 62 van Verordening 528/2012) en gewasbeschermingsmiddelen (artikel 8, 33, 61 en 62 van Verordening 1107/2009). Daarnaast zullen voor nieuwe stoffen of producten (bijvoorbeeld geneesmiddelen) geen gelijke studies beschikbaar kunnen zijn. Voorafgaande aan de ontwikkeling van een studieplan zal de studieleider zich hiervan vergewissen (zie punt 9 genoemd onder paragraaf 3.4.2. van de projectaanvraag). De DEC is van mening dat studieleiders hiertoe zijn gekwalificeerd. *Niet gewijzigd ten opzichte van oorspronkelijk advies.*

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

17. Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3; zie bijlage I voor voorbeeld*).

Het geslacht van de dieren wordt over het algemeen voorgeschreven in de test richtlijnen. Sommige richtlijnen schrijven gebruik van beide geslachten voor, andere richtlijnen laten de geslachtskeuze open, soms zijn er wetenschappelijke redenen voor gebruik van mannelijke of slechts vrouwelijke dieren. Soms kan de keuze voor één geslacht worden gebaseerd op resultaten van eerder onderzoek (uit een of meerdere studies uit een van de appendices of reeds beschikbare gegevens). De informatie verzameld in de vragenlijst uit de project aanvraag zal mede bepalen of het onderzoek met beide geslachten of met het meest gevoelige geslacht voor de betreffende stof of eindpunt wordt uitgevoerd. De DEC is van mening dat dit afdoende is beschreven in de project aanvraag en appendices. *Niet gewijzigd ten opzichte van oorspronkelijk advies.*

18. Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef). Indien dieren gedood worden, geef aan of en waarom dit noodzakelijk is voor het behalen van de doelstellingen van het project. Indien dieren gedood worden, geef aan of er een voor de diersoort passende dodingsmethode gebruikt wordt die vermeldt staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Zo niet, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. Indien van toepassing, geeft ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

In verreweg de meeste studies worden de dieren in het kader van de proef gedood voor de bepaling van uitkomstparameters in bloed, organen en weefsels (bijvoorbeeld teststof concentraties, (histo)pathologie of biomarkers). De DEC is van oordeel dat dit voldoende wordt onderbouwd in de appendices. De dieren worden gedood conform de methoden vermeld in bijlage IV van Richtlijn 2010/63/EU. *Niet gewijzigd ten opzichte van oorspronkelijk advies.*

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

Wanneer honden, katten of varkens niet worden gedood in het kader van de studie, zoals hierboven beschreven, kan hergebruik of herplaatsing worden overwogen. Bij pharmaco/toxicokinetisch onderzoek (beschreven in appendix 3) kunnen dieren na een wachtperiode worden hergebruikt indien het voorafgaande ongerief beperkt is gebleven tot maximaal matig. Bij een zeer gering percentage dieren (bijvoorbeeld katten) kan adoptie tot de mogelijkheden behoren. *Niet gewijzigd ten opzichte van oorspronkelijk advies.*

NTS

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

De DEC is van mening dat de NTS een goede weergave is van de projectaanvraag. De NTS is met de wijzigingsaanvraag conform aangepast.

## **D. Ethische afweging**

1. Benoem de centrale morele vraag (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.A*).

De centrale morele vraag is of de nadelige gevolgen voor de meer dan 260.000 dieren uit de projectaanvraag met ongerief scores van mild tot ernstig opweegt tegen de informatie die wordt verkregen uit de dierstudies die nodig zijn om een veiligheidsbeoordeling voor mens, dier en/of milieu uit te voeren voor stoffen en producten die op de markt worden gebracht. Met de wijziging moet deze vraag gesteld worden voor 388.150 dieren.

2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn, ten opzichte van elkaar af. Om dit proces te vergemakkelijken, kunt u de belangrijkste belanghebbenden en de belangrijkste waarden die in het geding zijn waarderen. U kunt dit verwoorden in termen van gering, matig of veel/ernstig voordeel of nadeel. Geef aan waarom de DEC bevordering van waarden (baten) voor de ene belanghebbende prevaleert boven de aantasting van waarden (kosten) voor de andere belanghebbende (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.B; zie bijlage I voor voorbeelden*).

Voor de samenleving is het van groot belang dat de stoffen en producten die op de markt komen veilig zijn voor mens, dier en milieu. Veiligheidseisen gelden niet alleen voor de toepassing van de stof of product, maar ook voor productie, vervoer en opslag. Veiligheidseisen zijn vastgelegd in (inter)nationale wet- en regelgeving en voor dat doel wordt er door autoriteiten onder meer om gegevens gevraagd die alleen uit proefdieronderzoek kunnen worden verkregen. Voor overheden is het van groot belang om de juiste informatie te verkrijgen op basis waarvan veiligheidsrisico's kunnen worden ingeschat.

Hier tegenover staat dat het doen van dierproeven maatschappelijk als problematisch wordt beschouwd en de voorkeur gegeven zou worden aan niet-dierproef afhankelijke technieken. Voor de in deze aanvraag beschreven dierproeven zijn nog geen - door alle autoriteiten (wereldwijd) geaccepteerde - alternatieven beschikbaar.

Voor de proefdieren worden geen belangen gediend maar wel geschaad (ongerief, aantasting welzijn en integriteit).

De industrie die de stoffen/producten op de markt brengt heeft een commercieel belang, maar heeft evenzeer belangen met betrekking tot de veiligheid van die stoffen/producten. Gezien de tijd en kosten die gepaard gaan met de uitvoering van dierproeven zal de industrie deze studies zoveel mogelijk willen beperken het geen het risico op niet-noodzakelijke dierproeven verder minimaliseert.

Voor de vergunninghouder is er financieel belang, immers een XXXX die zich richt op wettelijk verplicht onderzoek dankt hieraan haar bestaansrecht. Echter, de vergunninghouder is ook betrokken bij de ontwikkeling en uitvoering van diverse *in vitro* of *in silico* alternatieven voor dierproeven en zal daar waar beschikbaar en mogelijk deze alternatieven ook aanbieden of resultaten hieruit aanwenden voor verfijning van richtlijn gedreven studies. Tevens is er een belang voor de vergunninghouder om kwalitatief goede dierproeven uit te voeren in relatie tot dierenwelzijn en maatschappelijk draagvlak. *Niet gewijzigd ten opzichte van oorspronkelijk advies.*

3. Beantwoord de centrale morele vraag. Maak voor het beantwoorden van deze vraag gebruik van bovenstaande afweging van morele waarden. Maak daarnaast gebruik van de volgende moreel relevante feiten: belang onderzoek (C4), kennis en kunde van betrokkenen (C7), haalbaarheid doelstellingen (C8), categorieën en herkomst dieren (C9), 3V's (C14-C18), ongerief (C10-13 en C19) en relevante wet en regelgeving (C2). Onderbouw hoe al deze elementen zijn meegewogen bij de beantwoording van de centrale morele vraag, zodanig dat het navolgbaar is zonder gedetailleerde kennis te hebben van het projectvoorstel (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.C; zie bijlage I voor voorbeeld*).

Overheden stellen methodieken voor veiligheidsbeoordeling vast en verplichten

producenten hiervoor relevante gegevens aan te leveren. Die gegevens komen uit allerlei domeinen inclusief fysisch-chemische eigenschappen, milieu/residu veldstudies, informatica, en biologie. Van dat laatste betreft een klein deel, onderzoek aan levende dieren die onder de Wod vallen. Deze proefdierstudies worden volgens internationale test richtlijnen uitgevoerd, welke door overheden zijn voorgeschreven. De resultaten van de proefdier studies zijn voorspellend voor de mogelijke schadelijke werking van de stof/product voor mens, dier en milieu.

Het project is in de ogen van de DEC dan ook van groot maatschappelijk belang. De vergunninghouder is gespecialiseerd in het uitvoeren van richtlijngedreven onderzoek voor derden en is in staat om kwalitatief goede dierproeven uit te voeren met aandacht voor dierwelzijn. Het grote aantal dieren wordt behalve door de aard van de dierproeven vooral bepaald door de verwachte werkportefeuille. Welke dierproeven moeten worden uitgevoerd alsook op welke wijze waarop dit dient te gebeuren wordt in belangrijke mate door overheden bepaald. Meewegende dat het onderzoek door overheden wordt voorgeschreven, de aanvrager optimaal invulling geeft aan 3 V's, beschikt over voldoende gekwalificeerd personeel en adequate infrastructuur, een uitstekende record heeft met de uitvoering van dergelijk onderzoek en de haalbaarheid als zeer hoog wordt ingeschat is de DEC van mening dat het beschreven ongerief van de dieren opweegt tegen het belang van het in dit project beschreven dierproeven.

Op basis van bovenstaand kan de DEC **10.2 g** concluderen dat het gebruik van de dieren binnen dit project gerechtvaardigd is.

Hoewel er onzekerheid is over de precieze oorzaak van de toegenomen vraag naar de betreffende studies, is deze toename blijkbaar een feit. De **10.2 g** heeft gezien de aanzienlijke toename opnieuw een afweging gemaakt en concludeert dat ook met het toegenomen aantal dieren, hoewel dit aanzienlijk is, het belang van het doen van de dierproeven gerechtvaardigd is.

## E. Advies

### 1. Advies aan de CCD

- De DEC adviseert de vergunning te verlenen.
- De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
  - Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.
  - Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist
  - Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten: nadere onderbouwing van de herkomst en gebruik van **10.2 g** die **10.2 g**. De argumentatie zoals eerder gedeeld met de CCD de visie hierop weergegeven in brief d.d. 25 april 2016 van de CCD aan de VGH geeft afdoende informatie voor de DEC om op voorhand een positief advies te kunnen geven.

*Niet gewijzigd ten opzichte van oorspronkelijk advies:*

- De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
  - De vaststelling dat het project niet vergunning plichtig is om de volgende redenen: ,
  - De volgende doorslaggevende ethische bezwaren: ,
  - De volgende tekortkomingen in de aanvraag: ,

### 2. Het uitgebrachte advies kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn

op een meerderheidsstandpunt in de DEC. Indien gebaseerd op een meerderheidsstandpunt, specificeer het minderheidsstandpunt op het niveau van verschillende belanghebbenden en de waarden die in het geding zijn (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.A; zie bijlage I voor voorbeeld*).

Het uitgebrachte advies is unaniem tot stand gekomen. 1 DEC lid was niet aanwezig tijdens de vergadering op 31 juli 2017, maar heeft schriftelijk aangegeven positief te adviseren over deze project aanvraag. Ook het advies over de wijziging is unaniem tot stand gekomen, nu in de [REDACTED]

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

De volgende dilemma's zijn gesignaleerd bij wettelijk vereist onderzoek zoals beschreven in deze aanvraag:

Voor sommige proefdierstudies zijn *in vitro* alternatieven beschikbaar. Echter, deze worden nog niet door alle autoriteiten (wereldwijd) geaccepteerd. Daar waar autoriteiten deze alternatieven niet accepteren zullen nog steeds dierproeven vereist zijn voor de registratie of toelating van stoffen/producten.

Wereldwijd worden steeds nieuwe stoffen op de markt gebracht waaraan de samenleving hoge eisen worden gesteld met betrekking tot de veiligheid daarvan. De [REDACTED] kan niet waarden wat het belang is van elk van deze nieuwe stoffen/producten aangezien de diversiteit in stoffen/producten en gebruikers (maatschappij, dieren, patiënten, beroepsmatig, etc.) groot is en omdat informatie over specifieke stoffen en producten in een [REDACTED]-parapluaanvraag niet bekend zijn. Wel erkent de DEC op voorhand het grote belang van veiligheidseisen van alle in de productaanvraag genoemde categorieën van stoffen en producten. *Niet gewijzigd ten opzichte van oorspronkelijk advies.*

Bijlage: vragen van 10.2 g aan VGH

Vragen gesteld in zwart op 16 juni 2017  
Antwoorden in blauw door VGH op 21 juli 2017

Projectvergunnings aanvraag

1. Paragraaf 3.4 General strategy ..... In de eerste alinea wordt aangegeven dat de vijftien items zoals aangegeven in 3.4.2 vooraf moeten worden beoordeeld om de wettelijke noodzakelijkheid van de studie te beoordelen. In de tweede alinea wordt aangegeven dat alle informatie over de teststof karakteristieken en beschikbare achtergrond worden meegenomen om tot een ontwerp van een studie plan te komen. De DEC ziet graag uitleg wat er met "all known test substance characteristics" en "available background information" wordt bedoeld, en hoe dit in relatie staat tot the 15 items van paragraaf 3.4.2?

De tekst in de aanvraag is hier als volgt op aangescherpt: *"All known test substance characteristics (shared by the sponsor) and available background information (from sponsor and public available literature) will be taken into account in the design of the study."* Deze informatie verkregen worden op verschillende manieren, onder meer in de eerste fase waarin de 15-items checklist wordt gebruikt in het contact met de klant. Zie verder ook punt 3.

2. Paragraaf 3.4 Research strategy: Er wordt melding gemaakt van "studies in farm animals". Echter, de DEC is van mening dat er bij 10.2 g geen studies met landbouwhuisdieren uitgevoerd, en deze zijn ook niet opgenomen in de lijst met proefdieren in deze paragraaf. De DEC vraagt u hierover een toelichting te geven.

Dit is een terechte constatering, de verwijzing naar landbouwhuisdieren is verwijderd uit de aanvraag.

3. Paragraaf 3.4.2: Hoe gaat de '15 points questionnaire' gebruikt worden en hoe wordt dat geborgd? Hoe worden vooral de 3V aspecten optimaal betrokken in het studieplan en wie ziet daarop toe? De DEC vraagt op dit punt een overtuigende beschrijving van technisch uitvoerbare stappen. Deze vraag wordt onvoldoende beantwoord in de huidige aanvraag. Er wordt het volgende aangegeven in section 3.4.2: prior to the start of the in vivo study the following 15 items will be evaluated:" Het is onduidelijk bij wie deze verantwoordelijkheid ligt, wie toeziet op juistheid en volledigheid van de verstrekte informatie en op welke wijze dit deze informatie wordt meegenomen bij het opzetten van het studie plan. Kan de VGH hier iets over aangegeven? Bij onvoldoende duidelijkheid zal de DEC dit in haar advies naar voren laten komen.

Op hoofdlijn ziet dit proces, dat zo veel mogelijke op digitale wijze wordt vormgegeven, er als volgt uit: 10.2 g

De Vergunninghouder faciliteert het geschetste proces. Reeds in 10.2 g

of dit binnen de kaders van de door de CCD goedgekeurde projectvergunningsaanvraag (PVA) past.

4. Paragraaf 3.4.2: Kan de VGH aangegeven wat de samenhang is tussen de appendices? Duidelijk is dat de vier Appendices verschillende typen dierproeven beschrijven, waarvan de resultaten terecht kunnen komen in het veiligheidsdossier van de stof (gemeenschappelijk einddoel). Echter, binnen het veiligheidsdossier zullen de studies ook een samenhang hebben. Sommige studies zullen "tick-box" studies zijn, studies die altijd nodig zijn, andere studies volgen weer uit eerder onderzoek (higher-tier studies). De VGH wordt gevraagd om de onderlinge samenhang en/of afhankelijkheid te beschrijven. Het klopt dat de 4 Appendices verschillende type dierproeven beschrijven. Deze indeling is gemaakt

analoog aan een relatief gangbare indeling in type toxicologisch onderzoek en aan de afdelingen welke binnen ■ ook volgens deze systematiek zijn ingericht. De samenhang is dat elke Appendix onderzoek naar de veiligheid van een product beschrijft echter elk op een speciaal aspect daarvan. Vaak wordt het totale registratie dossier van een product samengesteld met studies uit de verschillende Appendix. Bijvoorbeeld de uitvoer van een farmacokinetiek studie in ratten (Appendix 3) gevolgd door een 'herhaald doseer-studie' in dezelfde diersoort (Appendix 1). Waarna, afhankelijk van de uitkomst, een reproductie toxicologische studie in ratten (Appendix 2) en een ecotoxicologische studie (Appendix 4) kunnen volgen.

5. **Paragraaf 3.4.3. Er wordt het volgende aangegeven: "For most studies a pre-study briefing is performed". Kan de VGH nader specificeren wat er met "most studies" wordt bedoeld, b.v. geldt dit specifiek voor een bepaald type studies?**  
Onze excuses voor de onduidelijkheid. De tekst is aangepast naar: "for the more complex studies (often pharma related), a pre-study briefing is performed". Voor de kleinere/meer standaard type studies, wordt in ieder geval het (draft)protocol tijdig gedeeld met betrokkenen om kennis te laten nemen van relevante studie-informatie.
6. **Verwijzend naar Wob art 10.1.3. lezen wij de tekst zo dat de IvD toetst of het studieplan past binnende vergunning. Graag vernemen wij of dit in overeenstemming is met uw bedoeling.**  
Aannemend dat er een typo staat bij 'Wob' en dat dit 'Wod' moet zijn, kunnen wij bevestigen dat de IvD elk studieplan toetst of dit past in de vergunning. Zie ook de beantwoording van bovenstaande punt 3.

#### Appendix 1

7. **Hoofdstuk A/B, table 1/2: er wordt geen expliciete vermelding gemaakt van de test richtlijnen, zoals dat in de andere appendices wel is gedaan. Kan de VGH aangeven welke test richtlijnen in deze appendix zijn meenomen?**  
Gezien het grote aantal testrichtlijnen dat van toepassing is op studies met proefdieren in de 'General Toxicology', is gekozen om deze –met het gevaar niet compleet te zijn- om op dit gebied de hoofdkaders aan te geven (o.a. ICH, OECD; zie ook Project Proposal pagina 2). Daar waar de scope van het proefdieronderzoek een kleiner/meer specifiek kader kent (Developmental and Reproductive Toxicology, ADME en Ecotoxicology) zijn de testrichtlijnen nader gespecificeerd.
8. **We begrijpen dat in tabel I met 'primary outcomeparameters' wordt bedoeld: 'purpose of the study' Is dat een correcte aanname?**  
Dit is inderdaad een correcte aanname. Voor de duidelijkheid is dit in de tabel aangepast.
9. **De DEC vraagt zich af of dierproeven ten behoeve van de uitvoering van wettelijk vereiste in vitro/ex vivo studies (b.v. verkrijging cytosol of S9 fractie tbv in vitro endocrine disruptor studies en in vitro genotoxiciteitsstudies of isolatie van cellen voor in vitro interspecies metabolisme studies) aan appendix I toegevoegd moeten worden.**  
Dank voor deze constatering. Inderdaad is voor wettelijk vereiste *in vitro ex-vivo* studies biologisch materiaal nodig, te verkrijgen uit dierproeven. Dit is toegevoegd aan de tabel.

#### Appendix 2:

10. **Page 9 F Accomodation and care: In Appendix 1 en 3 staat dat de konijnen apart worden gehuisvest en dat dit afwijkt van de Directive 2010/63/EU. In Appendix 2 staat hier dat er geen afwijkingen van de Directive zijn, terwijl er verderop in het document (onder I) staat dat de konijnen alleen worden gehuisvest. We vragen de VGH hierop een toelichting te geven en waar nodig de teksten in de verschillende Appendix op dit punt gelijk te trekken en aangeven in Appendix 2 onder punt F dat konijnen alleen worden gehuisvest.**

Dit is correct opgemerkt door de Commissie en in alle Appendixen gelijk getrokken door te benoemen dat de konijnen, en in bepaalde gevallen ook andere dieren, solitair gehuisvest zijn.

**Appendix 3:**

**11. De verwijzing naar SOPs maakt de 'policy for reuse' niet inzichtelijk.**

In de Appendix is toegevoegd: "In these SOP's, e.g. minimal wash-out period; maximal times for re-use, maximal overall number of blood samples has been described in close collaboration with the veterinarian and the AWB."

**12. Hergebruik van Honden en minivarkens na als ernstig-geclassificeerde procedures staat op gespannen voet met wetgeving en vraagt om zorgvuldige onderbouwing.**

De Commissie heeft gelijk dat hergebruik na als ernstig geclassificeerd gebruik zorgvuldig moet worden onderbouwd (Appendix 3, pagina's 4 en 6: Animals that had severe discomfort in retrospect will not be re-used).

Mogelijk verwarrende tekst over hergebruik van dieren na ernstig ongerief (onder C. Re-use, Yes Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.) is verwijderd.

**13. Hoofdstuk A, regel 9: Kan de VGH aangeven of dit enkel risk assessments voor de mens betreft of mogelijk ook voor mens en dier (b.v. in geval van veterinaire pharma)?**

Inderdaad, er vinden ook risk assessments plaats voor dieren. Dit is toegevoegd in regel 9 en 17.

**14. Hoofdstuk K: kan de VGH uitleggen wat in tabel 2, 2de kolom met % non-recovery <5% voor D(PK) studies voor bedoeld wordt?**

Hiermee wordt bedoeld het percentage dieren waarbij, tegen verwachting, geen herstel meer mogelijk is.

Notitie d.d 2-8-2017: De DEC heeft nog nadere correspondentie gevoerd met de VGH over dit punt. Non-recovery is een term die verschillend uitgelegd kan worden in de toxicologie en in het de dierproef registratie. In de toxicologie betreft het herstel van toxische effecten na de laatste dosering van de teststof. Echter, in de dierproefregistratie (op basis de richtlijn en uitvoeringsbesluit) is het een classificatie voor ongerief. De dierproef wordt uitgevoerd onder anesthesie en aansluitend gevolgd door euthanasie: het dier komt niet meer bij en zal dus geen ongerief als gevolg van deze dierproef ervaren. De VGH is gevraagd nog te kijken naar de tekst in appendix 3 hierover en waar nodig aan te passen.

**Appendix 4:**

**NTS:**

**15. Titel: De DEC signaleert dat er een verschil bestaat tussen de titels van de PVA en de NTS. Wettelijke vereiste studies lijkt wat strikter dan "in vivo studies to enable and support regulatory testing programs. Ook het milieu ontbreekt in de NTS titel.**

Om dit beter op elkaar te laten aansluiten is de titel als volgt aangepast: "Proefdieronderzoek ter bepaling van de veiligheid van (dier)geneesmiddelen, (agro)chemicaliën, biociden, medische hulpmiddelen, en voedingsingrediënten, voor mens, dier en milieu."

**16. Projectbeschrijving: De rol van ECHA wordt onjuist weergegeven. ECHA geeft geen goedkeuring voor industriële chemicaliën. Voor Agro chemicaliën is ECHA niet de competente autoriteit (EU Commissie).**

Dit is als volgt aangepast: Fabrikanten die de onder punt 1.1 genoemde producten op de markt willen brengen of houden, hebben hiervoor goedkeuring nodig van nationale en/of internationale overheidsinstanties-zoals de EMA (European Medicines Agency) en FDA (Food and Drug Administration: USA) voor geneesmiddelen en de Europese Commissie voor chemische producten

**17. Door dieraantallen per jaar te vermelden legt de aanvrager zichzelf onnodig jaarquota op (paragraaf 3.3)**

Dit is inderdaad niet nodig. Tabel aangepast naar een totaal over een 5-jaars periode.



18. De Negatieve gevolgen (paragraaf 3.4) omvatten eveneens operaties, houderij, bemonstering, voedselbeperking ed.  
De volgende zin is toegevoegd: Daarnaast kunnen negatieve gevolgen worden ondervonden door de (tijdelijke) beperking van voedselinname, een noodzakelijke operatieve ingreep en (tijdelijke) wijze van huisvesting.
19. Punt 3.5: Kan de VGH aangeven hoe tot de inschatting van ongerief in percentages is gekomen? In de NTS is opgenomen:  $\approx 55\%$  mild,  $\approx 45\%$  matig en  $\approx 5\%$  ernstig. Echter, appendix 1 zegt: 40-45% mild; 50-55% moderate;  $<5\%$  severe, appendix 2 zegt: 40-45% mild; 50-55% moderate;  $<5\%$  severe. Appendix 3 zegt: 40-50% mild; 40-50% moderate;  $<1\%$  severe en appendix 4 zegt: 40-65% mild, 35-50% moderate,  $<10\%$  severe. Op basis van 5% ernstig zoals opgegeven in de NTS, en de aantallen proefdieren, kan een aantal van  $> 13000$  dieren met ernstig ongerief worden berekend. Is dat correct en kan iets gedaan worden om dit aantal te verlagen?  
Hierbij is op basis van ervaringsfeiten over de afgelopen jaren een zo goed mogelijke schatting gemaakt, met inachtneming van de type onderzoeken als weergegeven in de verschillende Appendices. Zo kan bijvoorbeeld voor Appendix 4 gekeken worden naar de geschatte (5-jaars) aantallen van klauwpad (2750) en vis (22000). Bij een 'severe-percentage' van 10% levert dat een aantal op van 2475. Aangegeven is echter  $<10\%$ , dus ook 8% kan een reële schatting zijn. Dit levert dan 1980 gevallen op in de 'severe-categorie'. Over alle appendices heen brengt dit een getal wat 14530 (ofwel 2906 per jaar) indien de bovenkant van de severe-range wordt aangehouden. Naar verwachting ligt dit in de praktijk lager, waarbij onze schatting rond de 10000, ofwel 2000 per jaar, ligt. Binnen de wettelijke en 'animal welfare kaders' zal steeds maximaal worden ingezet en gehandeld om dit aantal zo laag mogelijk te laten zijn.
20. Punt 3.6: er wordt melding gemaakt van adoptie. In de PVA of appendices wordt hier geen melding van gemaakt. Kan de VGH aangeven of adoptie inderdaad binnen de PVA wordt meegenomen?  
Er is de afgelopen jaren eenmalig sprake geweest van adoptie. Dit staat nu misschien te expliciet (groot) geformuleerd in de NTS en is aangepast.
21. Paragraaf 4.1: Is het nodig om in de NTS te verwijzen naar FELASA, 3V centrum, etc. Mogelijk kan wat minder tekst opgenomen worden en waarin helder wordt gemaakt dat voor de studies die binnen de PVA vallen er geen geschikte alternatieven zijn die door de autoriteiten goedgekeurd zijn. Waar toegestaan (in specifieke wettelijke kaders) zullen alternatieven worden toegepast.  
Ja, wij achten de verwijzing(en) een relevant gegeven. Het geeft o.i. de uitvoer van het onderzoek (voor leken en niet-leken) een kader, dat door het bedrijf belangrijk en hoog wordt geacht.  
Wellicht verder goed te noemen, dat er voor sommige aspecten van de studies wel alternatieven bestaan maar deze (nog) niet door autoriteiten zijn geaccepteerd.
22. Paragraaf 4.2 en 4.3: er wordt hier veel tekst gebruikt. Mogelijk is dit te ingewikkeld voor een NTS. Verwijzing naar SOPs heeft geen zeggingskracht aangezien ze niet openbaar zijn. Verwijzing naar guidance documenten lijkt te uitgebreid voor een NTS. Graag simpeler en beknopter formuleren.  
Bij lezing door meerdere personen, wordt het grootste gedeelte van de huidige teksten toepasselijk/adequaat geacht. Zie de NTS voor enkele wijzigingen.
23. Door met name veel (overbodige of onjuist geplaatste) komma's niet altijd gemakkelijk te lezen met name in 3.1.  
Leesbaarheid is op enkele punten (komma's) aangepast.

Naast bovenstaande opmerkingen/vragen is door de DEC leden nog een aantal andere opmerkingen/tekst suggesties gegeven. Beantwoording van deze vragen/opmerkingen is niet noodzakelijk voor de ethische toetsing door de DEC, echter, we willen deze vragen/opmerkingen wel delen met de VGH.

#### Projectvergunning aanvraag

1. Pagina 4: Choice of species: suggestie om deze alinea te deleten. De choice of species staat al beschreven in het opsomlijstje op dezelfde pagina. Het is ook niet waar dat de rodent altijd als voorkeursdier staat, zeker niet voor farmaceutische stoffen. Het zinnetje omtrent protocollen die aangepast worden bij andere species lijkt evident en hoeft niet benoemt in het project proposal (mogelijk eerder verwarrend). De volgende zinnen zouden kunnen blijven staan: *In case of the use of genetically modified animals, this requirement should be justified. If multiple rodent/non-rodent species are considered appropriate for the aim of the study, the choice of species will be discussed with the AWB.*

Wij delen deze suggestie en hebben dit in de PVA aangepast.

2. Pagina 7 punt 4.3.4: Suggestie om deze zin aan te passen "Guidelines are the main driver of the steps/milestones in a study or package of studies". Hier zou minstens ook wetgeving genoemd moet worden, i.e. "Laws, regulations and guidelines are the main driver etc...".

Dank, we hebben deze aanbeveling overgenomen.

#### Appendix 1:

3. Hoofdstuk C, Re-use: Kan de VGH aangeven of re-use vaak voorkomt voor de studie welke worden uitgevoerd binnen appendix 1? In welke situaties komt dit voor?

Voor de studies in deze appendix is re-use eerder uitzondering dan regel. Nagenoeg alle studies kennen een –richtlijn gedreven- terminaal eindpunt. Condition- en dose range finding studies zonder terminaal eindpunt in non-rodents, komen in aanmerking voor hergebruik.

4. In Table 2 zijn bij de repeated dose 18-24 months studies health check animals meegenomen. Kan de VGH aangeven waarom deze health check animals binnen deze PVA vallen?

Het gebruik van 'health checks animals' in dergelijke chronisch/carcinogeniteits studies is nodig om mogelijke externe invloeden op de gezondheid van de studiedieren over langere tijd te monitoren. Dit is een internationaal geaccepteerde/gehanteerde aanpak en wordt in de Felasa richtlijn onderstreept.

#### Appendix 2:

5. Pagina 3 *Confinement and restraint*: De tekst over confinement voor 4 of 10 weken is onduidelijk. Heeft dit betrekking op ratten en konijnen en wat is het effect op ongerief? Het punt is dat niet meer helder is over welke diersoorten het hier gaat. Ratten of konijnen worden niet 4 of 10 weken in een metabolisme kooi gezet of wel? Consequentie is dat het ongerief van de dieren die ingezet worden niet goed is in te schatten. Als het om honden zou gaan waar dagelijks mee gespeeld wordt en die elkaar kunnen zien en horen, dan is het beeld duidelijk en kan het ongerief redelijk worden ingeschat. Ditzou wel op te lossen zijn door er iets over toe te voegen, over verschillen tussen species. Graag duidelijk aangeven wanneer de 4 weken geldt en wanneer de 10 weken, voor welke species, en waar de duur op gebaseerd is.

De tekst is op dit punt aangepast, met verduidelijking naar diersoort. NB. Dieren die solitair worden gehuisvest staan wel altijd op andere wijze in contact met elkaar (zien, horen, ruiken) zoals aangegeven onder F: huisvesting.

6. Pagina 4, B The animals – age and sex: Hier worden juvenile studies genoemd, maar die lijken onderdeel van Appendix 1?

Dit is een terechte constatering. Het voorbeeld 'juvenile studies' is uit deze Appendix (2) verwijderd.

7. Pagina 7, Onder de tabel, punt 5: Er staat: *In case in-house mating is used instead of time-mated animals, for some study types additional animals are needed to ensure sufficient number of successfully mated females at study start.* Voor de ethische afweging maakt het niet uit waar die matings

plaatsvinden en daarom kan punt 5 weggelaten worden.

Dit advies is opgevolgd; tekst is weggehaald.

8. **Page 7 C Re-use: Het lijkt de DEC dat ratten en konijnen zelden hergebruikt worden, zeker pups. Kan de VGH hier een toelichting op geven?**

In de praktijk is er wel enige regelmaat sprake van hergebruik bij ratten. Dit betreft specifiek de 8 extra vrouwtjes uit de OECD 421 en 422 studies. In dit type studie worden van 48 dieren gedurende 2 weken vaginale spoelingen gemaakt om de estrus cyclus te bepalen. Op basis van de resultaten worden 40 vrouwen geselecteerd met een regelmatige cyclus. De overige 8 vrouwen kunnen hergebruikt worden voor bijvoorbeeld dose range finding studies.

9. **Page 7 tweede alinea: Hier wordt de reliability check genoemd. Mogelijk horen deze bij de acute studies die vallen onder Appendix 1. Wat is het doel van de reliability check binnen een reproductie? Zou dit niet weggehaald moeten worden?**

Binnen 'Appendix 2' wordt hiermee bedoeld op een checks voor gedragsontwikkelingsstudies om de validiteit van bepaalde metingen/testen te kunnen garanderen (d.i. gedragstesten, histopathologie en morfologie van de hersenen). Dit is een vereiste voor het accepteren van de studies door de autoriteiten. Dit is verduidelijkt in de aanvraag door (nieuw) punt 5 op pagina 7 en deels verwijderd van tekst in laatste alinea.

Van: info@zbo-ccd.nl  
Aan: 10.2.e  
Cc: 10.2.e  
Onderwerp: Aanhouden AVD 10.2.g  
Datum: vrijdag 2 oktober 2020 15:03:37

---

Geachte 10.2.e

Op 05-08-2020 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "In vivo studies to enable and support regulatory testing programs for the safety evaluation of medicinal products, chemicals, plant protection products, biocides, medical devices, feed and foods" met aanvraagnummer AVD 10.2.g. 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:

#### **Onduidelijkheden**

Bij de oorspronkelijke aanvraag heeft u een tabel opgesteld met overzichten welke dieren in welke Bijlage Dierproeven ingezet worden. Deze tabel is ook meegestuurd met uw beschikking. Kunt u deze tabel aanpassen volgens deze wijziging, waarbij aangegeven is wat de wijzigingen zijn?

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 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

[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

.....  
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag  
.....

T: 0900 2800028

E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)

**Van:** 10.2.e  
**Aan:** info@zbo-ccd.nl  
**Onderwerp:** RE: [External]: Aanhouden AVD 10.2.g  
**Datum:** dinsdag 6 oktober 2020 19:07:48

---

Geachte CCD,

Wij hebben het gevraagde document ("Bijlage tabellen dieren aantallen en ongerief - AVD 10.2.g 10.2.g 06-Oct-2020") middels de netFTP optie aan u beschikbaar gesteld.

Graag vernemen wij uw verdere evaluatie.

Met vriendelijke groet,

10.2.e  
 10.2.g  
 10.2.g  
 10.2.e 10.2.g  
 10.2.e 10.2.g  
 10.2.g

Confidentiality Notice: The information contained in this email and any attachments are confidential and may contain privileged and/or proprietary information. This email is intended for the use of the addressee only. If you are not the intended recipient, you are strictly prohibited from copying, distributing or using this email or the information contained in it. If you received this email in error, please notify the sender immediately by email or telephone, and destroy any copies, electronic, paper or otherwise.

**From:** 10.2.e  
**Sent:** Friday, October 2, 2020 3:54 PM  
**To:** info@zbo-ccd.nl  
**Subject:** RE: [External]: Aanhouden AVD 10.2.g

Geachte CCD,

Dank voor uw bericht. Wij zullen de gevraagde informatie maandag (5 oktober) aan u doen toekomen.

Met vriendelijke groet,

10.2.e  
 10.2.g  
 10.2.g  
 10.2.e 10.2.g  
 10.2.e 10.2.g

Confidentiality Notice: The information contained in this email and any attachments are confidential and may contain privileged and/or proprietary information. This email is intended for the use of the addressee only. If you are not the intended recipient, you are strictly prohibited from copying, distributing or using this email or the information contained in it. If you received this email in error, please notify the sender immediately by email or telephone, and destroy any copies, electronic, paper or otherwise.

**From:** [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl) <[info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)>  
**Sent:** Friday, October 2, 2020 3:04 PM  
**To:** 10.2.e  
**Cc:** 10.2.e  
**Subject:** [External]: Aanhouden AVD 10.2.g

Geachte 10.2.e,

Op 05-08-2020 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "In vivo studies to enable and support regulatory testing programs for the safety evaluation of medicinal products, chemicals, plant protection products, biocides, medical devices, feed and foods" met aanvraagnummer AVD 10.2.g. 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:

**Onduidelijkheden**

Bij de oorspronkelijke aanvraag heeft u een tabel opgesteld met overzichten welke dieren in welke Bijlage Dierproeven ingezet worden. Deze tabel is ook meegestuurd met uw beschikking. Kunt u deze tabel aanpassen volgens deze wijziging, waarbij aangegeven is wat de wijzigingen zijn?

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 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

[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

.....  
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag

.....  
T: 0900 2800028  
E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)

Dit bericht kan informatie bevatten die niet voor u is bestemd. Indien u niet de geadresseerde bent of dit bericht abusievelijk aan u is gezonden, wordt u verzocht dat aan de afzender te melden en het bericht te verwijderen.

De Staat aanvaardt geen aansprakelijkheid voor schade, van welke aard ook, die verband houdt met risico's verbonden aan het elektronisch verzenden van berichten.

This message may contain information that is not intended for you. If you are not the addressee or if this message was sent to you by mistake, you are requested to inform the sender and delete the message.

The State accepts no liability for damage of any kind resulting from the risks inherent in the electronic transmission of messages.



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

10.2.g  
10.2.e  
10.2.g

Centrale Commissie  
Dierproeven  
Postbus 93118  
2509 AC Den Haag  
centralecommissiedierproeven.nl  
0900 28 000 28 (10 ct/min)  
info@zbo-ccd.nl

**Onze referentie**

Aanvraagnummer

AVD [redacted]

Bijlagen

3

Datum 12 oktober 2020

Betreft Beslissing Wijziging projectvergunning Dierproeven

Geachte 10.2.e

Op 5 augustus 2020 hebben wij uw aanvraag voor een wijziging op een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "In vivo studies to enable and support regulatory testing programs for the safety evaluation of medicinal products, chemicals, plant protection products, biocides, medical devices, feed and foods" met aanvraagnummer AVD 10.2.g. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

**Beslissing**

Wij keuren uw wijzigingsaanvraag goed. Uit artikel 10a, eerste lid van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) volgt daarom dat het vanaf de datum van deze brief is toegestaan om de aangevraagde projectwijziging uit te voeren binnen de gestelde vergunningsperiode. De vergunning is afgegeven van 1 januari 2018 tot en met 31 december 2022.

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

*Beoordeling achteraf*

Op dit project is een beoordeling achteraf van toepassing. Deze beoordeling zal uiterlijk december 2023 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

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

## Procedure

**Datum:**

12 oktober 2020

**Aanvraagnummer:**

AVD 020

### *Advies dierexperimentencommissie*

Wij hebben advies gevraagd bij de dierexperimentencommissie 020 hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 14 september 2020. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

### *Nadere vragen aanvrager*

Op 2 oktober 2020 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft tijdig antwoord gegeven. Het verzoek om aanvullingen had betrekking op een overzicht van de aantallen dieren per Bijlage Dierproeven. 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.

### *Aanvullende opmerkingen*

Onderzoeken waarvoor een in de EU geaccepteerd dierproefvrij alternatief beschikbaar is, er meer dieren, meer ongerief of op andere wijze uitgebreider getest moeten worden dan de Europese richtlijnen voorschrijven, vallen buiten deze vergunning. Voor experimenten die dit betreft kunt u een wijzigingsverzoek indienen.

### *Beoordeling achteraf*

Na afloop van het project moet er een beoordeling plaatsvinden zoals bedoeld in artikel 10a1, eerste lid, onder d van de wet. Deze beoordeling zal uiterlijk december 2023 plaatsvinden. Meer informatie over de eisen die gesteld worden bij de beoordeling achteraf vindt u in de bijlage 'Weergave wet- en regelgeving'.

## 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.

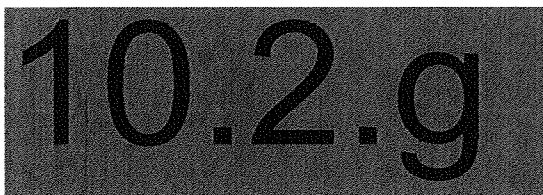
**Datum:**  
12 oktober 2020  
**Aanvraagnummer:**  
AVD [REDACTED]

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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl), stuur een e-mail naar [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl) of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:



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: [REDACTED]

Adres: [REDACTED]

Postcode en plaats: [REDACTED]

Deelnemersnummer: [REDACTED]

deze wijziging in de projectvergunning voor het tijdvak 1 januari 2018 tot en met 31 december 2022, voor het project "In vivo studies to enable and support regulatory testing programs for the safety evaluation of medicinal products, chemicals, plant protection products, biocides, medical devices, feed and foods" met aanvraagnummer AVD [REDACTED], na advies van dierexperimentencommissie [REDACTED]. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Study Director Environmental Sciences.

Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 5 augustus 2020
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 14 september 2020;
  - b Bijlagen dierproeven
    - 3.4.4.1 General Toxicology, zoals ontvangen op 14 september 2020;
    - 3.4.4.2 Developmental and Reproductive Toxicology, zoals ontvangen op 14 september 2020;
    - 3.4.4.3 ADME (Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion) and DMPK (Drug Metabolism Pharmacokinetics), zoals ontvangen op 14 september 2020;
    - 3.4.4.4 Ecotoxicology, zoals ontvangen op 14 september 2020;
  - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 14 september 2020;
  - d Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 14 september 2020
  - e De aanvullingen op uw aanvraag, zoals ontvangen op 6 oktober 2020.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief	Overige opmerkingen
<b>3.4.4.1 General Toxicology</b>				De dieren van bijlagen 3.4.4.1 t/m 3.4.4.3 zijn in de vergunning opgenomen onder bijlage 3.4.4.1. Verdeling van de dieren over de verschillende bijlagen is weergegeven in de tabellen in de bijlage bij deze vergunning.

Aanvraagnummer:

AVD 10.2.g

	Muizen ( <i>Mus musculus</i> )	22.500	5,0% Ernstig 45,0% Matig 50,0% Licht	
	Ratten ( <i>Rattus norvegicus</i> )	<del>190.000</del> / 256.000	5,0% Ernstig 45,0% Matig 50,0% Licht	
	Syrische goudhamsters ( <i>Mesocricetus auratus</i> )	200	1,0% Ernstig 49,0% Matig 50,0% Licht	
	Cavia's ( <i>Cavia porcellus</i> )	1.600	1,0% Ernstig 49,0% Matig 50,0% Licht	
	Konijnen ( <i>Oryctolagus cuniculus</i> )	<del>22.250</del> / 62.500	5,0% Ernstig 50,0% Matig 45,0% Licht	
	Honden ( <i>Canis familiaris</i> )	2.600	5,0% Ernstig 45,0% Matig 50,0% Licht	
	Katten ( <i>Felis catus</i> )	750	1,0% Ernstig 49,0% Matig 50,0% Licht	
	Varkens ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )	1.200	5,0% Ernstig 45,0% Matig 50,0% Licht	
<b>3.4.4.2 Developmental and Reproductive Toxicology</b>				
<b>3.4.4.3 ADME (Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion) and DMPK (Drug Metabolism Pharmacokinetics)</b>				
<b>3.4.4.4 Ecotoxicology</b>				
	Klauwkikkers ( <i>Xenopus laevis</i> en <i>Xenopus tropicalis</i> )	<del>2.750</del> / 10.800	5,0% Ernstig 45,0% Matig 50,0% Licht	

**Aanvraagnummer:**

AVD 1020

	Andere vissen (andere Pisces) / meerdere soorten	22.000 / 30.000	5,0% Ernstig 45,0% Matig 50,0% Licht	
--	-----------------------------------------------------	--------------------	--------------------------------------------	--

**Voorwaarden***Beoordeling achteraf*

Op dit project is een beoordeling achteraf van toepassing. Deze beoordeling zal uiterlijk december 2023 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

**Geldende voorschriften**

Wij wijzen u op onderstaande geldende voorschriften, die volgen uit artikel 1d, vierde lid, artikel 10, tweede 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.
- 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:**

AVD 10.2 g

## 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 1020

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.

**Beoordeling achteraf**

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

Van: info@zbo-ccd.nl  
Aan: 10.2.g  
Onderwerp: Terugkoppeling over projectvergunningaanvraag AVD 10.2.g  
Datum: woensdag 4 november 2020 15:15:26

---

Geachte 10.2.g

Op 05-08-2020 hebben wij een wijziging op een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het gaat om het project 'In vivo studies to enable and support regulatory testing programs for the safety evaluation of medicinal products, chemicals, plant protection products, biocides, medical devices, feed and foods' met aanvraagnummer AVD 10.2.g

De CCD heeft de aanvrager aanvullende vragen gesteld. De aanvullingen hadden betrekking op een overzicht van de aantallen dieren per Bijlage Dierproeven.

De CCD heeft besloten de vergunning toe te wijzen. De aanvrager en verantwoordelijk onderzoeker zijn hierover ingelicht. De beschikking is verstuurd op 12-10-2020.

Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het DEC advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld. Bij de beantwoording van de beoordelvragen verstrekt u een heldere onderbouwing. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen.

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

Met vriendelijke groet,  
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

10.2.e

[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

.....  
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag  
.....

T: 0900 2800028

E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)