



## Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag



### Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 93118  
2509 AC Den Haag  
www.centralecommissiedierproe  
ven.nl

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

**Onze referentie**  
B.2.17.005

**Uw referentie**  
2017/006

**Bijlage(n)**

Datum **31 OKT 2018**  
Betreft Beslissing op bezwaar B.2.17.005 (W16-19S)

Geachte 

Bij brief van 27 januari 2017, ontvangen op 30 januari 2017, heeft u, namens uw cliënte  een bezwaarschrift (met kenmerk 2017/006) ingediend tegen het besluit van de Centrale Commissie Dierproeven (hierna: CCD) van 22 december 2016 met kenmerk W16-19S. Op 7 augustus 2017 ontvingen wij uw aanvullende gronden van bezwaar.

### Verloop van de procedure

- Op 12 juli 2016 ontvingen wij per e-mail het verzoek op basis van de Wet openbaarheid van bestuur (hierna: Wob) van uw cliënte om toezending van documenten die betrekking hebben op een achttal verschillende vergunningen. Voor een opsomming van de vergunningen wordt verwezen naar het betreffende verzoek;
- Bij besluit van 22 december 2016 hebben wij op dit Wob-verzoek beslist;
- Vervolgens ontvingen wij op 30 januari 2017 uw bezwaarschrift, gericht tegen voornoemd besluit;
- De ontvangst van uw bezwaarschrift hebben wij bij brief van 27 februari 2017 bevestigd;
- Op 9 februari 2017 is het Wob-besluit tezamen met de bijbehorende documenten op de website van de CCD geplaatst. Dit hebben wij in een e-mail van 9 februari 2017 aan uw cliënte medegedeeld;
- Middels de brief van 10 maart 2017 hebben wij de termijn om te beslissen op uw bezwaarschrift met zes weken verdaagd;
- Per e-mail van 19 juli 2017 hebben wij aangekondigd dat wij in de onderhavige zaak met u een hoorzitting wilden plannen. Voorts hebben wij u in deze e-mail verzocht om uw gronden van bezwaar (eventueel) aan te vullen, nu de documenten van Wob-besluit W16-19S sinds 9 februari 2017

op de website van de CCD staan gepubliceerd. Wij hebben u voor de eventuele aanvulling van de gronden een termijn tot 28 augustus 2017 verleend. Tevens hebben wij u de geanonimiseerde zienswijzen van derde belanghebbenden toegestuurd;

- Naar aanleiding van de door u aangegeven verhinderdata hebben wij u bij brief van 1 augustus 2017 uitgenodigd voor de hoorzitting;
- Op 7 augustus 2017 ontvingen wij de aanvullende gronden van bezwaar;
- Vervolgens heeft op 21 september 2017 de hoorzitting met u plaatsgevonden. Het verslag van de hoorzitting hebben wij u op 19 oktober 2017 per e-mail toegezonden;
- Een derde belanghebbende had aangegeven gehoord te willen worden in deze zaak. De telefonische hoorzitting heeft op 25 september 2017 plaatsgevonden. Het verslag van de hoorzitting hebben wij u op 19 oktober 2017 per e-mail toegezonden;
- Overige derde belanghebbenden hebben aangegeven niet gehoord te willen worden in deze zaak.

### **Beslissing**

Het bestuur van de CCD verklaart het bezwaar namens uw cliënte gedeeltelijk gegrond en gedeeltelijk ongegrond. Hierna kunt u lezen op grond van welke overwegingen het bestuur van de CCD tot deze beslissing is gekomen.

### **Ten aanzien van de ontvankelijkheid**

Het bezwaar richt zich tegen het besluit van 22 december 2016. Het bezwaarschrift is ingediend binnen zes weken na bekendmaking van het besluit. Het bezwaar is derhalve tijdig ingediend. Voldaan is ook aan de overige door de Algemene wet bestuursrecht (hierna: Awb) gestelde eisen, zodat het bezwaarschrift ontvankelijk is.

### **Derde belanghebbenden**

Aan de derde belanghebbenden is gevraagd om gehoord te willen worden. Eén derde belanghebbende heeft hiervan gebruik gemaakt en het verslag van de hoorzitting hebben wij u reeds toegezonden. Voor het overige zijn de zienswijzen van de derde belanghebbenden uit de primaire fase u vóór de hoorzitting, anoniem, maar verbonden aan het NTS-nummer, verstrekt.

### **Bezwaren**

Hieronder worden uw bezwaargronden toegelicht.

Uw bezwaren zien toe op meerdere punten. Allereerst is aangegeven dat de data van vergaderingen van de CCD niet kunnen worden geweigerd op grond van artikel 11 lid 1 van de Wob (hierna: **bezwaar 1**). Voorts maakt u bezwaar tegen het niet kenbaar maken van de weigerings- of uitzonderingsgronden per specifieke passage (hierna: **bezwaar 2**).

Daarnaast heeft u aangegeven dat weigeringen op grond van artikel 10 lid 2 sub g van de Wob – anders dan namen, locatiegegevens, gegevens die direct herleidbaar zijn tot natuurlijke personen en handtekeningen – niet inzichtelijk zijn gemaakt. De zienswijzen van derde belanghebbenden worden genoemd, maar het oordeel van de CCD hierover ontbreekt (**bezwaar 3**).



Voorts is volgens u ten onrechte in een viertal dossiers informatie geweigerd op grond van het zijn van bedrijfs- en fabricagegegevens (**bezwaar 4**).

Tevens maakt u bezwaar tegen het feit dat informatie wordt geweigerd op grond van artikel 10 lid 2 sub e van de Wob en dat dit wordt gemotiveerd door te verwijzen naar dierenrechtenactivisme. Bovendien hebben betrokkenen volgens u op geen enkele wijze inzichtelijk gemaakt dat zij in de afgelopen jaren zijn geconfronteerd met ontoelaatbare bejegeningen van (dierenrechten)activisten. In het aanvullend bezwaarschrift heeft u deze grond verder aangevuld (**bezwaar 5**). U geeft aan dat gegevens op grond van artikel 10 lid 2 sub g van de Wob zijn geweigerd, maar dat vergunninghouders in hun zienswijzen niet aannemelijk hebben gemaakt dat zij zijn geconfronteerd met incidenten. Deze bezwaargrond hangt samen met **bezwaar 5** en zal in dit gedeelte worden behandeld.

Voor wat betreft de vergunningen 2016501 en 2016510 heeft u aangegeven dat de onevenredige benadeling – in de zin van inzicht in de fase waarin het onderzoek zich bevindt en de genomen stappen – niet aannemelijk is gemaakt. In het aanvullend bezwaarschrift heeft u deze grond verder aangevuld en onder andere aangegeven dat de twee specifieke genotypen geen enkel inzicht geven in de fase, waarin het onderzoek zich bevindt. Bovendien is volgens u in vergunning 2016510 in het geheel geen sprake van eiwitten (**bezwaar 6**).

Aangaande de vergunningen 2016503 en 2016509 heeft u aangegeven dat passages over de onderzoeksstrategie ten onrechte zijn geweigerd, omdat deze bij openbaarmaking niet meer beschermd zouden kunnen worden door intellectueel eigendom. Ook heeft u aangegeven dat het risico, dat onderzoekers niet als eerste kunnen publiceren, niet aannemelijk is gemaakt. In het aanvullend bezwaarschrift heeft u deze grond herhaald (**bezwaar 7**).

Met betrekking tot vergunning 2016504 heeft u aangegeven dat, nu er een patentaanvraag is gedaan, de informatie geen gevaar loopt. Vermeende concurrenten kunnen niet met een terugwerkende kracht een soortgelijke aanvraag indienen die vóór de aanvraag in dit onderzoek gaat. In het aanvullend bezwaarschrift heeft u aangegeven dat deze vergunninghouder onderdeel is van de overheid en de overheid kan niet aan zichzelf bedrijfs- en fabricagegegevens mededelen (**bezwaar 8**).

Voor wat betreft vergunning 2016506 heeft u aangegeven dat niet aannemelijk is gemaakt dat het verrichten van eigen onderzoek door anderen onevenredig benadelend is. In het aanvullend bezwaarschrift heeft u aangegeven dat deze vergunninghouder onderdeel is van de overheid en de overheid kan niet aan zichzelf bedrijfs- en fabricagegegevens mededelen. Voorts worden volgens u ten onrechte aantallen dieren en de groepsgroottes geweigerd. Ook de hoeveelheid te produceren vaccins is volgens u ten onrechte geweigerd (**bezwaar 9**).

U geeft aan dat u het als schokkend ervaart dat de CCD het individuele belang boven het maatschappelijke belang van de snelle ontwikkeling van goede vaccins of de oplossing van gezondheidsproblemen stelt (**bezwaar 10**).

Tot slot wordt door u verzocht om heroverweging van het besluit en om alsnog alle openbare informatie te verstrekken. Tevens wordt verzocht om toepassing te geven aan artikel 7:15 Awb.

### **Ten aanzien van bezwaar 1**

Op basis van het onderstaande slaagt deze grond niet. De motivering uit het bestreden besluit wordt aangevuld, maar dit leidt niet tot verdergaande openbaarmaking.

U heeft aangegeven dat data van vergaderingen ten onrechte zijn geweigerd op grond van artikel 11 lid 1 van de Wob. Dergelijke data van vergaderingen zijn geen persoonlijke beleidsopvattingen. Ook de verwachting dat kort voor de vergaderingen een piek zal optreden in het aantal vergunningaanvragen is geen persoonlijke beleidsopvatting.

Tijdens de hoorzitting op 21 september 2017 heeft u verduidelijkt dat het betrokken Wob-verzoek ziet op correspondentie tussen de DEC's en de CCD en aanvragers en de CCD (zoals volgt uit het op 19 oktober 2017 toegestuurde verslag van de hoorzitting). Hiermee heeft u het Wob-verzoek ingeperkt, waardoor de bovenstaande bezwaargrond komt te vervallen.

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

Aangaande het advies van het secretariaat van de CCD aan het bestuur van de CCD kan worden aangegeven dat dit is opgesteld ten behoeve van overleg en meningsvorming over een bestuurlijke aangelegenheid, zodat het is opgesteld ten behoeve van intern beraad. Bovendien bevat het advies meningen, voorstellen en inschattingen van de opsteller met betrekking tot een bestuurlijke aangelegenheid. Derhalve bevat het advies persoonlijke beleidsopvattingen. De feiten die in het document zijn opgenomen, zijn zozeer met de persoonlijke beleidsopvattingen verweven, dat het niet mogelijk is om deze daarin te scheiden. De CCD verwijst hierbij naar de zeer recente uitspraken van de Afdeling van 18 juli 2018 (ECLI:NL:RVS:2018:2424) en 10 oktober 2018 (ECLI:NL:RVS:2018:3299). Hiervoor kan eveneens aansluiting worden gezocht bij eerder genoemde uitspraak van de Afdeling van 21 december 2016 en de uitspraak van de Afdeling van 24 juni 2015 (ECLI:NL:RVS:2015:1942).



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

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

In het onderhavige geval betreft het een beperkte en aanwijsbare groep ambtenaren. De CCD acht het niet van belang voor een goede democratische bestuursvoering indien standpunten en adviezen van ambtenaren zelfstandig worden betrokken in de publieke discussie. De CCD ziet dan ook geen aanleiding om met toepassing van artikel 11 lid 2 van de Wob in niet tot personen herleidbare vorm informatie te verstrekken over deze beleidsopvattingen.

Uitzonderingen op het bovenstaande vormen de data van de vergaderingen van de CCD die in de ambtelijke adviezen zijn opgenomen. Deze data staan in de verslagen van de vergaderingen van de CCD vermeld, welke op de website van de CCD – [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl) – staan gepubliceerd. Door de zoekterm 'verslag' in te voeren, zijn deze verslagen eenvoudig te achterhalen. Uit de verslagen volgt wanneer welke aanvraag – onder vermelding van het NTS-nummer – in de vergadering is besproken. Op deze wijze is deze informatie reeds openbaar.

Uit het bestreden besluit volgt niet dat wij voornoemde informatie hebben geweigerd, vanwege de verwachting dat kort voor de vergaderingen een piek zal optreden in het aantal vergunningaanvragen. Wij kunnen u derhalve niet volgen in uw redenering.

### **Ten aanzien van bezwaar 2**

Op basis van het hiernavolgende slaagt deze grond niet.

Bij het bestreden besluit zijn per vergunning kruisjestabellen toegevoegd. In deze tabellen staan de aangetroffen documenten naar aanleiding van het Wob-verzoek. De documenten zijn genummerd en per document is opgenomen welke, indien van toepassing, weigeringsgrond(en) is (zijn) toegepast. Uit vaste jurisprudentie volgt dat op deze wijze voldoende inzichtelijk is gemaakt op welke grond(en) informatie wordt geweigerd. Verwezen wordt naar onder meer de uitspraak van de rechtbank Amsterdam van 29 december 2016 (ECLI:NL:RBAMS:2016:9336).

Voor wat betreft de weggelakte persoonsgegevens kan, gelet op onder meer de opbouw en context van de documenten, worden opgemaakt om wat voor soort gegevens het gaat. Daaruit kan worden afgeleid dat de persoonsgegevens en de hiertoe herleidbare informatie zijn geweigerd op grond van artikel 10 lid 2 sub e

van de Wob. In het besluit is tevens opgenomen in welke gevallen informatie is geweigerd op grond van het voorkomen van onevenredige bevoordeling of benadeling (artikel 10 lid 2 sub g van de Wob). Dit sluit aan bij de informatie zoals opgenomen in de kruisjestabel. Uit de kruisjestabel en uit het besluit volgt dat het advies van het secretariaat van de CCD aan het bestuur van de CCD volledig is geweigerd op grond van artikel 11 van de Wob.

Het is dus zonder meer duidelijk op basis van welke uitzonderingsgrond is geweigerd een bepaalde passage of zinsnede openbaar te maken.

De openbaar gemaakte documenten zijn bovendien bij iedere vergunning nagenoeg vergelijkbaar. Meerdere documenten betreffen formulieren of zijn opgemaakt in een vaste opbouw, zodat het per document motiveren van de weigeringsgrond zou leiden tot herhaling, hetgeen geen doel dient. Dit geldt ook in het geval het niet gaat om geheel gelijksoortige documenten. Verwezen wordt naar rechtsoverweging 3.2 van de uitspraak van de Afdeling van 2 september 2015, ECLI:NL:RVS:2015:2779.

### **Ten aanzien van bezwaar 3**

Op basis van het onderstaande slaagt deze grond niet.

In uw bezwaarschrift heeft u aangegeven dat weigeringen op grond van artikel 10 lid 2 sub g van de Wob – anders dan namen, locatiegegevens, gegevens die direct herleidbaar zijn tot natuurlijke personen en handtekeningen – niet inzichtelijk zijn gemaakt. De zienswijzen van derde belanghebbenden worden genoemd, maar het oordeel van de CCD hierover ontbreekt.

De CCD stelt dat uit het bestreden besluit een duidelijk standpunt volgt of de informatie geweigerd kan worden of niet. In aanvulling van hetgeen reeds in het bestreden besluit is opgenomen wordt per vergunning het oordeel van de CCD over het weigeren van de betreffende informatie kort weergegeven.

Uit het bestreden besluit volgt dat in vergunning 2016499 persoonsgegevens en gegevens van instellingen, afdelingen en locaties waar onderzoekers werkzaam zijn en/of waar dierproeven worden uitgevoerd zijn geweigerd. In uw bezwaarschrift stelt u dat het voor u duidelijk is dat namen, locatiegegevens, gegevens die direct herleidbaar zijn tot natuurlijke personen en handtekeningen geweigerd zijn op grond van onevenredige benadeling. De CCD is van mening dat uit de context van het document of de opbouw van de zinsconstructie ook voor de geweigerde dierproefinhoudelijke informatie voldoende duidelijk is om welk soort informatie het gaat en om welke reden de informatie is geweigerd. Aanvullend wordt opgemerkt dat op bladzijde 9 en 19 uit de dierproefinhoudelijke documenten bovengenoemde informatie is geweigerd. De CCD is van oordeel dat deze informatie terecht is geweigerd.

In de vergunningen 2016501, 2016510 zijn namen van (rechts)personen, afdelingen en functies geweigerd. In vergunning 2016501 is een bepaalde term geweigerd aangezien deze direct herleidbaar is naar de betrokken onderzoekers. Deze term is geweigerd op bladzijde 9, 21, 41, 42 en 46 van de documenten bij deze vergunning. In vergunning 2016510 zijn ook concurrentiegevoelige gegevens en bedrijfs-en fabricagegegevens geweigerd. Uit het besluit in combinatie met de



documenten kan aan de hand van de zinsconstructie en opbouw van het document worden opengemaakt welke informatie het betreft. De CCD is van oordeel dat deze informatie terecht is geweigerd.

In de vergunning 2016504 zijn de naar personen herleidbare gegevens naast de weigeringsgrond "eerbiediging persoonlijke levenssfeer" tevens geweigerd op grond van onevenredige benadeling. Zoals u ook in uw bezwaarschrift aangeeft, maakt u uit de zinsconstructie of het document zelf op indien dergelijke informatie is geweigerd. Informatie die is geweigerd op grond van bedrijfs- en fabricagegegevens zijn eveneens geweigerd op grond van onevenredige benadeling. Op deze wijze is eenvoudig te achterhalen welke informatie is geweigerd op welke gronden.

#### **Ten aanzien van bezwaar 4**

Op basis van het hiernavolgende slaagt deze grond niet.

Uit het primaire besluit volgt dat in een viertal dossiers informatie is geweigerd op grond van artikel 10 lid 1 sub c Wob. Het betreft informatie in de documenten bij de vergunningen: 2016504, 2016506, 2016510 en 2016501. Deze informatie is niet alleen geweigerd op grond van artikel 10 lid 1 sub c Wob, maar tevens op grond van artikel 10 lid 2 sub g Wob.

Uit de context van het document en/of de zinsconstructie kan worden afgeleid welk soort informatie is geweigerd. Daarbij wordt opgemerkt dat in het bestreden besluit zorgvuldig is ingegaan om welke redenen deze informatie is geweigerd. Beschreven is uit welke stappen het onderzoek bestaat en hoe vergunninghouder tot deze keuzes is gekomen. Deze informatie geeft inzicht in belangrijke beslismomenten in het onderzoek en de wijze van totstandkoming van het productieproces. Op onder meer deze wijze is inzichtelijk gemaakt welke technische informatie uit de bedrijfsvoering of het productieproces om welke redenen geweigerd dient te worden.

Uw enkele constatering dat uit deze informatie geen wetenswaardigheden kunnen worden afgeleid is onvoldoende om uw bezwaargrond te laten slagen.

Aanvullend wordt het volgende opgemerkt:

In het primaire besluit is voor wat betreft de vergunningen 2016510 en 2016501 gemotiveerd aangegeven welke informatie is geweigerd. In de zienswijzen is op woordniveau aangegeven welke informatie volgens de betrokken vergunninghouder geweigerd dient te worden. Uit het bestreden besluit volgt dat de CCD deze zienswijzen heeft gevolgd. U heeft ook deze zienswijze ontvangen, zodat u ook los van het bestreden besluit kunt nagaan welke informatie op welke grondslag is geweigerd.

In vergunning 2016504 zijn woorden en alinea's met belangrijke wetenswaardigheden geweigerd. In het besluit is dit voldoende onderbouwd. Daarbij zijn de zienswijzen van de betrokken derde belanghebbende gevolgd.

In vergunning 2016506 zijn slechts zeer summier woorden of tekstdelen geweigerd. Uit de context van het document en/of de zinsconstructie kan worden afgeleid welk soort informatie is geweigerd. Bovendien is ook in dit geval reeds in

het bestreden besluit gemotiveerd waarom de CCD de diersoorten, de subaantallen dieren, aantallen groepen en overlevingstijd niet openbaart. Zo is onder andere gemotiveerd dat uit deze informatie de gevolgde lijn van de onderzoeker blijkt en dit essentieel kan zijn voor het verloop en de uitkomsten van het onderzoek. In aanvulling daarop bericht de CCD u dat de diersoorten, subaantallen dieren, aantallen groepen en overlevingstijd, zowel afzonderlijk als in onderlinge samenhang beschouwd, details betreffen die de onderzoeksopzet blootleggen. Deze informatie geeft inzicht in de afwegingen van de vergunninghouder op belangrijke beslispunten en in de wijze van totstandkoming van het productieproces. Dit maakt deze informatie in hoge mate concurrentiegevoelig, omdat concurrenten de informatie kunnen gebruiken voor een eigen onderzoeksstrategie in een vergelijkbare situatie, waarmee zij het onderzoek kunnen reproduceren. Voor het standpunt van de CCD dat gegevens over de onderzoeksopzet zijn aan te merken als bedrijfs- en fabricagegegevens vindt de CCD steun in de uitspraak van de rechtbank Noord-Nederland van 16 oktober 2015 (ECLI:NL:RBNNE:2015:4811).

In aanvulling hierop verwijst de CCD u naar de uitspraak van de rechtbank Breda van 20 juni 2011 (ECLI:NL:RBBRE:2011:BQ9223) en de uitspraak van de Afdeling van 4 november 2009 (ECLI:NL:RVS:2009:BK1977) waarin aantallen dieren zijn aangemerkt als bedrijfs- en fabricagegegevens. De CCD is van oordeel dat deze informatie terecht is geweigerd.

#### **Ten aanzien van bezwaar 5**

Op basis van het onderstaande slaagt deze grond niet. De motivering uit het bestreden besluit wordt aangevuld, maar dit leidt niet tot verdergaande openbaarmaking.

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

Voor de CCD staat voldoende vast dat op geen enkele wijze aannemelijk is gemaakt dat het belang van openbaarheid in dit concrete geval zwaarder weegt. De CCD is van oordeel dat de aangehaalde uitspraak van toepassing is op zowel de namen van medewerkers van het secretariaat van de CCD als op namen van medewerkers van de vergunninghouders en/of de DEC's. Aangezien zowel in het bezwaarschrift als tijdens de hoorzitting op geen enkele wijze aannemelijk is gemaakt dat het belang van openbaarmaking zwaarder weegt dan het belang van het weigeren van deze informatie, ziet de CCD geen aanleiding om deze informatie (alsnog) te openbaren.

Ten aanzien van de dreiging van dierenrechtenactivisme wordt opgemerkt dat ook om deze reden de betreffende informatie geweigerd blijft. In het aanvullend bezwaarschrift en ook in andere aanvullende bezwaarschriften (bijvoorbeeld met uw kenmerken 2016/036, 2017/003 en 2017/029) heeft u deze bezwaargrond aangevuld en heeft u aangegeven dat de motivering van de Afdeling in de uitspraak van 15 maart 2017 (ECLI:NL:RVS:2017:680) uitsluitend wordt





gebaseerd op het feit dan onweersproken zou zijn gesteld dat betrokken vergunninghouders in de afgelopen jaren te maken hebben gehad met bedreigingen en intimidatie en dat de dreiging van dierenrechtenactivisme nog actueel is, de opmerking over een mogelijke heropleving van dierenrechtenextremisme in een rapportage van de NCTV en dat dierenrechtenextremisme nog wordt genoemd in het jaarverslag van de AIVD. Daarnaast heeft u aangegeven dat de vergunninghouders geen van allen zijn geconfronteerd met ontoelaatbare acties van dierenrechtenextremisten en dat de AIVD kennelijk geen dreiging van dierenrechtenextremisme meer ziet.

Het bovenstaande is door u tevens aangevoerd in een hoger beroepsprocedure, welke uiteindelijk heeft geleid tot de uitspraak van de Afdeling van 14 februari 2018 (ECLI:NL:RVS:2018:492). In deze uitspraak verwijst de Afdeling naar recente uitspraken van 7 juni 2017 (ECLI:NL:RVS:2017:1498), 5 april 2017 (ECLI:NL:RVS:2017:952) en 15 maart 2017 (ECLI:NL:RVS:2017:680), waarbij de Afdeling heeft overwogen dat de vrees voor dierenrechtenactivisme gerechtvaardigd is. De Afdeling ziet naar aanleiding van deze motivering geen aanleiding om thans tot een ander oordeel te komen. Het enkele feit dat in het jaarverslag van de AIVD over 2016 geen aparte signalering over dierenrechtenextremisme is opgenomen, is onvoldoende om thans tot een ander oordeel te komen dan in voormelde uitspraak.

Het voornoemde is nogmaals bevestigd in de zeer recente uitspraak van de Afdeling van 18 april 2018 (ECLI:NL:RVS:2018:1282), waarbij aanvullend is aangegeven dat derde belanghebbenden geen concrete tot hen gerichte dreiging van dierenrechtenactivisme aannemelijk hoeven te maken. Ook uit de uitspraken van de rechtbank Gelderland van 5 april 2018 (ECLI:NL:RBGEL:2018:1532) en van de rechtbank Den Haag van 20 februari 2018 (ECLI:NL:RBDHA:2018:1766) volgt, dat vanwege de gerechtvaardigde vrees voor dreiging van dierenrechtenactivisme, het belang van het voorkomen van onevenredige benadeling zwaarder dient te wegen dan het publieke belang bij openbaarmaking van de gevraagde gegevens.

#### **Ten aanzien van bezwaar 6**

Op basis van het onderstaande slaagt deze grond niet.

Wij zijn van oordeel dat middels het bestreden besluit in de vergunningen 2016501 en 2016510 terecht informatie is geweigerd die inzicht geeft in de fase van het onderzoek. De overwegingen in het bestreden besluit zijn ook voldoende gemotiveerd. In het bestreden besluit is aansluiting gezocht bij de zienswijzen, waaruit voor wat betreft vergunning 2016510 volgt dat onder meer informatie is geweigerd die ziet op het soort onderzoek, het soort cellen waar onderzoek naar wordt verricht, aantal benodigde dieren voor het opzetten van diermodellen, op welke wijze het onderzoek wordt geoptimaliseerd, nadere toelichting op welke wijze het onderzoek werkt en waar de onderzoeksresultaten voor gebruikt kunnen worden. Al deze informatie geeft inzicht in de strategie van het onderzoek. De onderzoeksstrategie geeft per definitie inzicht in de fase van het onderzoek.

Voor wat betreft vergunning 2016510 merkt u terecht op dat het niet gaat over eiwitten zoals beschreven is in het bestreden besluit. De informatie die in deze vergunning op basis van voornoemde weigeringsgrond is geweigerd, ziet op de

strategie van het onderzoek en kan om die wijze niet geopenbaard worden. De onderzoeksstrategie geeft per definitie inzicht in de fase van het onderzoek en toekomstige interventies.

#### **Ten aanzien van bezwaar 7**

Het slechts tegenspreken van de stelling dat het onjuist is om in de documenten bij de vergunningen 2016503 en 2016509 informatie te weigeren, omdat deze bij openbaarmaking niet meer beschermd zouden kunnen worden door intellectueel eigendom, is onvoldoende om deze grond te laten slagen.

De CCD verwijst aanvullend naar de uitspraak van de rechtbank Noord-Nederland van 16 oktober 2015, ECLI:NL:RBNNE:2015:4811, waaruit volgt dat de beoogde onderzoeksopzet terecht is aangemerkt als concurrentiegevoelig en als gevolg daarvan is geweigerd op grond van onevenredige benadeling.

Het belang de voornoemde informatie te weigeren wordt vergroot door het feit dat het onderzoek zich thans in de beginfase bevindt. In deze fase is het voor de concurrentie eenvoudiger te profiteren van de openbaar gemaakte informatie van vergunninghouder, omdat bekend is dat de voorsprong van vergunninghouder beperkt is. Met het openbaar maken van de geweigerde informatie is het zeer waarschijnlijk dat concurrenten met een grotere capaciteit op eenvoudige wijze deze achterstand kunnen inlopen, het geneesmiddel respectievelijk vaccin eerder op de markt kunnen brengen en vervolgens met eigendomsrechten beschermen. Dit heeft enorme financiële, commerciële en wetenschappelijke gevolgen.

Het vrijgeven van de gegevens kan leiden tot identificatie en daarmee tot het openbaar maken van informatie die in de betreffende fase van het onderzoek concurrentiegevoelig is. Het belang van bescherming van dit onderzoek en de daarbij gebruikte informatie ligt niet alleen in het onderzoek zelf, maar ook in mogelijk de eerste publicatie van de onderzoeker op het betreffende gebied en eventuele patenten. De betrokken belangen van vergunninghouder wegen om voornoemde redenen zwaarder dan het belang van openbaar maken van de informatie. Verwezen wordt naar een uitspraak van de rechtbank Gelderland van 22 juli 2014, ECLI:NL:RBGEL:2014:4555.

De CCD volgt hierbij de ingekomen zienswijze van vergunninghouder en ziet geen aanleiding meer openbaar te maken dan in het primaire besluit reeds is gedaan.

#### **Ten aanzien van bezwaar 8**

Deze grond slaagt niet.

U stelt dat de geweigerde informatie in vergunning 2016504 onjuist is en onvoldoende is gemotiveerd.

Vooropgesteld zij dat de betreffende informatie (in vergunning 2016504) is geweigerd, omdat sprake is van concurrentiegevoelige informatie (zie onder bezwaar 3, waar hierop nader is ingegaan).

In veel gevallen is bescherming van de onderzoeksstrategie middels intellectueel eigendom nog niet mogelijk, nu dit onderzoek zich nog in de beginfase bevindt. De betreffende vergunning (2016504) heeft een looptijd tot en met 31 mei 2021, waardoor dit onderzoek zich nog altijd in de beginfase bevindt. Het voornemen



van onderzoeker om patent aan te vragen, werkt signalerend voor het belang van het onderzoek en daarmee om de te weigeren informatie geweigerd te houden.

De CCD is van oordeel dat nu het onderzoek nog grotendeels moet worden uitgevoerd, er dus nader onderzoek nodig is en er nog geen publicaties zijn geweest over het voorliggende onderzoek, het niet wenselijk is dat onder andere de strategie van de komende tijd al in deze fase wordt geopenbaard. Onderdelen worden nog getest en pas na de dierproeven worden resultaten duidelijk en dus ook of bescherming middels intellectueel eigendomsrecht mogelijk is. Wanneer de betreffende informatie reeds nu wordt geopenbaard, is verder onderzoek niet meer van belang.

De CCD is van oordeel dat deze informatie terecht is geweigerd en dat de vergunninghouder voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat het belang van het voorkomen van onevenredige benadeling van de betrokken onderzoekers, als bedoeld in artikel 10 lid 2 sub g van de Wob, zwaarder moet wegen dan het publieke belang bij openbaarmaking van de hiervoor genoemde concurrentiegevoelige gegevens. De CCD verwijst hierbij naar de uitspraak van de rechtbank Gelderland van 3 juli 2017 (ECLI:NL:RBGEL:2017:3427).

#### **Ten aanzien van bezwaar 9**

Deze grond slaagt niet.

U stelt dat de weigering van informatie in vergunning 2016506 onjuist is en onvoldoende is gemotiveerd.

Ten aanzien van de motivering voor de geweigerde aantallen dieren en groepsgroottes verwijzen wij u naar onze reactie onder bezwaargrond 4. De hoeveelheid te produceren vaccins geeft inzicht in het marktaandeel en de totale afzetmarkt van vergunninghouder. Het feit dat deze vaccins niet door vergunninghouder zelf worden geproduceerd doet daar niets aan af. In het bestreden besluit is een uitgebreide motivering opgenomen. Aanvullend verwijzen wij u naar de uitspraak van de Afdeling van 15 maart 2017, ECLI:NL:RVS:2017:680 en de uitspraak van de rechtbank Midden-Nederland van 3 juli 2018, ECLI:NL:RBMNE:2018:3123. De CCD is van oordeel dat deze informatie terecht is geweigerd.

#### **Ten aanzien van bezwaar 10**

Deze grond slaagt niet. Uw constatering bevat geen bezwaargrond.

#### **Verzoek proceskostenvergoeding**

U heeft verzocht om proceskostenvergoeding door toepassing te geven aan artikel 7:15 Awb. Ingevolge artikel 7:15 lid 2 Awb komen de kosten die de belanghebbende in verband met de behandeling van het gemaakte bezwaar heeft moeten maken voor vergoeding in aanmerking, indien sprake is van een herroeping van het besluit, vanwege een aan het bestuursorgaan te wijten onrechtmatigheid.

In deze beslissing op bezwaar is slechts sprake van aanvulling van de motivering. Inhoudelijk is deze beslissing hiermee niet anders dan de bestreden besluiten.

Hiermee komt u, gelet op artikel 7:15 lid 2 Awb, niet in aanmerking voor een vergoeding in de proceskosten.

### **Wijze van openbaarmaking**

Aangezien de mogelijkheid bestaat dat belanghebbenden bezwaar hebben tegen de openbaarmaking van de informatie vindt de feitelijke openbaarmaking van de documenten niet eerder plaats, dan vier weken na dagtekening van deze beschikking, conform artikel 6, vijfde lid, van de Wob. Op deze wijze wordt aan deze belanghebbenden de mogelijkheid geboden om te proberen de openbaarmaking tegen te houden.

Dit kan door het indienen van een beroepschrift bij de rechtbank én door daarnaast bij de rechtbank te verzoeken om, bij wijze van voorlopige voorziening, het onderhavige besluit tot openbaarmaking te schorsen. Indien binnen twee weken na dagtekening van dit besluit een verzoek om voorlopige voorziening is gedaan bij de rechtbank, wordt de uitspraak van de voorzieningenrechter afgewacht, voordat tot daadwerkelijke openbaarmaking wordt overgegaan.

### **Beroep**

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief een beroepschrift indienen. Stuur het beroepschrift naar de rechtbank in uw arrondissement. Voor meer informatie verwijs ik u naar [www.rechtspraak.nl](http://www.rechtspraak.nl).

U kunt ook digitaal beroep instellen bij genoemde rechtbank via <http://loket.rechtspraak.nl/bestuursrecht>. Daarvoor dient u wel te beschikken over een elektronische handtekening (DigiD). Kijk op de genoemde site voor de precieze voorwaarden.

### **Tot slot**

In deze brief is u uitgelegd wat de reden is voor deze beslissing. Heeft u vragen, kijk dan op [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl) of neem telefonisch contact met ons op via 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Hoogachtend,

De Centrale Commissie Dierproeven,



prof. dr. B.J. Blaauboer  
waarnemend voorzitter

Inventaris Wob-verzoek W16-19S									
nr.	document	wordt verstrekt				weigeringsgronden			
		reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	<b>NTS2016498</b>								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel			x					
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1			x					
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2			x					
6	DEC-advies			x					
7	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
8	Advies CCD		x						x
9	Beschikking en vergunning				x		x	x	



04 APR. 2016

AVD 110002016498

### Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

#### 1 Gegevens aanvrager

1.1 Heeft u een deelnemernummer van de NVWA?  Ja > Vul uw deelnemernummer in | 11000  
*Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.*  
 Nee > U kunt geen aanvraag doen

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

Naam instelling of organisatie	Universiteit Twente
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]
KvK-nummer	50130536
Straat en huisnummer	Drienerlolaan 5
Postbus	217
Postcode en plaats	7500 AE Enschede
IBAN	
Tenaamstelling van het rekeningnummer	

1.3 Vul de gegevens van het postadres in.  
*Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.*

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
Functie	Assistent Professor	
Afdeling	[Redacted]	
Telefoonnummer	[Redacted]	
E-mailadres	[Redacted]	

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

(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.
Functie	PhD student	
Afdeling	[Redacted]	
Telefoonnummer	[Redacted]	
E-mailadres	[Redacted]	

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

## 2 Over uw aanvraag

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

## 3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- |            |                |
|------------|----------------|
| Startdatum | 01 . 05 . 2016 |
| Einddatum  | 01 . 05 . 2019 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Porous thin-film microwell scaffolds for extra hepatic transplantation of islets of langerhans
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Poreuze microwelconstructen voor transplantatie van eilandjes van Langerhans
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- |             |                               |
|-------------|-------------------------------|
| Naam DEC    | DEC Utrecht                   |
| Postadres   | Postbus 85500, 3508GA Utrecht |
| E-mailadres | dec-utrecht@umcutrecht.nl     |

## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- 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.*

<input checked="" type="checkbox"/> Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 741	Lege
<input type="checkbox"/> Wijziging €	Lege
<input type="checkbox"/> Via een eenmalige incasso	
<input checked="" type="checkbox"/> Na ontvangst van de factuur	

## 5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht
<input checked="" type="checkbox"/> Projectvoorstel
<input checked="" type="checkbox"/> Niet-technische samenvatting
Overige bijlagen, indien van toepassing
<input type="checkbox"/> Melding Machtiging
<input checked="" type="checkbox"/> appendix projectvoorstel; DEC-advies DEC Utrecht

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

Naam	[Redacted]
Functie	[Redacted]
Plaats	Enschede
Datum	30 - 3 - 2016
Handtekening	[Redacted]





## Form Project proposal

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

### 1 General information

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

### 2 Categories

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

### 3 General description of the project

#### 3.1 Background

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

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

Type 1 diabetes is a disease in which the insulin producing beta cells situated in pancreatic islets of Langerhans are destroyed by the patient own immune system. The total number of people in the world with diabetes is projected to rise from 171 million in 2000 to 366 million in 2030 [1]. To control their

blood glucose level, patients require daily insulin injections need to self-administer exogenous insulin daily. Although, it is effective in regulating blood glucose levels, this method lacks precise glycaemic control which on the long term may cause severe complications like neuropathy, nephropathy and retinopathy, increasing the risk of developing life-threatening diseases [2]. Currently, intra-hepatic islet transplantation is a promising minimal invasive therapy to treat type 1 diabetes [3,4]. However, the decrease of islet mass caused by mechanical stress, the lack of oxygen due to impaired vascularization and the immediate blood mediated immune response as well as a shortage of suitable pancreas donors limit the implementation of this therapy [5,6,7]. To overcome to these problems, alternative cell sources such as stem cells or reprogramming of pancreatic exocrine cells are under consideration. Various cell sources that might lead to an adequate supply of beta-cells for replacement therapy have been discussed in detail in [8-9].

Tissue engineering is an interdisciplinary field involving the use of cells and materials to repair or generate specific tissue or organ. These disciplines may be combined to generate artificial islets using an alternative cell source or allogeneic human islets, restore the extracellular matrix interactions and recreate the islets native environment, resulting in a three-dimensional tissue-engineered construct. We believe that extra-hepatic islet transplantation using tissue engineered constructs might improve the efficiency of clinical islet transplantation. Improving clinical islet transplantation by a tailor-made implant in an extrahepatic site can potentially lead to less donor organs needed for transplantation, a better maintenance of glycemia, and reduced or no use of exogenous insulin, a better control of glycemic levels and less risk of long-term complications. Overall, a significant improvement of quality of life for type 1 patients is to be expected with an improved long-term therapeutic outcome. Although immunosuppressive drugs are still needed in these macroporous implants, the fact that islets can be transplanted in a controlled manner outside of the liver, which is currently the standard transplant location, helps to increase the efficiency of clinical islet transplantation, while allo and autoimmune responses and the so called inflammatory blood mediated immune response are less severe outside of the liver, and blood vessel ingrowth from the host can take place in a very efficient manner allowing for a better survival and function of the islets. Such tailor-made implants can, if successful, be used for delivery of other cell sources: eg. de novo beta cells generated from stem cells, or a combination of adult stem cells or endothelial cells with donor islets to further improve vascularization, modulate local immune responses, and support local tissue regeneration. Obviously, if beta cells can be generated in the near future from a suitable stem cell source, not only a proper delivery vehicle is needed. Such as described here, but this could help overcome donor shortage and could lead to a tremendous increase in type 1 diabetes patients being treated with a specialized implant, rather than only the most severe cases as is done now by intrahepatic islet transplantation.

We have previously shown by in vivo experiments in a syngeneic diabetic BALB/c mice that islets transplanted using porous thin-film microwell array scaffolds, comprising a polymeric biomaterial made of 400PEOT30PBT70 (Polyactive©), in the epididymal fat pad are capable of efficiently curing type I diabetes. We found that these scaffold-implanted islets behaved similar to control mice implanted under the kidney capsule. In addition, we found that the scaffold architecture, allowed for quick revascularisation, prevented islets from clustering and clumping, and that mice responded very well to glucose tolerance tests. The same mice implanted with just free islets at the same location, were not able to reach normoglycemia and did not show recovery of type 1 diabetes during a 30 days period. We concluded based on this study that the scaffold architecture, consisting of an array of macroporous microwell indentations in a 20 µm thick polymer film, each resembling a round tapered cup shape, about 400 µm in diameter and 350 µm in depth, allowed for a very efficient transplantation and subsequent revascularisation of the islets stimulating their survival and function.

We have published on the advanced microfabrication of such scaffolds and thoroughly analysed the cell material interactions showing that islet function and morphology can be well maintained in individual microwells suitable for capturing individual islets in each microwell [10]. We are developing an upscaled version of this scaffold platform for large animal studies and future clinical application. The PEOT-PBT block copolymer family has been approved for human clinical applications, and is available on the market as a controlled drug delivery vehicle, bone filler and cement restrictor, making this a suitable biomaterial for future clinical application. Moreover, we showed that these block copolymers do not elicit a noticeable foreign body response, and islets were quickly vascularized within the first 14 days of implantation. We analyzed the blood vessel ingrowth, blood glucose levels, and response to intra peritoneal glucose tolerance tests and found that the engineered porosity in these scaffolds was crucial for enabling a quick revascularization of the islets. The predefined controlled porosity created by laser drilling which provide the holes in micro-size on surface of scaffold. The method is developed at the University of Twente and provided sufficient entry for vasculature to connect to, and grow into the embedded islets that enabled

endocrine functionality similar to islets transplanted in the gold standard kidney capsule model used in this study.

The advanced microfabrication technique used for creating the dedicated islet scaffolds can be easily applied to many different thermoplastic polymeric biomaterials, such as polyurethane based polymers.

In this study we will investigate a thin-film microwell system based on a clinically approved Polyurethane polymeric biomaterials (C-seal, Polyganics BV), also named PUG, in comparison to the abovementioned biomaterial. The specific aim of this study is investigation in the performance of this implant when up-scaling it from a mouse model to a rat model during a long-term study (>30 days). This will be a crucial step towards the further development of a clinically relevant sized scaffold for treatment of type 1 diabetes.

#### References:

1. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*. 2004 May; 27(5):1047-53.
2. Nathan D.M, et al., Long-term complications of diabetes mellitus. *N Engl J Med*, 1993; 328(23): 1676-85.
3. Shapiro J, Jonathan RTL, Ryan EA et al. Islet transplantation in seven recipients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 2000; 343: 230-238.
4. Ricordi C. Islet transplantation: a brave new world. *Diabetes*. 2003; 52: 1595-1603.
5. Biarnes M, et al. Beta-cell death and mass in syngeneically transplanted islets exposed to short- and long-term hyperglycemia. *Diabetes*, 2002; 86(9): P.1161-7.
6. Davalli, A.M., et al., Vulnerability of islets in the immediate posttransplantation period. Dynamic changes in structure and function. *Diabetes*, 1996; 45(9): 1161-7.
7. Carlsson, G., et al. Influence of microenvironment on engraftment of transplanted beta-cells. *Upsala Journal of medical science*, 2011. 116(1): 1-7.
8. Buitinga M, et al., Microwell Scaffolds for the Extrahepatic Transplantation of Islets of Langerhans. *PLoS ONE*, 2013; 8(5):64772.
9. Pagliuca F.W, et al. Generation of functional human pancreatic beta cells In vitro. *Cell*, 2014; 159: 428-439.
10. Zhou Q, et al. In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature*. 2008; 455, 627-632.

### 3.2 Purpose

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

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

The aim of this study is to develop an up-scalable non cell-adhesive microwell scaffold platform to be used for extrahepatic islet transplantation. We will investigate a thin-film microwell system in which islets can be individually kept separated in a 20 micrometre thick porous polymer sheet containing an array of microwells, covered by a porous sheet of the same polymer.

We will test the performance of these thin-film microwell implants in a comparative manner during a long-term implantation study in a well-defined type 1 diabetes rat model developed at the UMCG, and ultimately answer the research questions below:

- A) Is it possible to efficiently transplant islets of Langerhans in PUG microwell-scaffold, similar to PEOT-PBT microwell scaffolds in an upscaled type 1 diabetic rodent model (rat)?
- B) Does islet transplantation in a retroperitoneal, peritoneal and subcutaneous site using these scaffolds lead to normoglycemia in diabetic animals comparable to the control group carrying islets respectively under the kidney capsule, peritoneal cavity and subcutaneous?
- C) Is the retroperitoneal site a suitable location as a graft implantation site for thin film islet scaffolds? Or should they be placed in the peritoneal cavity or in a subcutaneous site? (Since the pancreas is a retroperitoneal organ, the site may improve the physiologic behaviour of the transplant.)
- D) Does clinically grade PUG perform similar, or better than 4000PEOT30PBT70 (polyactive) block copolymers when used for islet implantation in terms of biomaterial-tissue response, islet function, survival and revascularization?

### 3.3 Relevance

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

Type 1 diabetes is a disease in which the insulin producing beta-cells situated in pancreatic islets of Langerhans are destroyed by the patient's own immune system. It is estimated that almost 100,000 children under 15 years of age develop this type of diabetes annually worldwide.

We have previously shown in short-term (30 days) in vivo experiments in a syngeneic diabetic BALB/c mice that islets transplanted using porous thin-film microwell array scaffolds comprising Polyactive in the epididymal fat pad are capable of efficiently curing type 1 diabetes, similar to control mice implanted, with a similar amount of islet mass, under the kidney capsule. The scaffold architecture consists of an array of microwell indentations in a 20  $\mu\text{m}$  thick polymer film, each resembling a round tapered cup shape,  $\sim 400 \mu\text{m}$  in diameter and  $\sim 350 \mu\text{m}$  in depth.

We have published on the advanced microfabrication of such scaffolds and thoroughly analyzed the cell material interactions showing that islet function and morphology can be well maintained in individual microwells suitable for capturing individual islets in each microwell (Buitinga et al., PLOS ONE 2013; 8(5):e64772). We are developing an upscaled version of this scaffold platform for large animal studies and future clinical application. The PEOT-PBT block copolymer family has been approved for human clinical applications, and is available on the market as a controlled drug delivery vehicle, bone filler and cement restrictor, making this a suitable biomaterial for future clinical application. Moreover, we showed that these block copolymers do not elicit a noticeable foreign body response, and islets were quickly revascularized within the first 14 days of implantation. We analysed the blood vessel ingrowth, blood glucose levels, and response to peritoneal cavity glucose tolerance tests and found that the engineered porosity in these scaffolds was crucial for enabling a quick revascularization of the islets. The predefined controlled porosity created by femtosecond laser drilling developed at the University of Twente provided sufficient entry for vasculature to connect to, and growth into the embedded islets that enabled endocrine functionality similar to islets transplanted in the gold standard kidney capsule model used in this study. The advanced microfabrication technique used for creating the dedicated islet scaffolds can be easily applied to many different thermoplastic polymeric biomaterials, such as polyurethane based polymers. In this proposal, as a follow-up study in a larger rodent model, we would like to investigate whether a scaffold comprised of Polyurethane (PUG), a clinically approved polymer currently used for gastrointestinal repair produced by Polyganics BV, Groningen productname: C-SEAL®, is able improve the efficacy of islet transplantation, in comparison to Polyactive© scaffolds with the same geometry.

The aim of this study is to develop an upscalable non cell-adhesive microwell scaffold platform to be used for extrahepatic islet transplantation. We will investigate a thin-film microwell system, in which islets are can be individually kept separated in a 20 micrometer thick porous polymer sheet containing an array of microwells, covered by a porous sheet of the same polymer. The aim is to investigate the performance of this implant when upscaling it from a mouse model to a rat model, a crucial next step towards the development of a clinically relevant sized scaffold. The system investigated should not be mixed up with the scaffold that is tested at the UMCG together with the University of Twente that is made of Vivosorb® in DEC 6491, which has a completely different geometry and is composed of a different type of polymer as used in this study. It is good to keep in mind that both C-SEAL and Vivosorb are produced by Polyganics BV, which has received approval for both materials to be used in medical devices.

The aim is to test the performance of these thin-film microwell implants in a comparative manner during a long-term implantation study in a well-defined type 1 diabetes rat model developed at the UMCG.

Research questions:

- A) Is it possible to efficiently transplant islets of Langerhans in PUG microwell-scaffold, similar to PEOT-PBT microwell scaffolds in an upscaled type 1 diabetic rodent model (rat)?
- B) Does islet transplantation in renal capsule, peritoneal cavity or subcutaneously using these scaffolds lead to normoglycemia and is the scaffold condition better than islets transplantation without a scaffold?

### 3.4 Research strategy

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

In this study the potential of Microwell scaffolds will be tested as a carrier for the transplantation of islets

of Langerhans for the treatment of type 1 diabetes. Our aim is to study an allogeneic transplantation model in immunodeficient Nude Rowett Rats (to avoid rejection of allogeneic HLA mismatching tissue) using Albino Oxford rats as a donor for islets. It should be mentioned that for allogeneic transplantation the immunodeficient rats (Nude Rowett rats) are required as acceptor.

The PUG microwell scaffolds are prepared as a carriers for islets. The scaffold includes microwells (containers) with a diameter of  $\sim 300\mu\text{m}$ , in which the donor islets can be seeded. It further contains a flat film functioning as a lid to prevent loss of islets. Moreover, both lid and micro wells will allow for revascularization. To assess the potential of the new implant technique we will observe the engraftment and the functionality of the construct, revascularization and survival of islets of Langerhans. The functionality is defined as a controlled and adequate response to a changes in glucose levels in the blood.

---

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.

Polymers:

- 1) Thin-film microwell array scaffolds comprising 4000PEOT30PBT70 (Polyactive©)
- 2) Thin-film microwell array scaffolds comprising Polyurethane (PUG)

Type of animals:

- 1) Species: Rat strain: Albino oxford rat (normal male rat)
- 2) Species: Rat strain: Rowett nude (immune deficient male rat)

We will calculate the exact number of animals per experiment based on a power calculation. Based on previous and current studies done at the UMCG with islets and scaffolds, we estimate that a group size of 8-12 animals per group will suffice.

The following groups will be used in this project:

- 1- Implantation of PUG polymer thin film microwell scaffolds at the retroperitoneal site in albino oxford (AO) rats (n=12).
- 2- Implantation of Polyactive polymer thin film microwell scaffolds at the retroperitoneal site in AO rats (n=12).
- 3- Implantation of PUG polymer thin film microwell scaffolds with islets at retroperitoneal site in Rowett nude rat (n=12).
- 4- Implantation of Polyactive polymer thin film microwell scaffolds with islets at retroperitoneal site in Rowett nude rat (n=12).
- 5- Positive control 1: Transplantation of free islets under renal capsule in Rowett nude rat (n=12).
- 6- Implantation of PUG polymer thin film microwell scaffolds with islets in peritoneal cavity in Rowett nude Rats (n=12).
- 7- Implantation of Polyactive polymer thin film microwell scaffolds with islets in peritoneal cavity in Rowett nude rats (n=12).
- 8- Control 2: Transplantation of free islets in peritoneal cavity in Rowett nude rats (n=12).
- 9- Implantation of PUG polymer thin film microwell scaffolds with islets subcutaneously in Rowett nude rats (n=12).
- 10- Implantation of Polyactive polymer thin film microwell scaffolds with islets subcutaneously in Rowett nude rats (n=12).
- 11- Control 3: Transplantation of free islets subcutaneously in Rowett nude rats (n=12).

Detailed explanation of groups.

1- Group 1: Polyurethane (PUG) polymer scaffolds:

One PUG thin-film microwell scaffold per rat will be implanted retroperitoneally in Albino Oxford rats to evaluate local tissue response. This test is for local tissue response and biocompatibility of scaffolds. Retroperitoneal site is considered a proper site for implantation of the scaffolds because of a lesser immune response compared to the subcutaneous site and peritoneal cavity, while having sufficient space to place a scaffold. The surface area of each scaffold comprises of a porous lid and bottom containing microwells and is approximately 2.5 cm in diameter and about 370  $\mu\text{m}$  thick in total. Before microwell fabrication a predefined pattern of pores, each with a diameter of around 30  $\mu\text{m}$ , is created using femto-

second laser drilling to allow for vascularization, resulting in a macroporous implant made of two 20-30 micrometer thick polymer sheets.

2- Group 2: PEOT/PBT (Polyactive) polymer scaffolds:

One PEOT/PBT scaffold per rat will be implanted retroperitoneally in Albino Oxford rats to evaluate local tissue response. This test is for local tissue response and biocompatibility of scaffolds. The retroperitoneal site an interesting site for implantation of scaffolds, because of the decreased foreign body response and the amount of space available in comparison to the subcutaneous site and peritoneum. The scaffolds will have similar shape and size as the PUG scaffolds in group 1. The reason for testing scaffolds without islets at the retroperitoneal site is that we have ample experience with implantations using these polymers in the other locations used in this study, in rat models, but not at the retroperitoneal site. These two groups serve two important goals namely: 1) gaining experience with the retroperitoneal implantation, and 2) monitoring the tissue response to the scaffolds at this specific location.

3- Group 3: Clinically grade polyurethane (PUG) polymer scaffolds for islet transplantation:

Diabetes will be induced in this group. The PUG thin film microwell array scaffolds will be implanted retroperitoneally in diabetic nude Rowett rats directly after seeding the islets inside these constructs. We will implant an equivalent amount of islets as compared to the endocrine volume of the pancreas. The scaffolds will have similar shape and size as the PUG scaffolds in group 1.

4- Group 4: PEOT/PBT (polyactive) polymer scaffold for islet transplantation:

Diabetes will be induced in this group. The Polyactive scaffolds will be implanted retroperitoneally in diabetic nude Rowett rats directly after seeding the islets inside these constructs. The scaffolds will have similar shape and size as the PUG scaffolds in group 1.

5- Control 1 for islet transplantation:

Diabetes will be induced in the control group. The pancreatic islets will be isolated from Albino Oxford rats, and transplanted under the kidney capsule in Rowett nude rats. We will implant an equivalent amount of islets as compared to the endocrine volume of the pancreas.

6- Group 6: Clinically grade polyurethane (PUG) polymer scaffolds for islet transplantation:

Diabetes will be induced in this group. The PUG thin film microwell array scaffolds will be implanted in the peritoneal cavity of diabetic nude Rowett rats directly after seeding the islets inside these constructs. We will implant an equivalent amount of islets the endocrine volume of the endocrine pancreas. The scaffolds will have similar shape and size as the PUG scaffolds in group 1.

7- Group 7: PEOT/PBT (polyactive) polymer scaffold for islet transplantation:

Diabetes will be induced in this group. The Polyactive scaffolds will be implanted in the peritoneal cavity of in diabetic nude Rowett rats directly after seeding the islets inside these constructs. We will implant an equivalent amount of islets as compared to the endocrine volume of the pancreas. The scaffolds will have a similar shape and size as the PUG scaffolds in group 1.

8- Control 2 for islet transplantation:

Diabetes will be induced in the control group. The pancreatic islets will be isolated from Albino Oxford rats, and transplanted in the peritoneal cavity of Rowett nude rats. We will implant an equivalent amount of islets as compared to the endocrine volume of the pancreas.

9- Group 9: Clinically grade polyurethane (PUG) polymer scaffolds for islet transplantation:

Diabetes will be induced in this group. The PUG thin film microwell array scaffolds will be implanted subcutaneously in diabetic nude Rowett rats directly after seeding the islets inside these constructs. We will implant an equivalent amount of islets as compared to the endocrine volume of the pancreas. The scaffolds will have similar shape and size as the PUG scaffolds in group 1.

10- Group 10: PEOT/PBT (polyactive) polymer scaffold for islet transplantation:

Diabetes will be induced in this group. The PEOT/PBT scaffolds will be implanted subcutaneously in diabetic nude Rowett rats directly after seeding the islets inside these constructs. We will implant an equivalent amount of islets as compared to the endocrine volume of the pancreas. The scaffolds will have similar shape and size as the PUG scaffolds in group 1.

11- Control group 3 for islet transplantation:

Diabetes will be induced in the control group. The pancreatic islets will be isolated from Albino Oxford rats, and transplanted subcutaneously in Rowett nude rats without scaffolds. We will implant an equivalent amount of islets as compared to the endocrine volume of the pancreas.

It should be mentioned that diabetes will be induced in the nude rats by an injection of streptozotocin in the tail vein. The glucose concentration in the blood is determined in special time points with a drop of blood from the tail vein and a glucose meter. If required, a second injection will be given if the blood glucose concentration is not lower than 20 mmol/L. If the blood glucose concentration of the rats has reached critical level an insulin implant will be inserted subcutaneously. The implant (7 mm long, 2 mm diameter) ensures constant release of insulin to alleviate the stress caused by diabetes to the animals. When full type diabetes has been induced the implants will be placed. We will continue monitoring glucose levels for couple of months on a weekly basis. At the end of the implantation period the animals will be sacrificed. All surgeries with the nude rats will be done in a flow cabinet to work as aseptically as possible.

---

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.

To study the local tissue response and biocompatibility of PUG and polyactive polymers, the scaffolds will be implanted on Albino oxford rats.

In the next step, the scaffolds consist of islets will be implanted in diabetic nude Rowett rats to study the effect of scaffolds on viability and function of islets and restoring long-term normoglycemia in the rats. The islets will be implanted in 3 different sites (renal capsule, peritoneal cavity and subcutaneous) to find the proper site for implantation. Based on previous studies islet transplantation in peritoneal cavity and subcutaneously have proper islet function and viability. we are going to try the implantation of scaffolds containing islets in the same sites as well as renal capsule to find the proper site for implantation.

Milestone and selection points:

The scaffolds will be implanted retroperitoneally in the anesthetized nude diabetic rats. To this end a small incision (4-5 mm) will be made in the kidney area on the back of the rat. The scaffold will be implanted and fixed in the space.

For islet donation, the abdominal cavity of the anesthetized Albino oxford rats will be opened. Then a cannula will be inserted into the bile duct followed by perfusion with a sterile collagenase solution to enable islet isolation. Subsequently, the pancreas will be removed and the islets will be isolated by collagenase and manual selection. After isolation the islets will be counted to determine the yield. Islets will then be kept overnight in culture, and used the next day for seeding into the constructs and transplantation. For every recipient animal one needs 5 donors for seeding of the equivalent of the endocrine volume of the endocrine pancreas.

The isolated islets will be seeded directly into PUG and Polyactive microwell-scaffolds. Subsequently, they will be transferred to the operation room in a sterile manner in a closed container. The islet containing scaffolds will be placed retroperitoneally, while in the control rats, islets will be transplanted under the renal capsule.

Ten days after the islet containing scaffolds were transplanted, the "insulin implant" will be removed to be able to observe the effect of the scaffold on blood glucose levels. Blood glucose concentrations will be measured at day 1, 3, 5, 7, 10 and 14 during 2 weeks, followed by weekly measurements until the end of the project. The animals will be weighted 2 times per week.

Four weeks after islet transplantation, glucose tolerance tests will be performed to determine islet function and glucose sensitivity. The glucose tolerance test will be performed following a fasting period of two hours. For this purpose animals will receive 2 grams of normal rat food dissolved in water to eat. They will be trained to eat at least 70% of the food within 5 minutes. 100 µl of blood will be taken from the tail, 5 minutes before and 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60, 75, 90, 105 and 120 minutes after feeding. Subsequently, the blood insulin and C-peptide concentrations will be measured in order to observe the graft function.

4 months after islet transplantation, the animals will be sacrificed and the constructs will be removed and processed for histology.

---

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	Implantation of scaffolds in diabetic rats (receptor groups)
2	Islet isolation from Albino Axford rats (donor group)
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	





## Appendix

### Description animal procedures

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

#### 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 11000
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. University of Twente
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure                              |
|---------------|---|
| 1             | Implantation of scaffolds in diabetic rats (receptor) |
- 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.

To study the local tissue response and biocompatibility of PUG and polyactive polymers, the scaffolds will be implanted on Albino oxford rats.

In the next step, the scaffolds containing islets will be implanted in diabetic nude Rowett rats to study the effects of extrahepatic transplantation on viability and function of islets while restoring long-term normoglycemia in the rats. The islets will be implanted in 3 different sites (retroperitoneal, intraperitoneal and subcutaneous) to find the proper site for implantation. Based on previous mouse studies, done with the same scaffold design where it was shown that mice implanted in the epididymal fat pad, we predict that using a similar construct in a larger animal model for a longer time period will give similar results. We foresee a quick revascularization, because of the macroporous nature of the scaffold, fast recovery of type 1 diabetes, and a long-term survival like we found in the mouse studies. In order to study this in a comparative manner, we will use two different polymeric biomaterials, one similar to the material used in the mouse study and another, which is clinically approved for human use, with similar material properties.

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

In this study the potential of Microwell scaffolds will be tested as a carrier for the transplantation of islets of Langerhans for the treatment of type 1 diabetes. Our aim is to study an allogeneic transplantation model in Nude Rowett Rats using Albino Oxford rats as a donor for islets and find a proper location for implantation in the body. In this study, the PUG thin film microwell array scaffolds will be implanted at three different sites (retroperitoneally, intraperitoneally, subcutaneously) in diabetic nude Rowett rats directly after seeding the islets inside these constructs.

In detail, diabetes will be induced in the nude rats by an injection of streptozotocin in the tail vein. The glucose concentration in the blood will be determined every few days with a drop of blood from the tail vein and a glucose meter. If required, a second injection will be given if the blood glucose concentration is not lower than 20 mmol/L. If the blood glucose concentration of the rats has reached critical level an insulin implant will be inserted subcutaneously. The implant (7 mm long, 2 mm diameter) ensures constant release of insulin to alleviate the stress caused by diabetes to the animals. When full type diabetes has been induced the implants will be placed. We will continue monitoring glucose levels for couple of months on a weekly basis. Meanwhile islets will be harvested from donor rats (Appendix 2). Subsequently, the isolated islets will be seeded directly into PUG and Polyactive microwell-scaffolds. Then, they will be transferred to the operation room in a sterile manner in a closed container. The islet containing scaffolds will be placed in retroperitoneal, intraperitoneal and subcutaneous, while in the control rat's islets without scaffold will be transplanted under the renal capsule, intraperitoneally and subcutaneously respectively.

Ten days after the islet containing scaffolds are transplanted, the "insulin implant" will be removed to be able to observe the effect of the scaffold on blood glucose levels. Blood glucose concentrations and weight of animals will be measured regularly. Moreover, after transplantation of scaffolds, glucose tolerance tests will be performed to determine islet function and glucose sensitivity. The glucose tolerance test will be performed following a fasting period of two hours. For this purpose animals will receive 2 grams of normal rat food dissolved in water to eat. They will be trained to eat at least 70% of the food within 5 minutes. 100 µl of blood will be taken from the tail, in different time points after feeding. Subsequently, the blood glucose concentrations will be measured in order to observe the graft function, when necessary the concentration of insulin and c-peptide in these samples can also be verified. Four months after islet transplantation, the animals will be sacrificed and the constructs will be removed and processed for histology.

---

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

We calculated the exact number of animals per experiment based on a power calculation. Based on previous and current studies at the UMCG with islets and scaffolds, we estimate that a group size of 8-12 animals per group will suffice. Based on their findings, which are in line with literature, we take into consideration that around 2500 to 3000 islets are needed to sufficiently treat diabetes in this rat model. The following groups will be used in this project:

- Implantation of PUG polymer thin film microwell scaffolds at the retroperitoneal site in albino oxford (AO) rats (n=12).
- Implantation of Polyactive polymer thin film microwell scaffolds at the retroperitoneal site in AO rats (n=12).
- Implantation of PUG polymer thin film microwell scaffolds with islets at retroperitoneal site in Rowett nude rat (n=12).
- Implantation of Polyactive polymer thin film microwell scaffolds with islets at retroperitoneal site in Rowett nude rat (n=12).
- Positive control 1: Transplantation of free islets under renal capsule in Rowett nude rat (n=12).
- Implantation of PUG polymer thin film microwell scaffolds with islets in peritoneal cavity in Rowett nude Rats (n=12).
- Implantation of Polyactive polymer thin film microwell scaffolds with islets in peritoneal cavity in Rowett nude rats (n=12).
- Control 2: Transplantation of free islets in peritoneal cavity in Rowett nude rats (n=12).
- Implantation of PUG polymer thin film microwell scaffolds with islets subcutaneously in Rowett nude rats (n=12).
- 10-Implantation of Polyactive polymer thin film microwell scaffolds with islets subcutaneously in Rowett nude rats (n=12).
- 11-Control 3: Transplantation of free islets in in subcutaneously in Rowett nude rats (n=12).

---

## **B. The animals**

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

The normal and immune deficient male rats will be purchased from a licensed breeder in the EU. The male rats will be used as the receptor groups because of less variability due to lack of a hormonal cycle. Additionally, the islet isolation in males are higher than female rats. In total, the scaffolds consisting of islets will be transplanted in 72 Rowett nude rats and scaffolds without islets will be implanted in 24 Albino oxford rats, while the control group will consist of 36 Rowett nude rats for three different location (in renal capsule, in peritoneal cavity and subcutaneous). All in all, 108 Rowett rats and 24 Albino oxford rats are required as the receptor groups.

### C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

### D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement: the experimental design is based on our previous successful in vivo studies in mice. In elaborate in vitro studies we have optimized the scaffold design tailored for islet transplantation. Islet function and viability was extensively tested in vitro showing that the scaffold supports endocrine function and survival of islets. As a follow up study we performed a short-term implantation study in diabetic mice, to test the therapeutic effect of scaffold-implanted islets. Since it is not possible to mimic type 1 diabetes in vitro, the true test can only be performed in a type 1 diabetic animal model to ensure proper endocrine and physiological conditions.

Specifically, we have previously shown in short-term (30 days) in vivo experiments in a syngeneic diabetic BALB/c mice that islets transplanted using porous thin-film microwell array scaffolds comprising 4000PEOT30PBT70 (Polyactive©) in the epididymal fat pad are capable of efficiently curing type 1 diabetes. The scaffold architecture consists of an array of microwell indentations in a 20 µm thick polymer film, each resembling a round tapered cup shape, ~400 µm in diameter and ~350 µm in depth. We have published on the advanced microfabrication of such scaffolds and thoroughly analysed, the cell material interactions showing that islet function and morphology can be well maintained in individual microwells suitable for capturing individual islets in each microwell (Buitinga et al., PLOS ONE 2013; 8(5):e64772). We are now developing an up-scaled version of this scaffold platform for large animal studies and future clinical applications.

Reduction: we designed the experiments with use of the minimal amount of rats that are necessary to show a significant effect using power analysis statistics based on previous studies done in our group and at the UMCG.

Refinement: The experiments will be performed at the UMCG animal facility with the help of colleagues having ample knowledge of and experience with transplantation of islets in diabetic rats. The experiments will be assisted and supervised with the help of skilled technicians and PhD students at the UMCG, to ensure a minimal burden for the animals used. Since regular blood samples will be taken, we aim to use a small catheter in the tail vein to further minimize stress to the animal.

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

Anesthesia will be apply accordig to SOP. During the removal of the pancreas, the transplantation procedures, the application of the insulin implants, the rats will be exposed to a mixture of isoflurane and air, meaning the rats will be under full anesthesia. Moreover,for pain manegmenet a dose of temgesic will be administered to the islets only and the islet-scaffold transplanted rats. Subsequently, the

administration will be repeated after 8-12 h. The total duration of pain relief will be 1-2 days. I should mention that because the blood samples will be collected at short intervals, for decreasing the suffering for animals, we will use of a catheter in the tail vein.

## 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.

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

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

No

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

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

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

## Classification of discomfort/humane endpoints

### H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Anaesthesia will be used in receptor groups before transplantation. Moreover, the rats will receive post-islet transplantation pain relief medication.

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

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

Induction of type 1 diabetes in rats may lead to loss of weight.

Explain why these effects may emerge.

The physiological effects of not being able to control blood glucose levels because of insufficient insulin production by the animal and/or transplanted islets.

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

The weight of the rats will be regularly monitored and in case a severe weight loss occurs the experiment will be terminated. If necessary the islets volume used in the subsequent experiment will be increased to ensure better glycaemic control.

#### **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.

When animals show signs of disease (curved posture, losing weight more than 20% of the total body weight), they will be sacrificed. However, animals with diabetes can look worse, or lose weight, but this should not be construed as humane endpoint.

Indicate the likely incidence.

Very unlikely since the model has been optimized in previous studies at the UMCG and no adverse effects were observed using this optimized model.

#### **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').

Moderate, as a result of surgery for implantation purposes and development of diabetes.

### **End of experiment**

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

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

Both Oxford AO and nude Rowett rats will be euthanized by cutting the aorta under full anaesthesia after 5.5 months of implantation after which the scaffolds will be explanted and evaluated histologically.

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

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

Yes



## Appendix

### Description animal procedures

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

#### 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 11000
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. University of Twente
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure                              |
|---------------|---|
| 2             | Islet isolation from Albino Oxford rats (donor group) |
- 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.

In this study the potential of Microwell scaffolds will be tested as a carrier for the transplantation of islets of Langerhans for the treatment of type 1 diabetes. Our aim is to study an allogeneic transplantation model in Nude Rowett Rats using Albino Oxford rats as a donor for islets and find a proper location for implantation in the body. Albino Oxford rats will be used as a donor for islets due to the higher islet isolation efficiency .

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

In this part of the study, the islets will be isolated from Albino Oxford rats. In detail, for islet donation, the abdominal cavity of the anesthetized Albino Oxford rats will be opened. Then a cannula will be inserted into the bile duct followed by perfusion with a sterile collagenase solution to enable islet isolation. Subsequently, the pancreas will be removed and the islets will be isolated by collagenase and manual selection. After isolation the islets will be counted to determine the yield. Islets will then be kept overnight in culture, and used the next day for seeding into the constructs and transplantation. For every recipient animal one needs 5 donors for seeding of the equivalent of the endocrine volume of the endocrine pancreas. In total, 540 Albino Oxford rats are required for isolation and transplantation of islets in 108 Rowett nude rats.

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

Since, every recipient animal one needs 5 donors for seeding of the equivalent of the endocrine volume of the endocrine pancreas, In total, 540 Albino Oxford rats are required for isolation and transplantation

of islets in 108 Rowett nude rats.

## **B. The animals**

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

The normal male rats will be purchased from a licensed breeder in the EU. The male rats will be used as the donor group because of the less variable in males due to lack of a cycle. Additionally, the isolation efficacy in males are higher than female rats. Based on experience from previous studies in this animal model, 2  $\mu$ l of islet tissue can be isolated from an Albino oxford rat. Moreover, 10  $\mu$ l (2500-3000 islets) of islet tissue is sufficient to induce normoglycemia. So, 5 Albino oxford rats are required as islet donors for transplantation in one diabetic Rowett nude rat. All in all, in total 540 "Albino oxford rats " are required for islet isolation.

## **C. Re-use**

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

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

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

Replacement: the experimental design is based on our previous successful in vivo studies in mice. In elaborate in vitro studies we have optimized the scaffold design tailored for islet transplantation. Islet function and viability was extensively tested in vitro showing that the scaffold supports endocrine function and survival of islets. As a follow up study we performed a short-term implantation study in diabetic mice, to test the therapeutic effect of scaffold-implanted islets. Since it is not possible to mimic type 1 diabetes in vitro, the true test can only be performed in a type 1 diabetic animal model to ensure proper endocrine and physiological conditions.

Specifically, we have previously shown in short-term (30 days) in vivo experiments in a syngeneic diabetic BALB/c mice that islets transplanted using porous thin-film microwell array scaffolds comprising 4000PEOT30PBT70 (Polyactive©) in the epididymal fat pad are capable of efficiently curing type 1 diabetes. The scaffold architecture consists of an array of microwell indentations in a 20  $\mu$ m thick polymer film, each resembling a round tapered cup shape, ~400  $\mu$ m in diameter and ~350  $\mu$ m in depth. We have published on the advanced microfabrication of such scaffolds and thoroughly analysed, the cell material interactions showing that islet function and morphology can be well maintained in individual microwells suitable for capturing individual islets in each microwell (Buitinga et al., PLOS ONE 2013; 8(5):e64772). We are now developing an up-scaled version of this scaffold platform for large animal studies and future clinical applications.

Reduction: we designed the experiments with use of the minimal amount of rats that are necessary to show a significant effect using power analysis statistics based on previous studies done in our group and at the UMCG.

Refinement: The experiments will be performed at the UMCG animal facility with the help of colleagues having ample knowledge of and experience with transplantation of islets in diabetic rats. The experiments will be assisted and supervised with the help of skilled technicians and PhD students at the UMCG, to ensure a minimal burden for the animals used. Since regular blood samples will be taken, we aim to use a small catheter in the tail vein to further minimize stress to the animal.

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

Anaesthesia will be applied according to Standard Operating Procedures of the UMCG. During the

removal of the pancreas the rats will be exposed to a mixture of isoflurane and air, meaning the rats will be under full anaesthesia. Moreover, for pain management a dose of temgesic will be administered.

## 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.

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

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

No

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

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

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

## Classification of discomfort/humane endpoints

### H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

The pancreases will be removed for islet isolation, under anesthesia by an incision in the abdominal cavity.

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

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

None.

Explain why these effects may emerge.

-

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

-



**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.

When animals show signs of disease (curved posture, losing weight more than 20% of the total body weight), they will be sacrificed. However, these symptoms are not expected for the donor animals.

Indicate the likely incidence.

Very unlikely.

**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').

Terminal, as a result of collection of Islands followed by euthanasia under terminal anesthesia.

**End of experiment**

**L. Method of killing**

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

The Albino Oxford rats as islet donors will be euthanized by cutting the aorta under full anaesthesia.

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

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

Yes

#### **A. Algemene gegevens over de procedure**

1. Aanvraagnummer : 2015.I.110.014
2. Titel van het project : Porous thin-film microwell scaffolds for extra hepatic transplantation of islets of Langerhans
3. Titel van de NTS : Poreuze microwelconstructen voor transplantatie van eilandjes van Langerhans

#### 4. Type aanvraag:

- nieuwe aanvraag projectvergunning  
 wijziging van vergunning met nummer :

#### 5. Contactgegevens DEC

- Naam DEC : DEC Utrecht  
Telefoonnummer contactpersoon : 088 – 75 59 247  
Emailadres contactpersoon : dec-utrecht@umcutrecht.nl

#### 6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):

- ontvangen door DEC: 21-05-2015  
 aanvraag compleet:  
 in vergadering besproken: 03-06-2015 en 09-09-2015  
 anderszins behandeld: per mail: 10-12-2015  
 termijnonderbreking(en) van / tot : 09-06-2015 tot 18-08-2015  
15-09-2015 tot 08-12-2015  
11-12-2015 tot 04-02-2016  
 besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:  
 aanpassing aanvraag:  
 advies aan CCD: 18-03-2016

#### 7. Eventueel horen van aanvrager

- Datum:
- Plaats:
- Aantal aanwezige DEC-leden:
- Aanwezige (namens) aanvrager:
- Strekking van de vraag / vragen:
- Strekking van het (de) antwoord(en):
- Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag:

#### 8. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: 09-06-2015
- Strekking van de vragen:

### Niet Technische Samenvatting

- Algemeen: De DEC verzoekt u de titel in het Nederlands te schrijven en de spelfouten uit de tekst te verwijderen. Graag aanpassen.
- 3.1, beschrijving doelstellingen: De DEC verzoekt u in de tekst op te nemen wat de mogelijke voordelen van de transplantatie voor de patiënt zijn in vergelijking met insuline spuiten.
- 3.1, beschrijving doelstellingen: De DEC verzoekt u te noemen waar de eilandjes van Langerhans worden geïmplantéerd en duidelijker uit te leggen dat alle eilandjes samen een orgaan vormen dat insuline produceert. Graag aanpassen.
- 3.5, indeling dierproeven naar de verwachte ernst: Het is niet de bedoeling alle handelingen hier te benoemen. Daarnaast zijn er nog maar vier categorieën van ongerief: terminaal, licht, matig en ernstig. Een zin als: 'de ernst van de dierproeven wordt ingeschat als licht ongerief' of '75% van de dieren ondervindt licht ongerief en 25% van de dieren ernstig ongerief' is voldoende. Graag wijzigen.

### Projectvoorstel

- 3.1, achtergrond: De DEC verzoekt u wat meer wetenschappelijke achtergrond te geven, inclusief referenties.
- 3.1, achtergrond: Het perspectief van de patiënt ontbreekt. De DEC verzoekt u te beschrijven wat de resultaten van dit onderzoek zouden kunnen opleveren voor de patiënten en dat af te zetten tegen de huidige behandelmethoden. Door een transplantatie is het wellicht niet meer nodig insuline te spuiten, maar de DEC neemt aan dat ook die getransplanteerde eilandjes worden aangevallen door het immuunsysteem van de patiënt en dat deze dus wel zijn leven lang immuunsuppressieve middelen zal moeten slikken. Heeft dat de voorkeur boven het spuiten van insuline? Zou het in de toekomst bijvoorbeeld mogelijk zijn om uit eigen stamcellen eilandjes te laten groeien en heeft dat dan meerwaarde voor patiënten ten opzichte van het transplanteren van eilandjes van donoren? Graag nader op dit soort voor de hand liggende vragen ingaan.
- 3.2, doel: In plaats van intraperitoneaal zou men ook in de peritoneale holte (omentum) de transplantatie kunnen laten plaatsvinden, die ook zeer goed doorbloed is en goed te bereiken. Bij los in de buikholte plaatsen is de kans op snelle vascularisatie van de scaffold veel kleiner dan bij plaatsen in het omentum. Heeft u dat ook overwogen? Zo ja, waarom heeft u dan toch gekozen voor intraperitoneaal?
- 3.4, onderzoeksstrategie: De DEC verzoekt u te noemen dat er een immuundeficiënte rat nodig is als acceptor.

### Bijlagen:

- Algemeen: De DEC verzoekt u het aantal bijlagen te reduceren tot twee, namelijk één met betrekking tot donoren en één met betrekking tot de ontvangers. De DEC adviseert u bijlage 2 of 3 in elk geval te verwijderen, omdat deze identiek zijn. Graag herschrijven.

- Algemeen: De DEC verzoekt u in de bijlagen niet het totaal aantal ratten te noemen voor het gehele onderzoek, maar slechts het aantal ratten te noemen dat nodig is voor het in die bijlage beschreven experiment.
- Alle bijlagen, D. Vervanging, vermindering en verfijning: De DEC verzoekt u hier te noemen dat isofluraan met lucht wordt gegeven, in plaats van met zuurstof. Graag aanpassen.
- Datum antwoord: 18-08-2015
- Strekking van de antwoorden:  
Niet Technische Samenvatting
- Algemeen: Handmatig gedaan, de template heeft een zodanige beveiliging dat de spel check optie in Word niet werkt.
- 3.1, beschrijving doelstellingen: Aangepast extra zinnen toegevoegd die dit omschrijven.
- 3.1, beschrijving doelstellingen: Aangepast, een meer uitgebreide omschrijving van de plaatsing en werking van het implantaat.
- 3.5, indeling dierproeven naar de verwachte ernst: Aangepast zoals gevraagd.

#### Projectvoorstel

- 3.1, achtergrond: Meer referenties zijn toegevoegd en een wat uitgebreidere beschrijving van de achtergrond is nu gegeven.
- 3.1, achtergrond: Aangepast en omschreven waarom extrahepatische transplantatie voordelig is tov intra hepatisch, waarom deze therapie een potentieel beter is dan de huidige en het gebruik van andere celtypen, bronnen is nu beschreven.
- 3.2, doel: Dit is een site die met het oog op de toekomstige klinische toepassing gemakkelijk toegankelijk is, we hebben na overleg met transplantatie chirurgen in Leiden in gedachten genomen dat voor humane toepassing er opschaling van het construct nodig is, en dus ruimte om het implantaat te plaatsen, besloten dat een intra- of retroperitoneale interventie, waarschijnlijk het snelst en meest risico-vrij uit te voeren is in de patiënt. Het implantaat zal ook tegen de wand worden geplaatst en niet vrij in de holte, om toch vaat ingroei door de buikwand te laten plaatsvinden.
- 3.4, onderzoeksstrategie: Aangepast in de tekst.

#### Bijlagen:

- Algemeen: Er zijn nu slechts 2 bijlagen ipv 5, met daarin de donor en ontvanger interventies beschreven.
- Algemeen: Aangepast zoals voorgesteld
- Alle bijlagen, D. Vervanging, vermindering en verfijning: Aangepast zoals gevraagd
- Datum: 15-09-2015
- Strekking van de vragen:  
Beide bijlagen:
- B. De Dieren: In beide bijlagen worden nog steeds alle dieren genoemd. Graag aanpassen.

- H. Pijn en pijnbestrijding: Het lijkt erop dat u een ouder (maar in elk geval niet volledig) formulier van de CCD heeft gebruikt. U dient ook nog de aanvullende vraag te beantwoorden: "Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt".

#### Bijlage 1

- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Bij de beschrijving van de statistische methoden staat de volgende zin: "Refer to information available from previous studies to underpin the 8-12 animals required per group". Deze zin komt de DEC wat vreemd over. Graag verhelderen.
- B. De dieren: U spreekt hier over donordieren, terwijl het volgens de DEC in deze bijlage gaat over de ontvanger-dieren. Graag verhelderen/wijzigen.

#### Bijlage 2

- K. Classificatie van ongerief: Omdat deze bijlage gaat over de donoren zou het ongerief hier licht moeten zijn. Graag wijzigen.
- L. Wijze van doden: Ook het antwoord op deze vraag moet worden aangepast op de donordieren. Graag alsnog doen.

#### Niet Technische Samenvatting

- De DEC raadt u ten eerste aan om de NTS nogmaals kritisch door te lezen vanwege de vele spelfouten en grammaticale fouten en ook de titel helderder te formuleren.
- 3.5: De DEC raadt u aan hier te vermelden welk percentage van de dieren licht ongerief ondergaat en wel percentage matig ongerief ondergaat. Gebruik voor het vermelden van het ongerief de juiste termen, namelijk "licht" en "matig".
- Datum antwoord: 08-12-2015
- Strekking van de antwoorden:
  - B. De Dieren: Aangepast in de nieuwe bijlagen.
  - H. Pijn en pijnbestrijding: Aangevuld met de benodigde informatie

#### Beide bijlagen:

- B. De Dieren: Aangepast.
- H. Pijn en pijnbestrijding: Beter en uitgebreider omschreven.

#### Bijlage 1

- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Deze zin is inderdaad wat vreemd. We hebben dit nu anders omschreven zodat het duidelijker is hoe deze evaluatie tot stand gekomen is.
- B. De dieren: Gewijzigd

## Bijlage 2

- K. Classificatie van ongerief: Aangepast.
- L. Wijze van doden: Aangepast.

## Niet Technische Samenvatting

- De DEC raadt u ten zeerste aan om de NTS nogmaals kritisch door te lezen vanwege de vele spelfouten en grammaticale fouten en ook de titel helderder te formuleren.  
Het formulier is niet echt makkelijk om mee te werken, vooral omdat tekst ad random verdwijnt. Maar er zijn sterke verbeteringen gemaakt in de uitleg en ook is er gekeken naar de "typo's".
- 3.5: Aangepast naar bovenstaand advies
  
- Datum: 11-12-2015
- Strekking van de vraag:
- De DEC heeft uw wijzigingen bekeken en is van mening dat u er verstandig aan doet de voorgestelde veranderingen eerst voor te leggen aan de IvD. De aangedragen wijzigingen zijn naar de mening van de DEC onvoldoende verwerkt in de aanvraag.
  
- Datum antwoord: 04-02-2016
- Strekking van het antwoord:
- Hierbij stuur ik u de herziene versie van de DEC aanvraag aangepast na overleg met de IVd.

De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag: Ja

### 9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC)

- Aard expertise:
- Deskundigheid expert:
- Datum verzoek:
- Strekking van het verzoek:
- Datum expert advies:
- Expert advies:

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

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

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

1. Het project is:  
 uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord.

- uit onderwijskundig oogpunt verantwoord.
- uit het oogpunt van productiedoeleinden verantwoord.
- wettelijk vereist.

2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Het wordt ingeschat als een substantieel belang. De doelstelling van dit project is het optimaliseren van de transplantatie van de eilandjes van Langerhans (insuline producerende cellen) van een donor naar een type I diabetes patiënt. Momenteel injecteren diabetici zichzelf dagelijks meerdere keren met insuline om hun bloedsuikerspiegel op pijl te houden. Echter, deze methode mist een precieze regulatie van de bloedsuikerspiegel. Voornamelijk jonge en ernstige type I diabetes patiënten hebben kans om op de lange termijn ernstige complicaties te ontwikkelen als gevolg van de diabetes, zoals nierfalen, zenuw schade en blindheid. Volgens epidemiologische schattingen zal het aantal type I diabetes patiënten in de toekomst sterk stijgen en zal de behoefte aan een effectievere behandeling toenemen. In het voorliggende project willen de onderzoekers een scaffold testen die als drager voor eilandjes van Langerhans kan fungeren. De eilandjes van Langerhans, omgeven door het scaffold, dienen te fungeren als een nieuw orgaan dat insuline kan afgeven op een natuurlijke wijze. De implantaat wordt in de buikholte geplaatst waarin het wordt omsloten door een netwerk van ingroeiende bloedvaten. Het voordeel van een transplantatie van de eilandjes van Langerhans is een precieze regulatie van de bloedsuikerspiegel omdat insuline en glucagon afgifte dan continue wordt gereguleerd. Bovendien zullen er dan minder of geen insuline injecties nodig zijn. De transplantatie van eilandjes van Langerhans wordt momenteel al voor de behandeling van diabetespatiënten toegepast. Deze therapievorm is echter nog zeer inefficiënt, doordat het overgrote deel van de getransplanteerde eilandjes van Langerhans afsterft na implantatie. Meerdere donoren zijn nodig om voldoende materiaal te verzamelen voor de transplantatie in één patiënt, en daarom wordt deze behandeling momenteel alleen bij patiënten met een extreme vorm van type I diabetes toegepast. In dit project beoogt men het succes en de efficiëntie van een transplantatie te vergroten door verschillende materialen van het scaffold te testen, het scaffold in verschillende locaties in de buikholte plaatsen en de transplantatietechniek verder te onderzoeken en te toetsen in een groter proefdier (rat in plaats van muis). De opbrengsten hiervan zouden het in de toekomst mogelijk kunnen maken dat slechts één donor nodig is voor één patiënt. Daarnaast zouden de technische ontwikkelingen van het scaffold kunnen bijdragen aan toekomstige methodes waarin stamcellen kunnen worden geïmplantieerd die kunnen fungeren als de eilandjes van Langerhans.
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. In het onderzoek wordt gebruikt gemaakt van ontvanger ratten (bijlage 1) en donor ratten (bijlage 2). Om te onderzoeken welke parameters van belang zijn voor het verbeteren van de transplantatietechniek willen de onderzoekers a) een tweetal polymeren, b) een drietal locaties in de buikholte, en c) de bloedsuikerspiegel voor een

periode van 4 maanden na transplantatie toetsen in een rat model. Naast de locatie in de buikholte en de locatie subcutaan in de buikholte, is ervoor gekozen om de retroperitoneale locatie voor de transplantatie te onderzoeken omdat in deze locatie wordt verwacht dat de afweer op het donorweefsel minimaal is en de revascularisatie juist optimaal is. Wanneer deze locatie goed werkt, zullen in mogelijke vervolgstudies minder dieren nodig zijn als gevolg van afweerreacties op het donorweefsel. Vier weken na de implantatie van het scaffold met de eilandjes van Langerhans wordt de functionaliteit van de transplantatie getest met behulp van een glucose tolerantie test. Vier maanden na de implantatie van de eilandjes van Langerhans zullen de dieren worden gedood om histologisch onderzoek te doen naar het percentage vitale eilandjes en de revascularisatie van het scaffold. De DEC is ervan overtuigd dat de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen beschikt om de projectdoelstelling met de gekozen strategie/aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren. De onderzoeksgroep heeft in een voorgaande studie in muizen onderzoek gedaan naar de transplantietechniek met 1 type polymeer in een tweetal locaties; subcutaan en in de buikholte in muizen. De resultaten hiervan waren positief; de muizen die het scaffold hadden gekregen reageerden goed op de glucose tolerantie test, hadden gedurende de 30 dagen van het experiment een normale bloedsuikerspiegel en histologisch onderzoek wees uit dat er een goede revascularisatie was opgetreden.

5. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
- Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
  - Niet-menselijke primaten (10e)
  - Dieren in/uit het wild (10f)
  - Gefokt voor dierproeven (11)
  - Zwerfdieren (10h)
  - Hergebruik (1e lid 2)
  - Huisvesting en verzorging
  - Locatie: instelling vergunninghouder (10g)
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief van de ontvangerdieren wordt ingeschat als matig omdat de inductie van diabetes tot stress en gewichtsverlies kan leiden. Het ongerief van de donordieren wordt ingeschat als terminaal omdat onder terminale anesthesie de eilandjes van Langerhans geïsoleerd zullen worden. Er worden vijf donordieren nodig geacht voor de transplantatie van één ontvangerdier. Daarom zijn 80% van de aangevraagde dieren donor dieren met licht ongerief en 20% van de aangevraagde dieren de ontvangerdieren met matig ongerief. Gezien de ervaringen met dit model in eerdere studies, waarbij geen onverwachte negatieve effecten werden waargenomen, ligt het niet in de lijn der verwachting dat een of meerdere dieren het humane eindpunt zullen bereiken.



7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen vervangen. De complexe endocriene en fysiologische processen die gepaard gaan met diabetes kunnen niet worden nagebootst in een *in vitro* opstelling of met computermodellen. In voorgaande *in vitro* studies hebben de onderzoekers gewerkt aan het optimaliseren van het design en de functionaliteit van de scaffolds. In voorgaande *in vivo* studies hebben de onderzoekers onderzocht welke poreusheid van het scaffold het beste werkt voor een snellere revascularisatie en de functionaliteit van het scaffold. Deze voorgaande *in vitro* en *in vivo* experimenten zullen de kans op waardevolle resultaten vergroten en onnodig proefdiergebruik voorkomen.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de vermindering van dierproeven. Met behulp van een powerberekening is het benodigde aantal dieren vooraf berekend. Men heeft ervoor gekozen immuundeficiënte Nude Rowett ratten in te zetten als ontvangerdieren, zodat voorkomen kan worden dat een afweerreactie optreedt en de geïmplanteerde eilandjes van Langerhans worden afgestoten. Dit zal het aantal benodigde dieren sterk verminderen. De DEC is van mening dat het maximaal aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en proportioneel is ten opzichte van de gekozen strategie en looptijd van het project.
9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten. De ontvanger ratten die model staat voor type I diabetes zijn de immunodeficiënte Nude Rowett ratten; diabetes kan worden geïnduceerd door een injectie met streptozotocin. De donorratten zijn Albino Oxford ratten. De nieuw te testen retroperitoneale locatie zal eerst wordt getest in de Albino Oxford ratten, alvorens deze locatie wordt getoetst in de Nude Rowett ratten die diabetes geïnduceerd krijgen. Om ongerief ten gevolge van de chirurgische ingrepen zoveel mogelijk te beperken zullen adequate anesthesie- en analgesieprotocollen worden toegepast. Het ongerief ten gevolge van de geïnduceerde diabetes wordt verlicht door een insuline implantaat in de dieren aan te brengen waarmee een nauwkeurig te reguleren insulineafgifte bewerkstelligt kan worden. Dit insuline implantaat zal tien dagen na transplantatie van de eilandjes van Langerhans verwijderd worden. De bloedsuikerspiegel van de dieren zal gedurende enkele maanden wekelijks in de gaten gemonitord worden. De operaties met de Rowett Nude ratten zullen in een flowcabinet onder aseptische omstandigheden worden uitgevoerd. Beide polymeren die in deze studie gebruikt zullen worden, worden al gebruikt in klinische studies. Op basis van eerder uitgevoerde *in vitro* en *in vivo* studies is de verwachting dat het ongerief ten gevolge van de geïnduceerde diabetes beperkt zal blijven, omdat revascularisatie van het implantaat en stabilisatie van de bloedsuikerspiegel vrij snel zullen optreden. Wanneer herhaaldelijke bloedafnamen uit de staart noodzakelijk zijn zal een katheter geplaatst worden. De experimenten worden uitgevoerd door onderzoekers die veel ervaring hebben met vergelijkbare experimenten. In dit onderzoek wordt uitsluitend gewerkt met mannelijke dieren. Dit wordt gedaan omdat 1) uit mannelijke

donordieren meer eilandjes van Langerhans verkregen kunnen worden, en 2) om de variatie die veroorzaakt zou worden door de hormonale cyclus van vrouwtjes te vermijden.

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

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

Op grond van de onder C genoemde overwegingen komt de DEC tot de volgende afweging. Het beschreven project heeft als doelstelling de transplantatie van de eilandjes van Langerhans te verbeteren. De uitkomsten van dit onderzoek zullen substantieel bijdragen aan ontwikkelen van een beter scaffold en een optimale transplantatie locatie zodat de transplantatie zo succesvol mogelijk kan verlopen. Daarnaast kan de informatie omtrent de optimale polymeerstructuur van het scaffold en de locatie van dit scaffold in het lichaam worden gebruikt om mogelijk in de toekomst ook lichaamseigen beta-stamcellen te implanteren in type I diabetes patiënten. De DEC is van mening dat het projectvoorstel vanuit wetenschappelijk oogpunt verantwoord is en dat de vertaling van de onderzoeksresultaten naar de mens mogelijk is. De gestelde doeleinden kunnen worden gehaald binnen de gevraagde termijn. De onderzoeksgroep heeft veel ervaring met de beschreven diermodellen. De DEC acht, alles overziend, het belang van dit onderzoek daarom substantieel.

Tegenover dit substantiële belang staat het gegeven dat 80% van de dieren licht ongerief zullen ondervinden (donordieren) en 20% van de dieren matig ongerief zullen ondervinden (ontvangerdieren). De DEC is er van overtuigd dat bij de dierproeven adequaat invulling gegeven zal worden aan de vereisten op het gebied van vervanging, vermindering en verfijning. Het gebruik van de dieren en het daarbij optredende ongerief is onvermijdelijk, wil men de doelstellingen kunnen realiseren.

De DEC is van oordeel dat het hier boven geschetste belang de onvermijdelijke nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren, in de vorm van angst, pijn of stress, rechtvaardigt. Aan de eis dat het belang van de experimenten op dient te wegen tegen het ongerief dat de dieren wordt berokkend, is voldaan.

#### **E. Advies**

1. Advies aan de CCD

- De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
- De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
- De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Twente

[Redacted]

Postbus 217

7500 AE ENSCHEDE



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD110002016498

**Bijlagen**

2

Datum 31 maart 2016

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [Redacted]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 30 maart 2016.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD110002016498. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

**Wacht met de uitvoering van uw project**

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

**Factuur**

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

**Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

### **Gegevens aanvrager**

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 11000  
Naam instelling of organisatie: Universiteit Twente  
Naam portefeuillehouder of  
diens gemachtigde: [REDACTED]  
KvK-nummer: 50130536  
Straat en huisnummer: Drienerlolaan 5  
Postbus: 217  
Postcode en plaats: 7500 AE ENSCHEDE

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]  
Functie: PhD student  
Afdeling: [REDACTED]  
Telefoonnummer: [REDACTED]  
E-mailadres: [REDACTED]

**Over uw aanvraag**

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

**Over uw project**

Geplande startdatum: 1 mei 2016  
Geplande einddatum: 1 mei 2019  
Titel project: Porous thin-film microwell scaffolds for extra hepatic transplantation of islets of Langerhans  
Titel niet-technische samenvatting: Poreuze microwelconstructen voor transplantatie van eilandjes van Langerhans  
Naam DEC: DEC-Utrecht  
Postadres DEC: [REDACTED] Postbus 85500 3508 GA Utrecht  
E-mailadres DEC: dec-utrecht@umcutrecht.nl

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 1.187,-  
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

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

**Ondertekening**

Naam: [REDACTED]  
Functie: [REDACTED]  
Plaats: Enschede  
Datum: 30 maart 2016



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Twente

Postbus 217

7500 AE ENSCHEDE



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD110002016498

**Bijlagen**

2

Datum 31 maart 2016

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 31 maart 2016

Vervaldatum: 30 april 2016

Factuurnummer: 16700498

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD110002016498	€ 1.187,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL41RBOS 056.999.6317 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93144, 2509 AC te 's Gravenhage.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Twente

postbus 217  
7500 AE ENSCHEDE

**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

T 0900-28 000 28 (10 ct /min)

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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD110002016498

**Uw referentie**

**Bijlagen**

1

Datum 2 juni 2016

Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 30 maart 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Porous thin-film microwell scaffolds for extra hepatic transplantation of islets of Langerhans" met aanvraagnummer AVD110002016498. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 17 mei hebben wij u gevraagd de Niet Technische Samenvatting op een aantal punten te herzien. Op 18 mei 2016 heeft u een herziene versie van de Niet technische Samenvatting ingediend.

### **Beslissing**

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). U kunt met uw project "Porous thin-film microwell scaffolds for extra hepatic transplantation of islets of Langerhans" starten. De vergunning wordt afgegeven van 2 juni 2016 tot en met 1 mei 2019. De startdatum wijkt af van uw aanvraag omdat deze in het verleden ligt.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

### **Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-Utrecht gevoegd. Dit advies is opgesteld op 18 maart 2016. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie, nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Dit betreft een project waar geen go/no go momenten zijn voorzien en waarvan het niet waarschijnlijk is dat gedurende de looptijd alternatieve methoden worden ontwikkeld of geaccepteerd. De twee algemene voorwaarden worden dan ook niet aan dit project verbonden. Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.



### **Bezwaar**

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

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

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

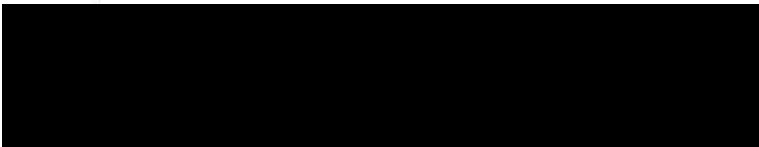
Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige voorziening vragen bij de Voorzieningenrechter van de rechtbank in de woonplaats van de aanvrager. U moet dan wel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

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

### **Meer informatie**

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

De Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:



ir. G. de Peuter  
Algemeen Secretaris

Dit besluit is genomen met inachtneming van het Besluit mandaat, volmacht en machtiging van de Centrale Commissie Dierproeven CCD 2014 zoals de Centrale Commissie Dierproeven heeft vastgesteld op 19 december 2014, ref 2014-04 en is gepubliceerd in de Staatscourant van 2 januari 2015, Nr. 163

### **Bijlagen**

- Vergunning

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



## Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan  
Naam: Universiteit Twente  
Adres: Postbus 217  
Postcode en woonplaats: 7500 AE Enschede  
Deelnemersnummer: 11000

deze projectvergunning voor het tijdvak 2 juni 2016 tot en met 1 mei 2019, voor het project "Porous thin-film microwell scaffolds for extra hepatic transplantation of islets of Langerhans" met aanvraagnummer AVD110002016498, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-Utrecht. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Assistent Professor.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 30 maart 2016
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 30 maart 2016;
  - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 18 mei 2016;
  - c. Advies van Dierexperimentencommissie dd 18 maart 2016, ontvangen op 30 maart 2016;
  - d. Aanvullingen op uw aanvraag ontvangen op 18 mei 2016.

### Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst
Implantation of scaffolds in diabetic rats (receptor)	Ratten ( <i>Rattus norvegicus</i> ) / 108 Naakte Rowett ratten, 24 Albino oxford controle ratten	132	Matig
Islet isolation from Albino Oxford rats (donor group)	Ratten ( <i>Rattus norvegicus</i> ) / Albino Oxford ratten	540	Terminaal

### Voorwaarden

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

Aan deze vergunning zijn geen voorwaarden gesteld.

## **Weergave wet- en regelgeving**

### **Dit project en wijzigingen**

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

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

### **Verzorging**

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

In artikel 9 staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn.

In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.

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

### **Pijnbestrijding en verdoving**

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

**Datum**

2 juni 2016

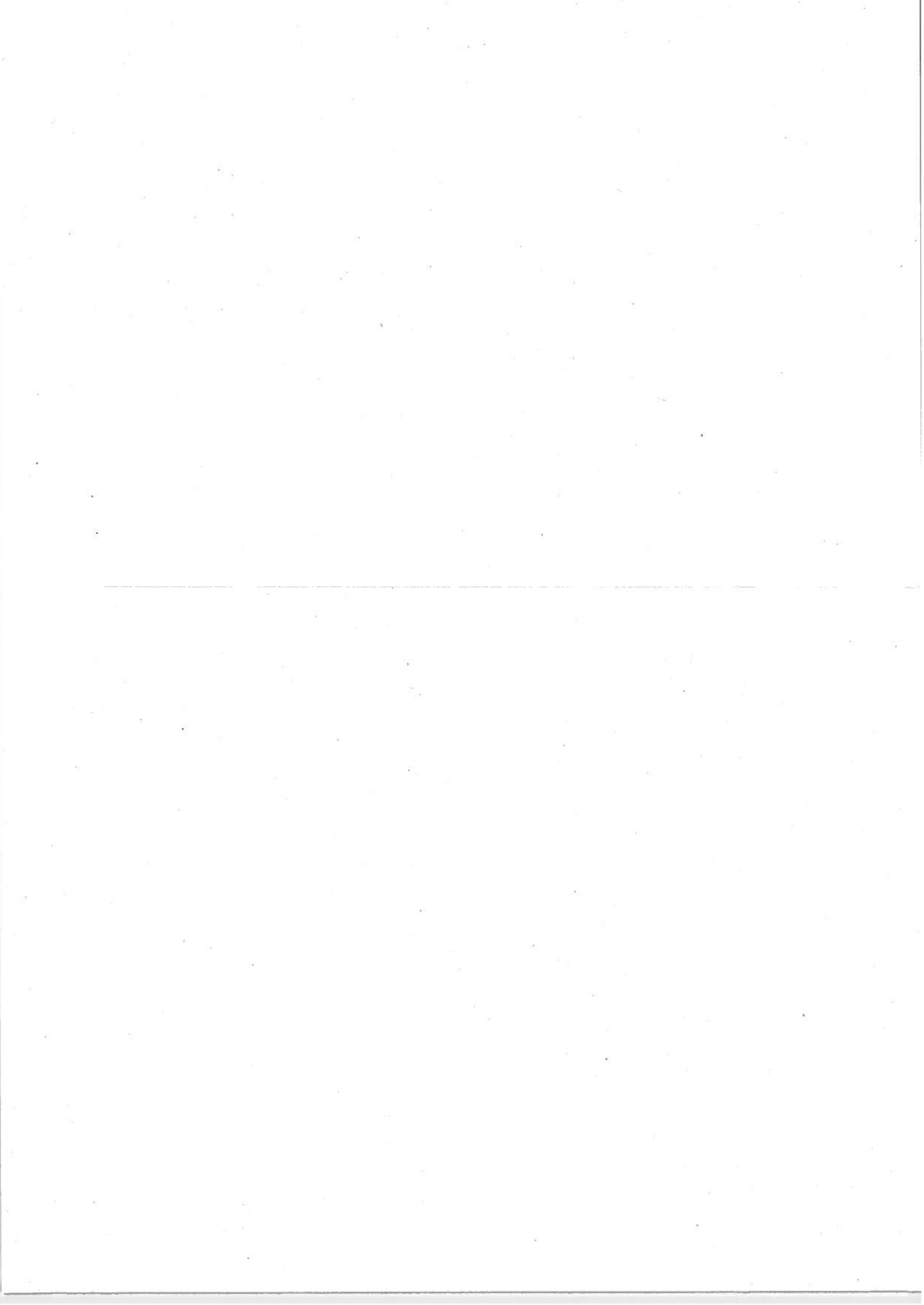
**Onze referentie**Aanvraagnummer  
AVD110002016498

zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.

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

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



Inventaris Wob-verzoek W16-19S									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	<b>NTS2016499</b>								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel				x			x	
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1				x			x	
5	DEC-advies				x		x	x	
6	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
7	Advies CCD		x						x
8	Beschikking en vergunning				x		x	x	

01 APR. 2016



# Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

## 1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in	10300
		<input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen	
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]
		KvK-nummer	4 1 0 5 5 6 2 9
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	Geert Grootplein 10
		Postbus	9101 [Redacted]
		Postcode en plaats	6500HB Nijmegen
		IBAN	NL90ABNA0231209983
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	UMC St Radboud
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[Redacted] <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	[Redacted]
		Afdeling	[Redacted]
		Telefoonnummer	[Redacted]
		E-mailadres	[Redacted]
1.5	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[Redacted] <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.
		Functie	Post-Doctoraal onderzoeker
		Afdeling	[Redacted]
		Telefoonnummer	[Redacted]
		E-mailadres	[Redacted]

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

## 2 Over uw aanvraag

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

## 3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 0 1 . 0 5 . 2 0 1 6
- Einddatum 0 1 . 0 5 . 2 0 2 1
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Klaring van chemisch reactieve nanomedicijnen ter verhoging van de therapeutische ind
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Ontwikkeling van reactieve nanomedicijnen voor effectieve kankertherapie met minder
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC RU DEC
- Postadres Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen
- E-mailadres



## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?  Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 935,00 Lege  
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.  
*Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*
- Via een eenmalige incasso  
 Na ontvangst van de factuur

## 5 Checklist bijlagen

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

## 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 1.6). De ondergetekende verklaart:

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

Naam [REDACTED]

Functie [REDACTED]

Plaats Nijmegen

Datum 3 1 - 0 3 - 2 0 1 6

Handtekening [REDACTED]



### Form Project proposal

- This form should be used to write the project proposal of animal procedures.
- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed
- For more information on the project proposal, see our website([www.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'. | 10300   |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment.  | Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen  |
| 1.3 | Provide the title of the project.  | Klaring van chemisch reactieve nanomedicijnen ter verhoging van de therapeutische index van chemotherapie |

## 2 Categories

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

Een vaak toegepaste behandeling voor kanker is chemotherapie. Hierbij worden medicijnen toegediend die tumorcellen doden of deze remmen in hun groei. Een probleem van chemotherapie is echter dat de medicijnen vaak kleine moleculen zijn, die naast op de plek van de tumor ook in andere delen van het lichaam uit de bloedvaten kunnen treden. Hierdoor worden ook gezonde cellen aangetast en kunnen er ernstige bijwerkingen optreden.

Een mogelijke oplossing voor dit probleem is het verpakken van de chemotherapeutische middelen in nanodragers. De combinatie van de nanodrager en het chemotherapeutisch middel wordt een nanomedicijn genoemd, wat gezien kan worden als medicijnafgiftesysteem. Nanomedicijnen zullen door hun grootte voornamelijk uit de relatief lekke tumorbloedvaten treden en daar hun inhoud vrijgeven. Op deze manier worden bijwerkingen door ongewenste afgifte van de cytotoxische medicijnen elders in het lichaam beperkt.

Een bekend en veel gebruikt voorbeeld van een dergelijk nanomedicijn is Doxil/Caelyx. Bij dit nanomedicijn is het medicijn doxorubicine verpakt in een liposoom, een type nanodrager (zie Abraham 2005, *Methods Enzymol.* 2005;391:71-97). Aan dit nanomedicijn zijn polyethyleen glycol (PEG) ketens bevestigd, welke de circulatietijd en op die manier de ophoping van de nanomedicijnen in de tumor verhogen.

Een nadeel van deze nanomedicijnen is echter dat ze lange tijd in de bloedbaan aanwezig zijn en zich daardoor ook geleidelijk op andere plekken in het lichaam op kunnen hopen. Dit kan toxische bijeffecten met zich meebrengen, zoals ontstekingen aan handen en voeten (hand-voet syndroom) en in de mond (stomatitis). Deze toxische bijeffecten zijn een belangrijke beperkende factor bij hoe vaak, met welke tijdsintervallen en met welke dosis de chemotherapie gegeven kan worden. Daarnaast zijn ze zelfs een belangrijke oorzaak voor het stoppen van de behandeling (zie Charrois et al. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003 Sep;306(3):1058-67.4, Charrois et al. *Biochimica et Biophysica Acta* 1609 (2003) 102– 108, Charrois et al. *Biochimica et Biophysica Acta* 1663 (2004) 167– 177). Charrois et al. hebben in een tumormodel in muizen onderzocht wat geschikte doseringsschema's zouden kunnen zijn voor liposomaal doxorubicine, waarbij voldoende therapeutische effectiviteit bereikt wordt met beperkte bijwerkingen. Ze kwamen tot de conclusie dat er een optimum bestaat in hoe vaak en met welke dosis liposomaal doxorubicine toegediend kan worden, om voldoende therapeutische effectiviteit te hebben zonder te sterke bijwerkingen. De bijwerkingen beperken dus nog altijd de toelaatbare dosis en frequentie van de chemotherapie en daarmee het klinisch resultaat van de behandeling. Daarom is het erg belangrijk om toxiciteitsproblemen als hand-voet syndroom en stomatitis te verminderen. De behandelingsmethode voor deze bijwerkingen is vaak primair het onderbreken of stoppen van de behandeling of enkel gericht op symptoombestrijding. Het onderbreken van de behandeling heeft echter negatieve gevolgen voor het klinisch resultaat. Daarom is er een

sterke behoefte aan een methode om de toxiciteitsproblemen te verminderen en de therapeutische index te verhogen. Relevante artikelen van Charrois et al zijn: Charrois et al. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003 Sep;306(3):1058-67.4), Charrois et al. *Biochimica et Biophysica Acta* 1609 (2003) 102– 108, Charrois et al. *Biochimica et Biophysica Acta* 1663 (2004) 167– 177.

Dit project is erop gericht om de gerapporteerde toxiciteitsproblemen met deze lang circulerende nanomedicijnen te verminderen. Als oplossing voor dit probleem ontwikkelen we in dit project nanomedicijnen, die nadat ze zich opgehoopt hebben in de tumor (tijdstip wordt bepaald door biodistributie met radiogelabeld nanomedicijn), uit de bloedbaan geklaard kunnen worden met behulp van een klaringsmiddel. Dit klaringsmiddel, op basis van biocompatibele en bioafbreekbare particles van ca 500 nm, kan een verbinding aangaan met het nanomedicijn en dit afvoeren naar de lever, middels filtering door de lever (door de grootte van deze agents). Het is bekend dat dit soort particles ophopen in de lever en de milt en daar dan in enkele dagen worden afgebroken en afgevoerd. Aangezien het klaringsmiddel een diameter heeft van ca 500 nm, en de liposomen van ca 100 nm zullen ze tezamen dus niet zo groot worden dat ze vastlopen in de haarvaten. De hypothese van dit onderzoek is dat het nanomedicijn na maximale ophoping in de tumor efficiënt uit de bloedbaan geklaard kan worden door middel van een klaringsmiddel. Op deze wijze kan ongewenste afgifte van chemotherapie in overige delen van het lichaam beperkt worden, terwijl de concentratie van chemotherapie in de tumor minimaal beïnvloed wordt.

Voor klaring van de nanomedicijnen maken we gebruik van een modificatie van een bepaalde organische reactie, de inverse-electron demand Diels-Alder (invDA) ligatie. Deze reactie is in eerder onderzoek al met succes gebruikt voor het binden van een radioactieve probe aan een tumor-gebonden antilichaam in een "pre-targeting radioimmunoimaging en -therapy" opzet (zie R. Rossin, P. Renart Verkerk, S. M. van den Bosch, R.C.M. Vulders, I.Verel, J. Lub, and M.S. Robillard, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010, 49, 3375-3378). Daarnaast wordt deze reactie ook gebruikt in onderzoek naar chemisch activeerbare antilichaam-drug conjugaten, waarin ook het verhogen van de therapeutische effectiviteit en verminderen van bijwerkingen centraal staat.

In het huidige onderzoek willen deze chemische reactie gebruiken om in vivo een chemische verbinding tussen het klaringsmiddel en de nanomedicijnen te bewerkstelligen. Hiertoe modificeren we de liposomen met trans-cycloocteen (TCO). Het klaringsmiddel wordt gemodificeerd met een tetrazine derivaat. De chemische verbinding wordt bewerkstelligd door een covalente reactie tussen het liposoom-gebonden TCO en het klaringsmiddel-gebonden tetrazine derivaat. Hierdoor kan het nanomedicijn uit de bloedbaan verwijderd worden, en de ophoping in bijvoorbeeld handen en voeten beperkt worden.

Initiële ontwikkeling van klaringsmiddelen is al uitgevoerd in voorgaande onderzoeken. Het is al aangetoond dat het gebruik van klaringsmiddelen kan leiden tot een >100-voud afname in TCO-antilichamen in het bloed (zie Rossin et al. *J Nucl Med* 2013; 54:1989–1995). Een vergelijkbaar effect met betrekking tot de klaring van liposomen zou erg voordelig zijn om de neventoxiciteit te beperken.

### 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?

Het doel van dit project is om te bepalen of nanomedicijntherapie gecombineerd met toediening van een klaringsmiddel gebruikt kan worden om bijwerkingen van chemotherapie te verminderen, terwijl de therapeutische effectiviteit minimaal beïnvloed wordt. De hoofdvraagstelling is of de concentratie nanomedicijn/chemotherapie in de overige delen van het lichaam verminderd kan worden, terwijl de concentratie in de tumor niet of minimaal beïnvloed wordt. Hiertoe worden nieuwe nanomedicijn-constructen ontwikkeld en in vivo getest en wordt de effectiviteit ervan gevalideerd.

Het project wordt haalbaar geacht binnen de looptijd van het project, omdat alle benodigde expertise en faciliteiten aanwezig zijn: Dit project is een samenwerking tussen onder andere [REDACTED]. Binnen de [REDACTED] is er veel ervaring met het maken van vergelijkbare nanomedicijnen en bloedkinetiek/biodistributie/kankertherapie studies zoals beschreven in dit projectvoorstel. [REDACTED] Ontwikkeling van de bouwstenen voor de TCO-nanomedicijnen en klaringsmiddelen wordt uitgevoerd door [REDACTED], [REDACTED], welke geruime specialistische ervaring hierin hebben. Alle faciliteiten voor het uitvoeren van het onderzoek zijn aanwezig, alsmede biotechnische ondersteuning.

### 3.3 Relevance

---

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

---

De lange circulatietijd van nanomedicijnen kan leiden tot ophoping van chemotherapeutische middelen in gezonde delen van het lichaam. Dit kan toxische bijeffecten met zich meebrengen, zoals ontstekingen aan handen en voeten (hand-voet syndroom) en in de mond (mucositis). Het is beschreven dat het hand-voet syndroom en mucositis de meest voorkomende dosis-limiterende toxiciteitsproblemen zijn, welke optreden in tot 50% van de patiënten. Alhoewel deze symptomen niet direct levensbedreigend zijn, kunnen ze wel de kwaliteit van leven verslechteren. Daarnaast zijn deze symptomen de belangrijkste oorzaak voor het verminderen van de behandelingsdosis en voor het afbreken van de behandeling. Wanneer nog in bloedbaan aanwezige chemotherapeutische nanomedicijnen dus weggevangen kunnen worden nadat een maximale concentratie in de tumor is bereikt, kunnen de bijwerkingen verminderd worden, terwijl de effectiviteit van de therapie onveranderd blijft of mogelijk zelfs verhoogd kan worden.

De uitkomsten van dit project zullen aangeven hoe de nanomedicijntherapie in combinatie met het klaringsmiddel op een optimale manier gegeven kan worden, of dit op een veilige manier gedaan kan worden, en of inderdaad effectiviteit van de therapie onveranderd blijft of zelfs verhoogd kan worden. Het op deze manier verhogen van de therapeutische index van chemotherapeutische nanomedicijnen zal resulteren in een beter klinisch resultaat van dergelijke behandelingen. Er wordt verwacht dat de uitkomsten van dit project niet alleen bruikbaar zijn voor verbetering van Doxil/Caelyx therapie, maar ook vertaalbaar zijn naar andere typen chemotherapie met vergelijkbare bijwerkingen.

Naast dit maatschappelijk belang heeft het behalen van de doelstelling ook een wetenschappelijk belang; het onderzoek zal inzicht geven in de ontwikkeling en in vivo toepassing van reactieve nanomedicijnen en klaringsmiddelen en de potentie van deze middelen voor het verminderen van bijwerkingen van chemotherapeutische nanomedicijnen demonstreren.

### 3.4 Research Strategy

---

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

---

Om het hoofddoel te bewerkstelligen wordt de volgende strategie gevolgd:

De chemisch reactieve (actief te klaren) nanomedicijnen en klaringsmiddelen worden gesynthetiseerd, gekarakteriseerd en verder ontwikkeld. Ze worden uitgebreid in vitro gekarakteriseerd en getest, om zo de reactiviteit en stabiliteit vast te stellen. Voor deze experimenten zijn geen proefdieren benodigd. Op basis van deze experimenten worden alleen de geschikte constructen geselecteerd voor vervolgentoetsen. Na deze in vitro tests worden de bloedkinetiek (en biodistributie aan het eind) van de geselecteerde nanomedicijnen en klaringsmiddelen bepaald in

niet-tumordragende muizen. Daarnaast zal de in vivo stabiliteit van de nanomedicijn-constructen worden bepaald, waarbij het van belang is dat de TCO voldoende stabiel is om in vivo te kunnen reageren met het klaringsmiddel.

In een volgende stap zal de tumor targeting en bloedklaring van de meest veelbelovende constructen uit het vorige experiment onderzocht worden. Daarnaast onderzoeken we in deze stap de ophoping van de nanomedicijnen en doxorubicine in overige weefsels en organen. Op basis van de resultaten van deze proef worden geschikte nanomedicijnconstructen geselecteerd voor een studie waarin gekeken wordt naar therapeutische effectiviteit.

In deze stap wordt de therapeutische activiteit van de nanomedicijnconstructen onderzocht. We onderzoeken dit door voor de beste nanomedicijn+klaringsmiddel combinatie (en de nodige controlegroepen) de remming van de tumorgroei te volgen.

Tot slot onderzoeken we met behulp van histologie of er een mogelijk effect is van klaring van de nanomedicijnen naar de lever en eventuele ophoping in andere organen op de status van het weefsel.

Op basis van deze set experimenten kan vastgesteld worden op welke wijze en met welke constructen efficiënte en optimale klaring van het nanomedicijn geïnduceerd kan worden, waardoor bijwerkingen beperkt worden met minimale invloed op de therapeutische effectiviteit.

---

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

De hoofdlijnen van het onderzoek kunnen opgedeeld worden in de volgende experimenten:

##### Experiment 1:

Het bepalen van de bloedklaring en stabiliteit van de nanomedicijnconstructen, de tetrazine-klaringsmiddelen, en de combinatie van deze twee componenten. Omdat de nadruk hierbij ligt op bloedkinetiek zal dit experiment gedaan worden in niet-tumordragende muizen. Nieuw ontwikkelde nanomedicijnen en klaringsmiddelen worden onderzocht, waarvan nog onbekend is welk farmacokinetisch gedrag ze zullen vertonen, en hoe effectief de klaring van het nanomedicijn in vivo zal plaatsvinden. Dit kan alleen met een bloedkinetiek/biodistributie experiment getoetst worden.

Voor dit experiment wordt het type dierproef 1, 'Testen van nanomedicijnen in muizen', ingezet.

##### Experiment 2:

Het bepalen van de bloedklaring en ophoping van de nanomedicijnconstructen in tumor en organen, en vergelijking met combinatie met klaring door middel van het tetrazine-klaringsmiddel construct. Hier proberen we de ophoping van de nanomedicijnen in de tumor ten opzichte van de ongewenste accumulatie in andere weefsels te optimaliseren. Bij experiment 2 zal de nadruk meer liggen op de vergelijking tussen tumor- en achtergrondaccumulatie van de nanomedicijnen, terwijl bij experiment 1 de nadruk meer lag op het bepalen van hoe de meest efficiënte klaring van de nanomedicijnen uit het bloed geïnduceerd kan worden. In experiment 2 zal dus gebruik gemaakt worden van tumordragende muizen.

Voor dit experiment wordt het type dierproef 1, 'Testen van nanomedicijnen in muizen', ingezet.

##### Experiment 3:

Het onderzoeken van het therapeutisch effect van de nanomedicijnen, en vergelijking met combinatie met klaring door middel van het tetrazine-klaringsmiddel. Van de optimale nanomedicijn+klaringsmiddel combinatie zal in dit experiment primair de therapeutische effectiviteit worden getest door de remming van de tumorgroei te volgen. Er worden verschillende doseringen getest en daarnaast wordt deze therapie vergeleken met therapie zonder toevoeging van het klaringsmiddel, alsmede met de nodige controles (zoals placebobehandeling).

Voor dit experiment wordt het type dierproef 1, 'Testen van nanomedicijnen in muizen', ingezet.

##### Experiment 4:

Het histologisch onderzoeken van de mogelijke effecten van de nanomedicijntherapie (in combinatie met het klaringsmiddel) op de status van het weefsel, bijvoorbeeld de organen waar het middel naar wordt geklaard (lever en milt). Voor dezelfde groepen als beschreven voor experiment 3 wordt onderzocht of de klaring naar de lever en milt veilig kan worden geïnduceerd, zonder daarbij te sterke nadelige effecten op de status van deze weefsels te induceren.

Voor dit experiment wordt het type dierproef 1, 'Testen van nanomedicijnen in muizen', ingezet.

---

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

---

In de eerste fase van het onderzoek worden de chemisch reactieve (actief te klaren) nanomedicijnen en klaringsmiddelen gesynthetiseerd, gekarakteriseerd en verder ontwikkeld. Ze worden uitgebreid in vitro gekarakteriseerd en getest, om zo de reactiviteit en stabiliteit in buffer en serum vast te stellen. Na deze in vitro tests, waarvoor geen proefdieren benodigd zijn, selecteren we alleen de geschikte nanomedicijnen en klaringsmiddelen voor de dierexperimenten. Als de nanomedicijnen niet stabiel genoeg zijn of als de TCO onvoldoende reactief is met het tetrazine derivaat worden de nanomedicijnen niet geselecteerd voor vervolggexperimenten. Alleen de meest veelbelovende constructen zullen dus in een dierexperiment getest worden. Mbt het nanomedicijn zullen we doxorubicine gevulde liposomen bestuderen. We zullen starten met een formulatie die erg lijkt op Doxil en de TCO belading variëren. Afhankelijk van de resultaten is het mogelijk dat we de lipide formulatie nog iets aanpassen. Mbt het klaringsmiddel, zullen we werken met biocompatibele en bioafbreekbare particles beladen met tetrazine groepen. We zullen starten met polymelkzuur-gebaseerde particles van 500 nm. De grootte van deze particles en de tetrazine modificatiegraad wordt mogelijk gevarieerd.

Na deze in vitro tests zullen de volgende dierexperimenten gedaan worden:

#### Experiment 1: bloedkinetiek en biodistributie in muizen

In dit experiment wordt van de geschikt gebleken nanomedicijnen en klaringsmiddelen de bloedkinetiek (en biodistributie aan het eind) bepaald in niet-tumordragende muizen. Daarnaast zal de in vivo stabiliteit van de nanomedicijn-constructen worden bepaald door bloedmonsters ex vivo te laten reageren met tetrazine. De nanomedicijnen verschillen in samenstelling en TCO-modificatiegraad. De TCO-modificatiegraad heeft mogelijk invloed op hoe efficiënt de nanomedicijnen geklaard kunnen worden door middel van een klaringsmiddel. De samenstelling kan daarnaast invloed hebben op de bloedkinetiek. Er wordt begonnen met een samenstelling die vergelijkbaar is met die van Doxil/Caelyx (maar dan met eventuele TCO-modificatie) en indien nodig wordt deze aangepast.

Op basis van deze experimenten zullen alleen de veelbelovende constructen geselecteerd worden voor vervolggexperimenten, wat waarschijnlijk een sub-selectie zal zijn van de geteste nanomedicijn-constructen. Belangrijke criteria hierbij zijn dat de nanomedicijnen zonder toediening van het klaringsmiddel voldoende lang in de circulatie moeten blijven, dat de nanomedicijnen die TCO bevatten na toediening van het klaringsmiddel voldoende snel uit de bloedbaan geklaard moeten worden en dat de TCO van deze nanomedicijnen voldoende stabiel moet zijn in vivo. Omdat in dit experiment de nadruk ligt op de bloedkinetiek en klaring van de nanomedicijnen zijn er voor dit experiment geen tumor-dragende muizen nodig. Mogelijke toxiciteit van de nanomedicijnen kan in dit experiment nog niet onderzocht worden, omdat de muizen relatief kort na toediening van de nanomedicijnen (en eventueel het klaringsmiddel) worden opgeofferd, waarna de organen uitgenomen worden om de concentratie van de chemotherapeutische nanomedicijnen in verschillende organen en weefsels te bepalen. De organen zijn dus niet beschikbaar voor de histologische analyses om mogelijke toxiciteit te onderzoeken. Om mogelijke toxiciteitseffecten te onderzoeken zou het nodig zijn om de dieren tot langere tijd na toediening van de nanomedicijnen (en eventueel het klaringsmiddel) te laten leven. Op die manier kan namelijk het effect van opbouw van een therapeutische dosis nanomedicijn in de verschillende organen gevolgd worden, waardoor er mogelijk op een later moment toxiciteitsproblemen op zouden kunnen treden. Ook kan op die manier bekeken worden of bijvoorbeeld de organen waar het nanomedicijn naar geklaard wordt zich kunnen



herstellen na afvoer van de nanomedicijnen naar deze organen (indien daardoor schade aan deze weefsels zou ontstaan). Daarnaast kunnen eventuele toxiciteitseffecten dosisafhankelijk zijn en is de optimale therapeutische dosis mogelijk anders dan de dosis die gebruikt wordt in experiment 1, waarin een therapeutisch effect nog niet van belang is.

In experiment 2 en 3 wordt vervolgens gebruik gemaakt van tumordragende muizen, waarbij er is gekozen voor het 4T1 tumormodel. Dit tumormodel wordt gegroeid in de borstklier van vrouwelijke muizen. Charrois et al. hebben dit tumormodel ook gebruikt in hun onderzoek naar liposomaal doxorubicine. Hierbij stond het bepalen van de biodistributie en bloedkinetiek van doxorubicine dat verpakt was in verschillende liposomale formulaties centraal. Het doel van dat onderzoek was het bepalen van optimale doseringsschema's en het effect van de grootte en medicijnafgiftesnelheid van de liposomen op de therapeutische effectiviteit en toxische bijeffecten. Ze hebben in dit onderzoek waargenomen dat op ongeveer 24 uur na injectie van de nanomedicijnen de doxorubicineconcentratie in de tumor maximaal was, terwijl pas op een later moment een maximale doxorubicineconcentratie in de poten en huid van de muizen werd waargenomen. Het moment waarop de concentratie van doxorubicine/nanomedicijn in de tumor maximaal is, maar in de poten en huid nog niet, is ideaal voor toediening van het klaringsmiddel. Daarom lijkt dit tumormodel ook zeer geschikt voor dit project. Daarnaast is dit tumormodel een relevant model voor borstkanker, wat een van de kankertypes is waarbij de therapie met bijvoorbeeld Doxil/Caelyx liposomen klinisch toegepast wordt.

Van andere tumortypes is grotendeels onbekend wat de farmacokinetiek van de nanomedicijnen en verdeling over tumor en andere organen/weefsels zouden zijn, omdat dit in minder detail is uitgezocht. Het is dus ook onbekend of deze tumormodellen geschikt zouden zijn om de nanomedicijn+klaringsmiddel therapie mee te testen. Dit zou eerst uitgezocht moeten worden in aparte dierexperimenten, wat niet gewenst is.

#### Experiment 2: tumortargeting en biodistributie in tumordragende muizen

In een volgende stap zullen de ophoping van de chemotherapeutische nanomedicijnen in de tumor, organen en overige weefsels onderzocht worden. Voor dit experiment worden op basis van het vorige experiment alleen de geschikte constructen geselecteerd. Er wordt onderzocht wanneer de hoeveelheid nanomedicijn in de tumor maximaal is en wanneer dit in overige weefsels en organen het geval is, optioneel met toediening van het klaringsmiddel. Op deze manier krijgen we inzicht in de verdeling van de nanomedicijnen in tumor en overige weefsels in de tijd en hoe dit (positief) beïnvloed kan worden door toediening van een klaringsmiddel. Op basis van deze resultaten zullen weer alleen de geschikte, meest veelbelovende nanomedicijnen geselecteerd worden voor vervolggexperimenten. Als de ophoping van de nanomedicijnen in de tumor onvoldoende is of als de reactiesnelheid met het klaringsmiddel te langzaam is, zullen deze constructen niet in experiment 3 gebruikt worden. Onvoldoende ophoping in de tumor zal namelijk automatisch leiden tot onvoldoende therapeutische effectiviteit en een te langzame reactie met het klaringsmiddel zal resulteren in een te hoge accumulatie van het nanomedicijn in bijvoorbeeld gezonde weefsels. Daarmee zou de therapeutische index van het met TCO-gemodificeerde nanomedicijn onvoldoende verbeterd zijn ten opzichte van het nanomedicijn zonder TCO-modificatie.

#### Experiment 3: nanomedicijntherapie in tumordragende muizen

Vervolgens wordt in experiment 3 het therapeutisch effect van de nanomedicijnen onderzocht, waarbij ook de juiste dosering bepaald wordt. Op basis van de resultaten van experiment 2 zal de optimale nanomedicijn+klaringsmiddel combinatie geselecteerd worden en de therapeutische effectiviteit zal worden getest door de remming van de tumorgroei te volgen. De gemeten tumorgroottes zullen verwerkt worden tot tumorgroei-curves. Dé combinatie wordt in maximaal 3 doseringen getest, waarbij voor elke dosering het nanomedicijn met of zonder TCO-modificatie en met of zonder inspuiten van het klaringsmiddel getest wordt. Daarnaast worden de volgende controlegroepen getest: een groep die placebobehandeling krijgt en een groep die alleen het klaringsmiddel toegediend krijgt. Eventuele toxiciteitseffecten bij deze therapeutische dosis worden binnen experiment 3 geëvalueerd aan de hand van het gewicht van de dieren en bloedwaarden in afgenomen bloedsamples.

Er wordt dus gekeken naar remming van de tumorgroei en toxiciteit. Voor de nanomedicijntherapie in combinatie met toediening van het klaringsmiddel geldt dat de remming van de tumorgroei efficiënt moet zijn en eventuele toxische effecten beperkt moeten blijven.

#### Experiment 4: histologische evaluatie van de veiligheid van nanomedicijnklaring in muizen

In een laatste fase van het project wordt in experiment 4 de veiligheid van de therapie onderzocht. Dezelfde therapie zal gegeven worden als in experiment 3, maar nu zal met niet-tumordragende muizen gewerkt worden. Overeenkomstig met experiment 3 worden maximaal 3 doseringen getest, waarbij voor elke dosering het nanomedicijn met of zonder TCO-modificatie en met of zonder inspuiten van het klaringsmiddel getest wordt. Daarnaast worden de volgende controlegroepen getest: een groep die placebobehandeling krijgt en een groep die alleen het klaringsmiddel toegediend krijgt. Met dit experiment kan vastgesteld worden of klaring van de nanomedicijnen veilig is en geen schadelijke effecten heeft voor de verschillende organen, zoals bijvoorbeeld de lever en milt, waar het nanomedicijn naar geklaard wordt. Afvoer van de nanomedicijnen naar de lever en eventuele ophoping in andere organen zou namelijk voor eventuele schadelijke effecten (zoals toxiciteit) op het weefsel kunnen zorgen. Dit dient op verschillende tijdstippen na start van de therapie getest te worden, omdat er enerzijds sprake kan zijn van opbouw van dosis in bepaalde organen en weefsels over tijd en anderzijds omdat organen en weefsels zich in de tijd zouden kunnen herstellen na mogelijk geïnduceerde schade door de nanomedicijnen.

Het onderzoeken van mogelijke schade aan organen en weefsels door toediening van het nanomedicijn kan niet in experiment 3 onderzocht worden, omdat in dat experiment de therapeutische effectiviteit longitudinaal gevolgd wordt. De dieren kunnen dus niet voortijdig opgeofferd worden en de weefsels en organen van deze dieren zijn dus niet beschikbaar voor histologische analyses. Wel kunnen in experiment 3 eventuele toxiciteitseffecten al geëvalueerd worden aan de hand van het gewicht van de dieren en bloedwaarden in afgenomen bloedproefjes.

Omdat we in experiment 4 primair geïnteresseerd zijn in de organen waarnaar de nanomedicijnen geklaard worden en niet in een therapeutisch effect (dit is al bepaald bij experiment 3), wordt gebruik gemaakt van dieren zonder tumor.

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	Testen van nanomedicijnen in muizen

## 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'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number 1	Type of animal procedure Testen van nanomedicijnen in muizen

## 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.

---

Binnen dierproef 1 zullen 4 experimenten uitgevoerd worden, waarbij de experimentele aanpak en uitkomstparameters afhankelijk zijn van het experiment:

- Experiment 1: bloedkinetiek en biodistributie in muizen
- Experiment 2: tumortargeting en biodistributie in tumordragende muizen
- Experiment 3: nanomedicijntherapie in tumordragende muizen
- Experiment 4: histologische evaluatie van de veiligheid van nanomedicijnklaring in muizen

#### Experiment 1: bloedkinetiek en biodistributie in muizen

In experiment 1 staat de bepaling van de bloedklaring en TCO-stabiliteit van de nanomedicijnconstructen centraal, optioneel in combinatie met klaring door middel van een tetrazine-klaringsmiddel construct. Verschillende nanomedicijnen, variërend in samenstelling en TCO-modificatiegraad zullen getest worden op hun geschiktheid voor efficiënte klaring uit het bloed. Er zullen muizen zonder tumor gebruikt worden, omdat we in dit experiment primair geïnteresseerd zijn in de bloedkinetiek en tumortargeting in dit experiment nog niet relevant is.

Er zal gekeken worden naar de bloedklaring (en biodistributie aan het eind) van de verschillende (geradiolabelde) constructen. Daarnaast zal de in vivo stabiliteit van de TCO op de nanomedicijnconstructen worden bepaald door bloedmonsters te laten reageren met tetrazine ex vivo. De constructen met een geschikte bloedkinetiek, biodistributie en in vivo stabiliteit zullen in de vervolgentexperimenten worden gebruikt. De radioactiviteit van de gelabelde nanomedicijnen/klaringsmiddelen wordt gemeten in bloed, urine en organen om de biodistributie te bepalen. Het chemotherapeutisch middel dat in het nanomedicijn zat wordt ook geëxtraheerd uit het weefsel. Op het overige deel van het weefsel kan histologische analyse uitgevoerd worden.

Ter verduidelijking en aanvulling van bovenstaande, we willen in dit experiment kijken naar de klaring van het intacte nanomedicijn (liposoom + doxorubicine), en dat doen we door te kijken naar het radiolabel. Daarnaast zullen we ook kijken naar de hoeveelheid vrije doxorubicine in bepaalde weefsels dmv extractie. Mbt de stabiliteit, het gaat ons niet om de stabiliteit van het nanomedicijn als geheel, want die wordt al in vitro getest. Het gaat ons om de stabiliteit van de TCO tag op het nanomedicijn, want daarvan is bekend dat deze in verloop van tijd in circulatie in muizen langzaam wordt gedeactiveerd. Dit kunnen we goed volgen door samples ex vivo te laten reageren met een kleine excess van tetrazine.

#### Experiment 2: tumor targeting en biodistributie in tumordragende muizen

Alleen de geschikte constructen uit experiment 1 zullen geselecteerd worden voor experiment 2, wat waarschijnlijk een sub-selectie zal zijn van de geteste nanomedicijnconstructen. In experiment 2 zal de tumortargeting en bloedklaring van deze meest veelbelovende constructen onderzocht worden. Daarnaast onderzoeken we in dit experiment de ophoping van de nanomedicijnen en doxorubicine in overige organen op verschillende tijdstippen na injectie. Op deze manier krijgen we inzicht in de verdeling van de nanomedicijnen in tumor en overige weefsels in de tijd en hoe dit positief beïnvloed kan worden door toediening van een klaringsmiddel. Op basis van deze resultaten worden geschikte nanomedicijnconstructen geselecteerd voor experiment 3. Als de tumortargeting van de nanomedicijnen onvoldoende is ten opzichte van de ophoping in overige delen van het lichaam zullen de constructen niet in experiment 3 gebruikt worden.

We zijn primair geïnteresseerd in de concentratie van de verschillende componenten (nanomedicijnen, het eventuele klaringsmiddel en het chemotherapeutische middel dat in het nanomedicijn zit) in de tumor, organen, overige weefsels en het bloed. De radioactiviteit van de gelabelde nanomedicijnen/klaringsmiddelen wordt dus gemeten in tumor, organen, bloed en urine om de biodistributie te bepalen. Het chemotherapeutisch middel dat in het nanomedicijn zat wordt ook geëxtraheerd uit het weefsel. Op het overige deel van het weefsel kan histologische analyse uitgevoerd worden. Op verschillende tijdstippen kunnen ook bloedsamples genomen worden om de concentraties in het bloed te bepalen. Voor experiment 2 en 3 is er gekozen voor het 4T1 tumormodel. Dit tumormodel wordt gegroeid in de borstklier van vrouwelijke muizen. Charrois et al. hebben dit tumormodel ook gebruikt in hun onderzoek naar liposomaal doxorubicine. Hierbij stond het bepalen van de biodistributie en bloedkinetiek van doxorubicine dat verpakt was in verschillende liposomale formulaties centraal. Het doel van dat onderzoek was het bepalen van optimale doseringsschema's en het effect van de grootte en medicijnafgiftesnelheid van de liposomen op de therapeutische effectiviteit en toxische bijeffecten. Ze hebben in dit onderzoek waargenomen dat op ongeveer 24 uur na injectie van de nanomedicijnen de doxorubicineconcentratie in de tumor maximaal was, terwijl pas op een later moment een maximale doxorubicineconcentratie in de poten en huid van de muizen werd waargenomen. Het moment waarop de concentratie van doxorubicine/nanomedicijn in de tumor maximaal is, maar in de poten en huid nog niet, is ideaal voor toediening van het klaringsmiddel. Daarom lijkt dit tumormodel ook zeer geschikt voor dit project. Daarnaast is dit tumormodel een relevant model voor borstkanker, wat een van de kankertypes is waarbij de therapie met bijvoorbeeld Doxil/Caelyx liposomen klinisch toegepast wordt.

#### Experiment 3: nanomedicijntherapie in tumordragende muizen

Voor de optimale nanomedicijn+klaringsmiddel combinatie zal in dit experiment de therapeutische effectiviteit worden getest door de remming van de tumorgroei te volgen. Dé combinatie wordt in maximaal 3 doseringen getest, waarbij voor elke dosering het nanomedicijn met of zonder TCO-modificatie en met of zonder inspuiten van het klaringsmiddel getest wordt. Daarnaast worden de volgende controlegroepen getest: een groep die placebobehandeling krijgt en een groep die alleen het klaringsmiddel toegediend krijgt.

In experiment 3 staat de therapeutische effectiviteit centraal, wat vastgesteld wordt door de tumorgrootte over tijd te meten. Deze informatie zal gebruikt worden om tumorgroei-curves te maken. Eventuele toxiciteitseffecten binnen experiment 3 zullen geëvalueerd worden aan de hand van het gewicht van de dieren en bloedwaarden in afgenomen bloedsamples.

Eventuele toxiciteitseffecten die niet op basis van deze gegevens vast te stellen zijn worden in experiment 4 onderzocht. Hierbij gaat het om eventuele schade aan de verschillende weefsels en organen, met name de organen waar de nanomedicijnen naar geklaard worden.

#### Experiment 4: histologische evaluatie van de veiligheid van nanomedicijnklaring in muizen

Met dit experiment kan vastgesteld worden of klaring van de nanomedicijnen veilig is en geen schadelijke effecten heeft voor de verschillende organen, zoals bijvoorbeeld de lever en milt, waar het nanomedicijn naar geklaard wordt. Afvoer van de nanomedicijnen naar de lever en eventuele ophoping in andere organen zou namelijk voor eventuele schadelijke effecten (zoals toxiciteit) op het weefsel kunnen zorgen.

In dit experiment zal dezelfde therapie gegeven worden als in experiment 3, maar zal nu met niet-tumordragende muizen gewerkt worden.

Overeenkomstig met experiment 3 worden maximaal 3 doseringen getest, waarbij voor elke dosering het nanomedicijn met of zonder TCO-modificatie en met of zonder inspuiten van het klaringsmiddel getest wordt. Daarnaast worden de volgende controlegroepen getest: een groep die placebobehandeling krijgt en een groep die alleen het klaringsmiddel toegediend krijgt.

In experiment 4 zal de nadruk liggen op histologische analyses van het weefsel, om vast te stellen of klaring van de nanomedicijnen veilig is en geen schadelijke effecten heeft voor de verschillende organen, zoals de lever en milt (waar het nanomedicijn naar geklaard wordt). Afvoer van de nanomedicijnen naar de lever en eventuele ophoping in andere organen zou namelijk voor eventuele schade aan het weefsel kunnen zorgen. Dit dient op verschillende tijdstippen na start van de therapie getest te worden, omdat er enerzijds sprake kan zijn van opbouw van dosis in bepaalde

organen en weefsels in de tijd en anderzijds omdat organen en weefsels zich in de tijd zouden kunnen herstellen na mogelijk geïnduceerde schade door de nanomedicijnen.

Dit onderzoek kan niet uitgevoerd worden op dezelfde dieren als in experiment 3, aangezien bij die dieren het therapeutisch effect longitudinaal gevolgd zal worden en er dus geen weefsels beschikbaar zullen zijn op eerdere tijdstippen na start van de therapie. Omdat we hier primair geïnteresseerd zijn in de organen waarnaar de nanomedicijnen geklaard worden en niet in een therapeutisch effect (dit is al bepaald bij experiment 3), wordt gebruik gemaakt van dieren zonder tumor.

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

---

Hieronder wordt per experiment de beoogde behandeling en onderbouwing van de gekozen aanpak gegeven:

Experiment 1: bloedkinetiek en biodistributie in muizen

Muizen worden via de staartvene geïnjecteerd (wakker) met de nanomedicijnconstructen (met daarin het chemotherapeutisch middel), mogelijk gevolgd door maximaal twee injecties met klaringmiddel. Er zullen volgens de NC3Rs richtlijnen in de loop der tijd maximaal acht bloedmonsters genomen worden (wat gewenst is om het effect van het klaringmiddel goed te kunnen volgen) en geanalyseerd worden (binnen een periode van een week). Na maximaal een week worden de dieren onder anesthesie gebracht, wordt eventueel een laatste bloedmonster genomen via hartpunctie en worden de dieren geëuthanaseerd onder adequate anesthesie. Hierna wordt met behulp van monsters van bloed, urine en organen de biodistributie van het nanomedicijn bepaald. Na euthanasie kan een urinemonster worden genomen en worden een reeks organen uitgenomen.

Experiment 2: tumortargeting en biodistributie in tumordragende muizen

Tumorgroei dmv 4T1 cellen wordt geïnduceerd onder adequate anesthesie. Vervolgens worden de tumoren gegroeid voor maximaal 4 weken, totdat de gewenste tumorgrootte (50-200 mm<sup>3</sup>) bereikt is. In deze periode wordt de tumorgroei gemonitord door minstens tweemaal per week door de tumorgrootte te meten met een schuifmaat. Vervolgens worden de tumordragende muizen geïnjecteerd (wakker) met een nanomedicijn-construct en optioneel met maximaal tweemaal klaringstof (binnen een periode van een week). In de loop der tijd zullen volgens de NC3Rs richtlijnen maximaal acht bloedmonsters genomen worden (wat gewenst is om het effect van het klaringmiddel goed te kunnen volgen) en geanalyseerd worden. Na maximaal 7 dagen (waarin bovengenoemde nanomedicijn- en/of klaringmiddelinjectie en bloedsampling uitgevoerd worden) worden de dieren onder anesthesie gebracht, wordt eventueel een laatste bloedmonster genomen via hartpunctie en worden de dieren geëuthanaseerd onder adequate anesthesie. Hierna wordt met behulp van monsters van bloed, urine en organen de biodistributie van het nanomedicijn en evt klaringmiddel bepaald. Daarnaast zal de drug worden geëxtraheerd uit geselecteerde weefsels en worden gekwantificeerd.

Experiment 3: nanomedicijntherapie in tumordragende muizen

Tumorgroei wordt geïnduceerd onder adequate anesthesie. Vervolgens worden de tumoren gegroeid voor maximaal 4 weken, totdat de gewenste tumorgrootte (50-200 mm<sup>3</sup>) bereikt is. In deze periode wordt de tumorgroei gemonitord door minstens tweemaal per week de tumorgrootte te meten met een schuifmaat. Vervolgens worden de tumordragende muizen geïnjecteerd (wakker) met een nanomedicijnconstruct en optioneel met maximaal tweemaal klaringstof (binnen een periode van een week). Er zullen controlegroepen meegenomen worden die in plaats van het nanomedicijn een placebobehandeling krijgen, of alleen met klaringmiddel geïnjecteerd worden. Vervolgens wordt de tumorgroei gemonitord tot maximaal 4 maanden na nanomedicijn- of placebo-injectie, door minstens tweemaal per week de tumorgrootte te meten met een schuifmaat. Na deze maximaal 4 maanden worden de dieren onder anesthesie gebracht, wordt er eventueel een bloedmonster genomen via hartpunctie en worden de dieren geëuthanaseerd onder adequate anesthesie. Afhankelijk van de resultaten in de voorgaande experimenten zal mogelijk de toxiciteit van de

agentia bepaald worden door voorafgaand aan het experiment en 1 maal per week tijdens het experiment een bloedmonster te nemen volgens de NC3Rs richtlijnen (wakker).

#### Experiment 4: histologische evaluatie van de veiligheid van nanomedicijnklaring in muizen

De muizen worden geïnjecteerd (wakker) met een nanomedicijn-construct en optioneel met maximaal tweemaal klaringsmiddel. Er zullen controlegroepen meegenomen worden die in plaats van het nanomedicijn een placebobehandeling krijgen, of alleen met klaringsmiddel geïnjecteerd worden. Op verschillende tijdstippen na start van de therapie en tot maximaal 4 maanden na de start van de therapie worden de dieren onder anesthesie gebracht, wordt er eventueel een bloedmonster genomen via hartpunctie en worden de dieren geëuthanaseerd onder adequate anesthesie. De tijdstippen worden gebaseerd op de resultaten in Experiment 3. Mocht er in dat experiment toxiciteit optreden dan zullen de tijdstippen voor en op dat moment liggen om zo de ophoping en schade in relevante organen in de tijd te volgen. Mocht er geen toxiciteit optreden dan zullen de tijdstippen verspreid worden over de gehele duur van het experiment. Afhankelijk van de resultaten in de voorgaande experimenten zal mogelijk de toxiciteit van de agentia bepaald worden door voorafgaand aan het experiment en 1 maal per week tijdens het experiment een bloedmonster te nemen volgens de NC3Rs richtlijnen (wakker). Op de verschillende tijdstippen waarop de dieren zijn opgeofferd zal het effect van ophoping van nanomedicijnen op het weefsel histologisch onderzocht worden.

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

---

In de eerste fase van het onderzoek worden de chemisch reactieve (actief te klaren) nanomedicijnen en klaringsmiddelen uitgebreid in vitro gekarakteriseerd en getest, om zo de reactiviteit en stabiliteit in buffer en serum vast te stellen. Na deze in vitro tests, waarvoor geen proefdieren benodigd zijn, selecteren we alleen de geschikte nanomedicijnen en klaringsmiddelen voor de dierexperimenten. Als de nanomedicijnen niet stabiel genoeg zijn of als de TCO onvoldoende reactief is met het tetrazine derivaat worden de nanomedicijnen niet geselecteerd voor vervolgentoelagen. Alleen de meest veelbelovende constructen zullen dus in een dierexperiment getest worden.

In een volgende fase van het onderzoek (experiment 1) wordt de bloedkinetiek van de nanomedicijnen en klaringsmiddelen onderzocht. Op basis van die experimenten zullen weer alleen de veelbelovende constructen geselecteerd worden voor vervolgentoelagen, wat waarschijnlijk een sub-selectie zal zijn van de geteste nanomedicijn-constructen. Belangrijke criteria hierbij zijn dat de nanomedicijnen zonder toediening van het klaringsmiddel voldoende lang in de circulatie moeten blijven, dat de nanomedicijnen die TCO bevatten na toediening van het klaringsmiddel voldoende snel uit de bloedbaan geklaard moeten worden en dat de TCO van deze nanomedicijnen voldoende stabiel moet zijn in vivo.

In een volgende stap (experiment 2) wordt de ophoping van de chemotherapeutische nanomedicijnen in de tumor, organen en overige weefsels onderzocht. Er wordt onderzocht wanneer de hoeveelheid nanomedicijn in de tumor maximaal is en wanneer dit in overige weefsels en organen het geval is, optioneel met toediening van het klaringsmiddel. Op basis van deze resultaten zullen weer alleen de geschikte, meest veelbelovende nanomedicijnen geselecteerd worden voor vervolgentoelagen. Als de ophoping van de nanomedicijnen in de tumor onvoldoende is of als de reactiesnelheid met het klaringsmiddel te langzaam is, zullen deze constructen niet in experiment 3 gebruikt worden. Onvoldoende ophoping in de tumor zal namelijk automatisch leiden tot onvoldoende therapeutische effectiviteit en een te langzame reactie met het klaringsmiddel zal resulteren in te veel ophoping van het nanomedicijn in bijvoorbeeld gezonde weefsels. Daarmee zou de therapeutische index van het met TCO-gemodificeerde nanomedicijn onvoldoende verbeterd zijn ten opzichte van het nanomedicijn zonder TCO-modificatie.

Op basis van de resultaten van experiment 2 zal de optimale nanomedicijn+klaringsmiddel combinatie geselecteerd worden en in de volgende fase van het onderzoek (experiment 3) zal de therapeutische effectiviteit worden getest door de remming van de tumorgroei te volgen. Voor experiment 4 wordt overeenkomstig met experiment 3 alleen de optimale nanomedicijn+klaringsmiddel combinatie uit de eerdere experimenten gebruikt.

Door deze gefaseerde projectopzet, met tussentijdse evaluaties en selecties wordt het aantal benodigde dieren tot een minimum beperkt. Er wordt per experiment een statistische analyse uitgevoerd om het aantal benodigde proefdieren te berekenen. Hierin zal o.a. de verwachte spreiding op de uitleesparameters, het beoogd effect en de gewenste power meegenomen worden. Hierdoor wordt voorkomen dat er meer proefdieren gebruikt zouden worden dan noodzakelijk. Voor het bepalen van de groepsgroottes wordt de sample size calculation tool van de [REDACTED] gebruikt [REDACTED]. Er zal rekening gehouden worden met een mogelijk klein uitvalspercentage door eventuele foutieve injectie van het nanomedicijn of eventueel klaringsmiddel.

## **B. The animals**

---

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

---

### **Diersoort en sexe:**

Immunocompetente, vrouwelijke Balb/c muizen.

Voor dit project is gekozen voor het 4T1 tumormodel (in experiment 2 en 3). Dit is een muis tumormodel en kan dus alleen gegroeid worden in muizen. Het is een borstkliercarcinoom en daarom dient het ook gegroeid te worden in de borstklier van vrouwelijke Balb/c muizen. Vanwege deze redenen komt geen andere diersoort in aanmerking. De reden dat voor dit tumormodel gekozen is, is dat Charrois et al. dit tumormodel ook gebruikt hebben in hun onderzoek naar liposomaal doxorubicine. Hierbij stond het bepalen van de biodistributie en bloedkinetiek van doxorubicine dat verpakt was in verschillende liposomale formulaties centraal. Ze hebben in dit onderzoek waargenomen dat op ongeveer 24 uur na injectie van de nanomedicijnen de doxorubicineconcentratie in de tumor maximaal was, terwijl pas op een later moment een maximale doxorubicineconcentratie in de poten en huid van de muizen werd waargenomen. Het moment waarop de concentratie van doxorubicine/nanomedicijn in de tumor maximaal is, maar in de poten en huid nog niet, is ideaal voor toediening van het klaringsmiddel. Daarom lijkt dit tumormodel zeer geschikt voor dit project. Daarnaast is dit tumormodel een relevant model voor borstkanker, wat een van de kankertypes is waarbij de therapie met bijvoorbeeld Doxil/Caelyx liposomen klinisch toegepast wordt. Van andere tumortypes is grotendeels onbekend wat de farmacokinetiek van de nanomedicijnen en verdeling over tumor en andere organen/weefsels zouden zijn, omdat dit in minder detail is uitgezocht. Het is dus ook onbekend of deze tumormodellen geschikt zouden zijn om de nanomedicijne+klaringsmiddel therapie mee te testen. Dit zou eerst uitgezocht moeten worden in aparte dierexperimenten, wat niet gewenst is, omdat hiervoor extra dieren nodig zouden zijn.

In experiment 1 en 4 dienen ook dezelfde soort vrouwelijke muizen gebruikt te worden als in experiment 2 en 3, zodat er zo weinig mogelijk verschillen zijn in fysiologie tussen de dieren. Dit zou namelijk de farmacokinetiek van de nanomedicijnen en klaringsmiddelen kunnen beïnvloeden. Het is belangrijk om hier rekening mee te houden, omdat de nanomedicijnen en klaringsmiddelen die gebruikt worden in experiment 2 en 3 geselecteerd worden op basis van de resultaten van experiment 1. Daarnaast worden de bevindingen in experiment 4 worden gekoppeld aan de bevindingen in experiment 3.

### **Herkomst:**

Leverancier met geregistreerde fok/afleververgunning

### **Geschatte aantallen:**

#### Experiment 1:

Er zullen maximaal 12 nanomedicijntypen (variërend in samenstelling en TCO-modificatiegraad) onderzocht worden. De TCO-modificatiegraad heeft mogelijk invloed op hoe efficiënt de nanomedicijnen geklaard kunnen worden door middel van een klaringsmiddel. De samenstelling kan daarnaast invloed hebben op de bloedkinetiek. Er wordt begonnen met een samenstelling die vergelijkbaar is met die van Doxil/Caelyx (maar dan met



eventuele TCO-modificatie) en indien nodig wordt deze aangepast. Er wordt gestopt met het experiment als de beste combinatie van nanomedicijn en klaringsmiddel gevonden is (zie projectvoorstel).

Er wordt verwacht dat maximaal 5 dieren per groep nodig zullen zijn, wat in vergelijkbare bloedkinetiek/biodistributie studies voldoende bleek te zijn. Dit aantal wordt gebaseerd op een statistische analyse die uitgevoerd wordt om het aantal benodigde proefdieren te berekenen (zie punt A: experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters). Hierin zal o.a. de verwachte spreiding op de uitleesparameters, het beoogd effect en de gewenste power meegenomen worden. Tevens zal er rekening gehouden worden met een mogelijk klein uitvalspercentage door eventuele foutieve injectie van het nanomedicijn of eventueel klaringsmiddel. Dit zal gedaan worden door de volgende formule te hanteren, waarin a het uiteindelijke aantal benodigde dieren is en x de fractie uitval:  $(a-x*a)=5$ . Indien de uitval dus bijvoorbeeld 10% zou zijn, komt het aantal dieren dus op  $a=5.6$ , wat afgerond 6 dieren zijn. Met dit uitval meegenomen wordt verwacht dat er voor de 12 nanomedicijnen dus maximaal  $(6*12=)$  72 muizen nodig zijn.

#### Experiment 2:

Na selectie van de meest veelbelovende constructen uit experiment 1 testen we in dit experiment de volgende dingen: 2 TCO-modificatieniveaus van de nanomedicijnen, maximaal 3 variaties in het bewerkstelligen van de klaring van de nanomedicijnen en maximaal 4 verschillende tijdstippen van opofferen om op dat moment de biodistributie te bepalen.

Er wordt verwacht dat maximaal 5 dieren per groep nodig zullen zijn, wat in vergelijkbare biodistributie studies voldoende bleek te zijn. Dit aantal wordt gebaseerd op een statistische analyse uitgevoerd om het aantal benodigde proefdieren te berekenen. Hierin zal o.a. de verwachte spreiding op de uitleesparameters, het beoogd effect en de gewenste power meegenomen worden. Tevens zal er rekening gehouden worden met een mogelijk klein uitvalspercentage door eventuele foutieve injectie van het nanomedicijn of eventueel klaringsmiddel en eventuele problemen met tumorgroei, op dezelfde manier als beschreven voor experiment 1. Met deze uitval meegenomen en de verschillende hierboven beschreven experimentele groepen wordt verwacht dat er maximaal  $(2*3*4 \text{ groepen} * 6 \text{ dieren (per groep 5 + een uitvalspercentage)})=$  144 muizen nodig zijn.

#### Experiment 3:

In experiment 3 zal voor de optimale nanomedicijn+klaringsmiddel combinatie de therapeutische effectiviteit worden getest door de remming van de tumorgroei te volgen. Dé combinatie wordt in maximaal 3 doseringen getest, waarbij voor elke dosering het nanomedicijn met of zonder TCO-modificatie en met of zonder inspuiten van het klaringsmiddel getest wordt. Daarnaast worden de volgende controlegroepen getest: een groep die placebobehandeling krijgt en een groep die alleen het klaringsmiddel toegediend krijgt. Daarmee komt het totaal op  $(3*2*2+1+1=)$  14 groepen. Voor deze therapiestudie verwachten we maximaal 15 dieren per groep nodig te hebben, o.a. vanwege de verwachte grote spreiding in tumor respons, met daarin al meegenomen de mogelijk uitval door eventuele foutieve injectie van nanomedicijn of klaringsmiddel en problemen met tumorgroei (zoals achterblijvende groei). Hiermee komt het totaal voor experiment 3 op maximaal  $(14 \text{ groepen} * 15 \text{ dieren})=$  210 muizen.

#### Experiment 4:

In experiment 4 wordt voor (maximaal) dezelfde groepen als beschreven in experiment 3 histologisch onderzoek uitgevoerd op de weefsels op bepaalde tijden na start van therapie. Dit onderzoek kan niet uitgevoerd worden op dezelfde dieren als in experiment 3 omdat in die groep het therapeutisch effect longitudinaal gevolgd zal worden. Overeenkomstig met experiment 3 worden maximaal 3 doseringen getest, waarbij voor elke dosering het nanomedicijn met of zonder TCO-modificatie en met of zonder inspuiten van het klaringsmiddel getest wordt. Daarnaast worden de volgende controlegroepen getest: een groep die placebobehandeling krijgt en een groep die alleen het klaringsmiddel toegediend krijgt. Het aantal groepen komt hiermee op 14  $(3*2*2+1+1)$ . Omdat dit een kwalitatieve analyse betreft, waarop geen statistiek wordt toegepast verwachten we hier aan 5 dieren per groep voldoende te hebben (met eventuele uitval door foutieve injecties meegenomen).

Hiermee komt het totaal voor experiment 4 op maximaal  $(14 \text{ groepen} * 5 \text{ dieren})=$  70 muizen.

Het totaal aantal muizen voor deze aanvraag komt daarmee op 496 muizen.

**Levensstadia:** de leeftijd van de muizen ten tijde van bestelling is 6-8 weken. Dit is een gebruikelijke leeftijd voor dit tumormodel (zie het artikel: Pulaski, B. A. and Ostrand-Rosenberg, S. 2001. Mouse 4T1 Breast Tumor Model. Current Protocols in Immunology. 39:20.2:20.2.1–20.2.16.). Deze leeftijd komt ook overeen met de leeftijd die door Charrois et al. gebruikt is in hun studies met de 4T1 tumormodellen. Dit is een zeer relevant tumormodel voor dit project (zie eerdere beschrijving bij punt A; experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters). Door dezelfde leeftijd te kiezen als gebruikt in de studies van Charrois et al. is er ook zo weinig mogelijk verschil in fysiologie (en daardoor mogelijk ook in de farmacokinetiek van geïnjecteerde nanomedicijnen) tussen dit project en hun studies en kunnen resultaten beter getransleerd en vergeleken worden. Bij experiment 1 en 4 worden geen tumordragende muizen gebruikt, maar zal ook een bestelleeftijd van 6-8 weken gebruikt worden, zodat de dieren die gebruikt worden in deze experiment ook ongeveer dezelfde fysiologische eigenschappen zullen hebben als de dieren van experiment 2 en 3. De uiteindelijke maximale leeftijd die de dieren zullen bereiken is afhankelijk van de experimentele condities zoals die beschreven staan onder punt A (Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters).

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Balb/C mice	Leverancier met geregistreerde fok/afleververgunning	496	6-8 weeks

### C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

### D. Replacement, reduction, refinement

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

Vervanging:

In een eerste fase van het onderzoek worden de nanomedicijnen en klaringsmiddelen gesynthetiseerd, en uitgebreid in vitro gekarakteriseerd en getest, om zo de reactiviteit en stabiliteit vast te stellen. Hierbij worden proeven gedaan in buffer met fysiologische eigenschappen en in serum, om de condities in het bloed na te bootsen. Op basis van deze metingen kan vóór de dierexperimenten al een voorselectie gemaakt worden van alleen de geschikte en veelbelovende constructen.

Indien men kanker effectief wil behandelen met de combinatie van het nanomedicijn en het klaringsmiddel, is het vervolgens belangrijk om te weten hoe de verschillende componenten zich in het lichaam gedragen. In dit project worden nieuw ontwikkelde nanomedicijnen en klaringsmiddelen onderzocht, waarvan nog onbekend is welk farmacokinetisch gedrag ze zullen vertonen, en hoe effectief de klaring van het nanomedicijn in vivo zal plaatsvinden. Daarom moet de bloedkinetiek, de verdeling over het lichaam, de therapeutische effectiviteit en de eventuele toxiciteit onderzocht worden. Deze factoren zijn afhankelijk van complexe processen die afhankelijk zijn van o.a. de fysiologie en het micromilieu van de tumor. Dit kan niet nagebootst worden in het laboratorium of met computersimulaties. Aangezien deze nanomedicijnen en klaringsmiddelen vanuit medische en ethische overwegingen niet direct in patiënten getest kunnen worden, komt alleen een diermodel in aanmerking.

#### Vermindering:

Vooraf zijn de nanomedicijnen en klaringsmiddelen uitgebreid in vitro getest op stabiliteit en reactiviteit. Alleen de nanomedicijnen en klaringsmiddelen waarvan gebleken is dat ze stabiel en voldoende reactief zijn worden getest in de dierexperimenten.

Van de geselecteerde nanomedicijnen en klaringsmiddelen wordt in een eerste experiment de bloedklaring en stabiliteit bepaald. De nanomedicijnen die getest worden verschillen in samenstelling en TCO-modificatiegraad. De TCO-modificatiegraad heeft mogelijk invloed op hoe efficiënt de nanomedicijnen geklaard kunnen worden door middel van een klaringsmiddel. De samenstelling kan daarnaast invloed hebben op de bloedkinetiek. Er wordt begonnen met een samenstelling die vergelijkbaar is met die van Doxil/Caelyx (maar dan met eventuele TCO-modificatie) en indien nodig wordt deze aangepast, waarbij in experiment 1 maximaal 12 formulaties getest zullen worden. Op basis van de resultaten van experiment 1 zullen alleen de veelbelovende constructen geselecteerd worden voor vervolgexperimenten, wat waarschijnlijk een sub-selectie zal zijn van de geteste nanomedicijn-constructen. Er wordt gestopt met experiment 1 als de beste combinatie van nanomedicijnen en klaringsmiddelen gevonden is. In experiment 2 zal de bloedklaring en accumulatie van de nanomedicijnconstructen en klaringsmiddelen in tumor en organen bepaald worden. Als de ophoping van de nanomedicijnen in de tumor onvoldoende is of als de reactiesnelheid met het klaringsmiddel te langzaam is, zullen deze constructen niet in experiment 3 gebruikt worden. Onvoldoende ophoping in de tumor zal namelijk automatisch leiden tot onvoldoende therapeutische effectiviteit en een te langzame reactie met het klaringsmiddel zal resulteren in een te hoge accumulatie van het nanomedicijn in bijvoorbeeld gezonde weefsels.

In experiment 3 en 4 wordt op basis van experiment 1 en 2 de optimale nanomedicijn+klaringsmiddel combinatie geselecteerd en wordt de therapeutische effectiviteit en veiligheid getest.

Door deze opzet, met tussentijdse evaluaties van geschiktheid van de nanomedicijnen, klaringsmiddelen, of combinatie daarvan, wordt het aantal benodigde proefdieren zoveel mogelijk beperkt.

Naast deze gefaseerde proefopzet zullen waar mogelijk per proefdier zowel de biodistributie van het nanomedicijn zelf (door middel van weefselextracties), het klaringsmiddel en het chemotherapeutische middel bepaald worden. Doordat we voor deze verschillende agentia geen aparte proefdieren bestellen zal het totaal aantal dieren zoveel mogelijk beperkt worden. Dit zal niet leiden tot extra ongerief, omdat kwantificatie van de concentraties van de moleculen een ex vivo analyse betreft en deze verschillende moleculen ongeacht die analyse sowieso in 1 dier geïnjecteerd zouden moeten worden.

Tot slot wordt een statistische analyse uitgevoerd om het aantal benodigde proefdieren te berekenen. Hierin zal o.a. de verwachte spreiding op de uitleesparameters, het beoogd effect en de gewenste power meegenomen worden. Hierdoor wordt voorkomen dat er meer proefdieren gebruikt zouden worden dan noodzakelijk.

#### Verfijning:

### *Diermodel en tumormodel*

Er is gekozen om muizen te gebruiken in dit project. De effectiviteit van een breed scala aan nanomedicijnen en chemotherapeutische middelen is getest in verschillende muismodellen van kanker. Deze tumormodellen kunnen op een gecontroleerde manier geïnduceerd worden en de tumoren kunnen vaak op een goed controleerbare manier gegroeid worden. Van verschillende tumormodellen in muizen is aangetoond dat ze ook relevant zijn in vergelijking met humane tumoren en gelijke eigenschappen vertonen.

Daarnaast zal in dit project in experiment 2 en 3 het 4T1 tumormodel gebruik worden. Dit is een muis tumormodel en kan dus alleen gegroeid worden in muizen. Het is een borstklier carcinoom en daarom dient het ook gegroeid te worden in de borstklier van vrouwelijke Balb/c muizen. Charrois et al. heeft dit tumormodel ook gebruikt in een aantal onderzoeken over het nanomedicijn liposomaal doxorubicine (Zoals beschreven onder punt B. 'De dieren'). De in hun onderzoek geobserveerde verdeling van de nanomedicijnen over tumor en organen geeft aan dat dit tumormodel uitermate geschikt is voor dit project, omdat er een moment is waarop de concentratie van doxorubicine/nanomedicijn in de tumor maximaal is, maar in de poten en huid nog niet. Dit is een ideaal moment voor toediening van het klaringsmiddel. Daarnaast is dit tumormodel een relevant model voor borstkanker, wat een van de kankertypes is waarbij de therapie met bijvoorbeeld liposomaal doxorubicine klinisch toegepast wordt. Van andere tumortypes is grotendeels onbekend wat de farmacokinetiek van de nanomedicijnen en verdeling over tumor en andere organen/weefsels zouden zijn, omdat dit in minder detail is uitgezocht. Het is dus ook onbekend of deze tumormodellen geschikt zouden zijn om de nanomedicijn+klaringsmiddel therapie in te testen. Dit zou eerst uitgezocht moeten worden in aparte dierexperimenten, wat niet gewenst is omdat dit extra dierexperimenten zou vereisen.

In experiment 1 ligt de nadruk op de bloedkinetiek en biodistributie van de nanomedicijnen en nog niet op tumortargeting. Daarom is voor dit experiment ervoor gekozen om niet-tumordragende muizen te gebruiken. Omdat therapeutische effectiviteit al onderzocht is in experiment 3, gebruiken we daarnaast ook in experiment 4 muizen zonder tumor. Doordat tumorgroei achterwege gelaten wordt bij experiment 1 en 4, omdat dat niet noodzakelijk is om de vragen die centraal staan in die experimenten te beantwoorden, is er geen ongerief dat gerelateerd is aan tumorgroei.

### *Anesthesie*

Er wordt adequate anesthesie toegepast bij de experimentele handelingen waarvoor dit vereist is en daarnaast wordt adequate pijnstilling gegeven indien de dieren tekenen van pijn vertonen. Hiertoe zullen de dieren nauwlettend gemonitord worden. Hiermee wordt het ongerief voor het dier zoveel mogelijk beperkt.

### *Bloedsampling*

Bloedsampling wordt uitgevoerd volgens de NC3Rs richtlijnen, waardoor het ongerief zoveel mogelijk beperkt wordt.

### *Huisvesting*

De dieren worden zoveel mogelijk sociaal gehuisvest volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU en er zal kooiverrijking gegeven worden.

### *Bekwaamheid*

De betrokkenen bij dit project hebben ruime ervaring met bloedkinetiek/biodistributie studies in muizen, waardoor verwacht wordt dat betrouwbare resultaten verkregen kunnen worden.

---

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

De volgende maatregelen zullen getroffen worden om de negatieve gevolgen van de proeven voor het welzijn van het dier te beperken:

- Er wordt adequate anesthesie toegepast bij de experimentele handelingen waarvoor dit vereist is en daarnaast wordt adequate pijnstilling gegeven indien de dieren tekenen van pijn vertonen. Hiermee wordt het ongerief voor het dier zoveel mogelijk beperkt.

- De dieren zullen nauwlettend gemonitord worden. Uitgangspunt hierbij is de code of practice voor kankeronderzoek. Er worden humane eindpunten gedefinieerd gebaseerd op een aantal klinische verschijnselen, waarop de dieren regelmatig worden gescoord. Deze scoring wordt gedaan op basis van een welzijnsscoringslijst. Hiermee wordt ook ongerief door tumorgroei en metastasen zoveel mogelijk beperkt.

## 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.

---

nvt

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

---

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

---

No

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

---

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

---

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

---

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

---

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

---

---

## Classification of discomfort/humane endpoints

### H. Pain and pain relief

---

Will the animals experience pain during or after the procedures?

---

No > Continue with question I.

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

---

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

---

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

---

Inoculatie van tumorcellen wordt uitgevoerd onder adequate anesthesie. Bij het uitvoeren van een hartpunctie en bij euthanasie door middel van weefsel-perfusie wordt ook anesthesie toegepast. Daarnaast wordt adequate pijnstilling gegeven als de dieren tekenen van pijn vertonen. Pijnverlichtingsmethoden zullen volgens de richtlijnen worden toegepast.

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

---

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

---

In de geplande experimenten (1 tot en met 4) zullen chemotherapeutische nanomedicijnen en eventueel klaringsmiddelen toegediend worden in wakkere toestand. Daarnaast zullen er bloedafnames gedaan worden. Voor de combinatie van deze handelingen wordt volgens matig ongerief verwacht (gebaseerd op directive 2013/36/eu).

De gebruikte chemotherapeutische middelen kunnen mogelijk toxische bijwerkingen geven, zoals maagdarmklachten en bijgevolg gewichtsverlies, huidirritatie, haaruitval, levernecrose, cardiomyopathie, en nierbeschadiging. Deze effecten worden voor de beschreven medicijnafgiftesystemen bij een eenmalige, sub-letale dosis echter maar in beperkte mate verwacht.

In experiment 2 en 3, waarin tumordragende muizen gebruikt worden, wordt daarnaast ongerief verwacht door injectie en groei van de 4T1 tumoren. Het 4T1 tumormodel is een model dat kan metastaseren naar verschillende organen. Er is gerapporteerd dat in 2 tot 3 weken zich metastasen naar lymfeknopen, longen en lever kunnen ontwikkelen, in 86%, 79% en 20% van de dieren, respectievelijk. Op 4 a 5 weken na

tumorcelinjectie kan het percentage metastasen naar longen, lever en nu ook brein toenemen naar 91%, 82% en 36%, respectievelijk. In experiment 2 zullen de dieren echter maar relatief kort nadat de tumor de gewenste grootte bereikt nog in experiment zijn. Daarom wordt bij deze dieren verwacht dat ze geen extra ongerief door tumorgroei of door het optreden van metastasen zullen hebben. Bij experiment 3 zijn de dieren gedurende langere tijd in experiment, omdat in dit experiment naar tumor therapie gekeken wordt. Een deel van deze dieren krijgt ook een placebobehandeling of alleen een injectie van het klaringsmiddel, waardoor tumorgroei niet geremd wordt. Doordat er humane eindpunten toegepast worden, wordt voorkomen dat er sprake is van een dodelijke voortschrijdende ziekte met een langdurige matige vorm van pijn, waardoor er geen overschrijding van matig ongerief zal zijn. Er zal regelmatige monitoring van de tumorgroei plaatsvinden door het meten van de tumorgrootte met een schuifmaat, wat ook ongerief veroorzaakt.

Explain why these effects may emerge.

---

De chemotherapeutische middelen die gebruikt worden kunnen cytotoxische effecten met zich meebrengen, wat tot bijwerkingen kan leiden. Er wordt echter verwacht dat deze effecten bij de experimentele condities van dit project maar beperkt aanwezig zullen zijn. Om mogelijke bijwerkingen te minimaliseren wordt er slechts 1 injectie gegeven en de meeste bijwerkingen zouden optreden bij een behandeling in kuurvorm of bij hoge doseringen. Daarnaast zitten de chemotherapeutische middelen verpakt zit in een medicijnafgiftesysteem, waardoor een eventueel toxisch effect van het vrije chemotherapeutische middel maar in beperkte mate aanwezig is aangezien het langzaam vrijkomt (met name op de plek van de tumor). Bij experiment 3 kan er uitzaaiing van tumorcellen naar andere organen zijn, wat vooral verwacht wordt als de therapie geen effect heeft of bij de controlegroepen. Dit wordt in experiment 2 maar in beperkte mate verwacht, omdat de dieren relatief kort in experiment zijn.

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

---

De kans op bijwerkingen door eventuele cytotoxische effecten van de chemotherapeutische middelen wordt geminimaliseerd door de keuze voor een eenmalige injectie van de nanomedicijnen. Daarnaast worden de dieren nauwlettend gemonitord en indien noodzakelijk (aan de hand van de humane eindpunten) geëuthanaseerd. Zo wordt bij de tumordragende dieren voorkomen dat er sprake is van een voortschrijdende dodelijke ziekte en blijft het ongerief door eventuele metastasen beperkt.

## **J. Humane endpoints**

---

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

---

No > Continue with question K.

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

---

De humane eindpunten worden gebaseerd op de volgende algemene klinische verschijnselen:

1. Gedrag (scoren op reactie op prikkels, Back arch, twitch, wincing en white; en scoren op de mouse grimace scale)
2. Houding

3. Gang/ mobiliteit
4. Verzorgingstoestand
5. huid/faeces
6. respiratie/ademhaling
7. hydratatiestoestand/uitdrogingsverschijnselen
8. kleur slijmvliezen en extremiteiten
9. tumorgrootte
10. open wonden
11. Ontsteking/Ulceratie van de huid (ook van de huid van de tumor)
12. andere in het oog springende afwijking

Deze klinische verschijnselen worden als volgt gescoord: 0= normaal, 1= geringe afwijking, 2= matige afwijking, 3= ernstige afwijking. Deze scoring wordt gedaan op basis van een welzijnsscoringslijst, die aan het werkprotocol wordt toegevoegd. Euthanasie zal worden toegepast indien op enig moment score 3 wordt bereikt, omdat het belang van de proef dan niet meer opweegt tegen het ongerief van het dier en de meetresultaten in het geval van deze score niet meer als betrouwbaar kunnen worden geacht. Daarnaast wordt euthanasie toegepast als een totale score van 6 (uit een combinatie van geringe en/of matige afwijkingen) bereikt wordt. In dat geval wordt de optelsom aan ongerief ook dusdanig geacht dat het belang van de proef hiertegen niet meer opweegt en de meetresultaten in het geval van deze score niet meer als betrouwbaar kunnen worden geacht.

Daarnaast wordt euthanasie toegepast indien één van de volgende punten zich zou voor doen:

- gewichtsverlies > 20 % ( met in achtneming van tumor gewicht)
- Tumorgrootte > 1.5 cm<sup>3</sup>.
- Automutilatie

Indicate the likely incidence.

---

Verwacht wordt dat deze criteria met name gehaald zouden kunnen worden in experiment 3, waarin de dieren tumordragend zijn en gedurende langere tijd gevolgd worden.

Dit geldt met name voor de dieren die behandeld worden met de placebobehandeling, of die alleen het klaringsmiddel toegediend krijgen. Het gaat hier om 2 groepen van in totaal maximaal 30 dieren voor experiment 3. Bij de overige 180 dieren wordt namelijk tumorgroei beperkt door het therapeutisch effect van het nanomedicijn. Mogelijk kan bij de dieren die behandeling ondergaan bij een bepaald percentage van de dieren de behandeling onvoldoende aanslaan. We schatten dat dit bij 20 procent van deze 180 dieren zou kunnen gebeuren, wat neerkomt op 36 dieren. Ondanks dat in dit project geen behandeling in kuurvorm gegeven wordt, zouden er in een enkel geval eventueel acute bijwerkingen van de nanomedicijnen zich voor kunnen doen. Dit zou bijvoorbeeld beïnvloed kunnen worden door de klaring van de nanomedicijnen naar de lever. Het is moeilijk op voorhand te voorspellen in welke mate dit zal leiden tot het behalen van de criteria voor humane eindpunten. Er wordt geschat dat in vijf procent van de dieren die met nanomedicijnen worden geïnjecteerd deze criteria gehaald kunnen worden. Het aantal dieren dat met nanomedicijnen wordt geïnjecteerd is 72+144+180+60 (dit zijn alle dieren van experiment 1 tot en met 4, min de dieren die een placebobehandeling krijgen of alleen injectie van het klaringsmiddel). Van de 180 dieren van experiment 3 is al aangegeven dat bij een percentage van 20 procent (36 dieren) de behandeling mogelijk niet aan zou kunnen slaan. Vijf procent van de resterende dieren zou dus neerkomen op  $(0.05 * (72+144+144+60)) = 21$  dieren.

Deze aantallen bij elkaar opgeteld geeft een schatting van  $(30+36+21) = 87$  dieren waarbij deze criteria gehaald zouden kunnen worden.



Het totale percentage van de dieren die de beschreven criteria kunnen halen komt daarmee op  $(100 \cdot 87 / 496 =)$  18%.

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

---

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

---

Het cumulatief ongerief wordt ingeschat op matig, op basis van de bovengenoemde negatieve effecten op het welzijn van het dier.

## **End of experiment**

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

---

Will the animals be killed during or after the procedures?

---

No

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

---

De weefsels van de dieren zijn nodig om de biodistributie van de nanomedicijnen en klaringsmiddelen te bepalen.

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

---

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

---

Yes

---

## DEC-advies

---

### A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer 2016-0002
2. Titel van het project: Klaring van chemisch reactieve nanomedicijnen ter verhoging van de therapeutische index van chemotherapie
3. Titel van de NTS: Ontwikkeling van reactieve nanomedicijnen voor effectieve kankertherapie met minder bijwerkingen
4. Type aanvraag:
  - nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
  - Naam DEC: RUDEC
  - Telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED], bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9:00 tot 15:00 uur
  - Mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject:
  - ontvangen door DEC: 19-01-2016
  - aanvraag compleet
  - in vergadering besproken: 02-02-2016
  - anderszins behandeld
  - termijnonderbreking(en) van 08-02-2016 tot 09-03-2016
  - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
  - aanpassing aanvraag: 09-03-2016
  - advies aan CCD: 31-03-2016
7. Eventueel horen van aanvrager
  - Datum
  - Plaats
  - Aantal aanwezige DEC-leden
  - Aanwezige (namens) aanvrager
  - Strekking van de vraag / vragen
  - Strekking van het (de) antwoord(en)
  - Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag
8. Correspondentie met de aanvrager
  - Datum: 08-02-2016
  - Strekking van de vragen:

### Project Proposal:

-3.3 De uitspraak 'Dit heeft een negatieve invloed op het klinisch resultaat' lijkt het intrappen van een open deur. De commissie adviseert u deze zin weg te laten.

-3.4.3 Er wordt gestopt met het experiment als de beste combinatie van nanomedicijnen en klaringsmiddelen gevonden is. Hoe weten de onderzoekers wat de beste combinatie is zonder ze eerst allemaal te testen?

**Description of Animal Procedures:**

-A1, experiment 2: hier hoort de toelichting voor de keuze voor 4T1 als tumormodel.

- Datum antwoord: 09-03-2016
- Strekking van de antwoorden:

**Project Proposal:**

-3.3 Deze zin hebben we nu weggelaten.

-3.4.3 Dit is inderdaad niet mogelijk. We hebben deze zin nu weggelaten.

**Description of Animal Procedures:**

-A1 Deze toelichting is nu verplaatst van 3.4.3 naar A1, experiment 2.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

**9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC)**

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

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

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

**C. Beoordeling (inhoud):**

1. Het project is:
  - uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling, namelijk 'te bepalen of nanomedicijntherapie gecombineerd met toediening van een klaringsmiddel gebruikt kan worden om bijwerkingen van chemotherapie te verminderen, terwijl de therapeutische effectiviteit minimaal beïnvloed wordt'. De te behalen onderzoeksresultaten zullen duidelijk maken of het toedienen van een klaringsmiddel op een bepaalde tijd na Doxil/Caelyx therapie leidt tot een vergelijkbare of betere antitumor activiteit in een muismodel voor borstkanker, waarbij ongewenste afgifte van chemotherapie in overige delen van het lichaam beperkt kan worden. Deze resultaten kunnen op termijn leiden tot de ontwikkeling van effectieve(re) chemotherapieën met minder bijwerkingen voor mensen met borsttumoren en mogelijk ook

andere typen solide tumoren. Belangrijke toxische bijwerkingen van de huidige behandeling met Doxil/Caelyx zijn ontstekingen aan handen en voeten en in de mond. Deze bijwerkingen ontstaan doordat het nanomedicijn zich uiteindelijk op deze plaatsen ophoopt, en vormen bij de helft van de patiënten een beperkende factor voor het geven van deze chemotherapie. Solide tumoren komen veel voor in de bevolking. Maatschappelijk is dit onderzoek van belang, omdat de resultaten kunnen bijdragen aan de ontwikkeling van effectieve(re) chemotherapieën met minder bijwerkingen voor mensen met verschillende typen tumoren, wat zou resulteren in gezondheidswinst voor veel mensen. Om deze redenen acht de commissie dit onderzoek van substantieel belang.

4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Deze groep heeft veel ervaring in dit onderzoeksveld en met de voorgestelde dierproeven. De samenwerkingspartners zijn experts op het gebied van de productie van nanomedicijnen. De gekozen aanpak leidt tot betrouwbare uitspraken over de bruikbaarheid van nanomedicijntherapie in combinatie met een klaringsmiddel en de effectiviteit en toxiciteit van deze combinatietherapie bij muizen.
5. Er is geen sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren.
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief wordt hoofdzakelijk bepaald door de groeiende tumor en de behandeling daarvan. De DEC schat het ongerief als gevolg van de benodigde bloedafnames, de i.v. injecties met nanomedicijnen of klaringsmiddel (maximaal tweemaal), de injectie van de tumorcellen in de borstklier onder anesthesie, het meten van de tumorgrootte met een schuifmaat (minstens tweemaal per week), en het doden onder anesthesie in als licht. De combinatie van deze handelingen kan tot matig ongerief leiden. Het ongerief als gevolg van de groeiende tumor schat de commissie in als matig. Het cumulatief ongerief voor de muizen in de beschreven vergunningaanvraag is dus juist ingeschat als matig voor alle dieren.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**. De doelstelling van het project kan niet gerealiseerd worden zonder proefdieren of door gebruik van minder complexe diersoorten. Een ziekte waarbij meerdere organen zijn betrokken kan niet goed bestudeerd worden zonder proefdiermodellen. De onderdelen van het project die *in vitro* bestudeerd kunnen worden zijn al uitgevoerd. Voor het beantwoorden van de resterende onderzoeksvragen zijn dierproeven noodzakelijk.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd. De DEC is het eens met het beschreven onderzoeksmodel en de onderbouwing van het aantal benodigde dieren. Door de stapsgewijze aanpak waarin de resultaten uit eerdere proeven worden gebruikt voor het design van vervollexperimenten wordt onnodig gebruik van proefdieren voorkomen. De DEC is van oordeel dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 496 muizen.
9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven. De experimentele handelingen bij de dieren zullen worden uitgevoerd door hierin getrainde onderzoekers, zodat de stress voor de dieren zoveel mogelijk wordt beperkt. Dagelijkse controles van de dieren zorgen ervoor dat bij onverwacht optredend ongerief tijdig kan worden ingegrepen. Er wordt adequate anesthesie toegepast bij de experimentele handelingen waarvoor dit vereist is, en de onderzoekers zullen eventuele overige pijn bij de dieren zoveel mogelijk

bestrijden door pijnstilling te geven. De DEC is ervan overtuigd dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.

Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.

10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project, zelfstandig leesbaar, beknopt en begrijpelijk geformuleerd.

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

Op basis van de onder C genoemde overwegingen komt de DEC tot de volgende ethische afweging.

Met dit onderzoek worden belangrijke wetenschappelijke inzichten verworven in het toepassen van een klaringsmiddel om ophoping van doxorubicine/nanomedicijn in gezonde organen te verminderen met behoud van anti-tumor effectiviteit in een muismodel voor borstkanker. Het is aannemelijk dat deze resultaten zullen bijdragen aan het ontwikkelen van effectievere chemotherapieën met nanomedicijnen voor patiënten met borsttumoren door het verminderen van toxische bijwerkingen. Op termijn zouden de resultaten ook toegepast kunnen worden bij de behandeling van andere solide tumoren. Het belang van meer inzicht in de mogelijke toepassing van een klaringsmiddel om toxische bijwerkingen van nanomedicijnen te beperken en de ontwikkeling van effectievere chemotherapieën voor (borst)kanker acht de DEC substantieel, gezien de prevalentie van (borst)kanker in de bevolking en de frequentie van het optreden van bijwerkingen die beperkingen opleggen aan de dosis en duur van de behandeling. De resultaten uit dit onderzoek kunnen op korte termijn vertaald worden naar klinische toepassingen bij borstkanker.

Tegenover dit substantiële belang staat het gegeven dat alle dieren matig ongerief zullen ondervinden als gevolg van de tumorgroei of de toediening van het nanomedicijn in combinatie met de benodigde handelingen. De commissie is er van overtuigd dat bij de dierproeven adequaat invulling gegeven zal worden aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en/of verfijning van dierproeven. Het gebruik van de dieren en het daarbij optredende ongerief is onvermijdelijk, wil men de doelstellingen kunnen realiseren.

De DEC is van oordeel dat het hier boven geschetste belang de onvermijdelijke nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren, in de vorm van angst, pijn of stress, rechtvaardigt. Aan de eis dat het belang van de experimenten op dient te wegen tegen het ongerief dat de dieren wordt berokkend, is voldaan.

#### **E. Advies**

1. Advies aan de CCD
  - De DEC adviseert de vergunning te verlenen
2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen  
Instantie voor Dierenwelzijn

██████████

Postbus 9101

6500 HB (628) NIJMEGEN



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD103002016499

**Bijlagen**

2

Datum 31 maart 2016

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte ██████████

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 31 maart 2016.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD103002016499. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

**Wacht met de uitvoering van uw project**

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

**Factuur**

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

**Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

### **Gegevens aanvrager**

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10300  
Naam instelling of organisatie: Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen  
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: [REDACTED]  
KvK-nummer: 41055629  
Straat en huisnummer: Geert Groteplein 10  
Postbus: 9101, [REDACTED]  
Postcode en plaats: 6500 HB Nijmegen NIJMEGEN  
IBAN: NL90ABNA0231209983  
Tenaamstelling van het rekeningnummer: UMC St. Radboud

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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



Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]  
Functie: Post-Doctoraal onderzoeker  
Afdeling: [REDACTED]  
Telefoonnummer: [REDACTED]  
E-mailadres: [REDACTED]

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

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

Gegevens gemachtigde

BSN: [REDACTED]  
Naam: [REDACTED]  
Postbus: 9101  
Postcode en plaats: 6500 HB (628) NIJMEGEN

Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Nee

Wat mag de gemachtigde doen?

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

**Over uw aanvraag**

Wat voor aanvraag doet u?

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

**Over uw project**

Geplande startdatum: 1 mei 2016  
Geplande einddatum: 1 mei 2021  
Titel project: Klaring van chemisch reactieve nanomedicijnen ter verhoging van de therapeutische ind  
Titel niet-technische samenvatting: Ontwikkeling van reactieve nanomedicijnen voor effectieve kankertherapie met minder  
Naam DEC: RU DEC  
Postadres DEC: Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen [REDACTED]  
E-mailadres DEC: [REDACTED]

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 935,-  
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

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

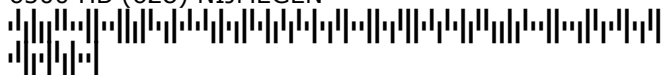
**Ondertekening**

Naam: [REDACTED]  
Functie: [REDACTED]  
Plaats: Nijmegen  
Datum: 31 maart 2016



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Instantie voor Dierenwelzijn  
Radboud universitair medisch centrum  
Postbus 9101, [REDACTED]  
6500 HB (628) NIJMEGEN



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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD103002016499  
**Bijlagen**  
2

Datum 31 maart 2016  
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 31 maart 2016  
Vervaldatum: 30 april 2016  
Factuurnummer: 16700499  
Ordernummer: 040823-461220/2016-0002/[REDACTED]

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD103002016499	€ 935,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL41RBOS 056.999.6317 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93144, 2509 AC te 's Gravenhage.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen  
Instantie voor Dierenwelzijn

Postbus 9101,  
6500 HB (628) NIJMEGEN



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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD103002016499  
**Bijlagen**

1

Datum 24 mei 2016  
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 31 maart 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Klaring van chemisch reactieve nanomedicijnen ter verhoging van de therapeutische index van chemotherapie" met aanvraagnummer AVD103002016499. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

#### **Beslissing**

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning. Omdat in uw aanvraag de beslisriteria van de go/no-go momenten niet in detail voorafgaand het begin van het project bekend zijn, stelt de CCD als voorwaarde dat de beslissing om verder te gaan met een vervolgexperiment moet worden afgestemd met de IvD. De algemene voorwaarde betreffende artikel 10, lid 1 sub a van de wet wordt gesteld bij vergunningen met een langere looptijd. Dit om te voldoen aan datgene wat volgt uit dit artikel. U kunt met uw project "Klaring van chemisch reactieve nanomedicijnen ter verhoging van de therapeutische index van chemotherapie" starten. De vergunning wordt afgegeven van 24 mei 2016 tot en met 1 mei 2021. De looptijd van de vergunning wijkt af omdat de startdatum in de aanvraag in het verleden ligt.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

#### **Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie RU DEC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 31 maart 2016. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie, nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. In aanvulling op dit advies stelt de CCD twee algemene voorwaarden. Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

#### **Bezwaar**

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen. Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

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


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

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

#### **Meer informatie**

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

Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:

  
M. G. de Peuter  
Algemeen Secretaris

#### **Bijlagen:**

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

## Projectvergunning

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

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen  
Adres: Postbus 9101  
Postcode en plaats: 6500 HB Nijmegen  
Deelnemersnummer: 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak 24 mei 2016 tot en met 1 mei 2021, voor het project "Klaring van chemisch reactieve nanomedicijnen ter verhoging van de therapeutische index van chemotherapie" met aanvraagnummer AVD103002016499, volgens advies van Dierexperimentencommissie RU DEC. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]. Voor de uitvoering van het project is de Instantie voor Dierenwelzijn verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 31 maart 2016
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 31 maart 2016;
  - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 31 maart 2016;
  - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 31 maart 2016, ontvangen op 31 maart 2016.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
Testen van nanomedicijnen in muizen	Muizen (Mus musculus) / Balb/C	496	100,00 % Matig	

### Voorwaarden

#### Op grond van artikel 10a1 lid 2 Wod zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen

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

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

# Weergave wet- en regelgeving

## **Dit project en wijzigingen**

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

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

## **Verzorging**

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

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

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

## **Pijnbestrijding en verdoving**

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

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

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

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

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

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

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

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



**Van:** info@zbo-ccd.nl  
**Verzonden:** woensdag 25 mei 2016 10:27  
**Aan:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** Terugkoppeling over projectvergunningaanvraag AVD103002016499

Geachte RU DEC,

Op 31-03-2016 hebben wij een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het gaat om het project 'Klaring van chemisch reactieve nanomedicijnen ter verhoging van de therapeutische ind' met aanvraagnummer AVD103002016499.

De CCD heeft de aanvrager geen aanvullende vragen gesteld.

We danken u voor uw advies en we koppelen graag het besluit van de CCD terug. De CCD heeft besloten de aanvraag toe te wijzen.

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

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

Inventaris Wob-verzoek W16-19S									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	<b>NTS2016501</b>								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel oud			x					
3	Niet-technische samenvatting oud			x					
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1				x			x	
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2				x			x	
6	DEC-advies				x		x	x	
7	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
8	Mails aanvulling aanvraag 18-5-2016				x		x	x	
9	Reactie verzoek aanvulling				x			x	
10	Projectvoorstel herzien				x			x	
11	Niet-technische samenvatting herzien	x							
12	Advies CCD		x						x
13	Beschikking en vergunning				x		x	x	

05 APR. 2016

1

Centrale Commissie Dierproeven



ARD 11400 2016 501

## Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

### 1 Gegevens aanvrager



1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in	11400
		<input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen	
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUMC) Amsterdam
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]
		KvK-nummer	64156338
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	de Boelelaan 1117
		Postbus	-
		Postcode en plaats	1081HV Amsterdam
		IBAN	NL07DEUT0549310002
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Stichting VU-VUmc
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED] <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	[REDACTED]
		Afdeling	[REDACTED]
		Telefoonnummer	[REDACTED]
		E-mailadres	[REDACTED]
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED] <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.
		Functie	[REDACTED]
		Afdeling	[REDACTED]
		Telefoonnummer	[REDACTED]
		E-mailadres	[REDACTED]

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

## 2 Over uw aanvraag

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

## 3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- |            |              |
|------------|--------------|
| Startdatum | 1 - 5 - 2016 |
| Einddatum  | 1 - 5 - 2021 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Waardoor vermindert spierfunctie bij aangeboren spierafwijkingen en wat kunnen we er tegen doen?
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Waardoor vermindert spierfunctie bij aangeboren spierafwijkingen en wat kunnen we er tegen doen?
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- |             |   |
|-------------|---|
| Naam DEC    | DEC-VU-VUMC   |
| Postadres   | <br>Amsterdam   The Netherlands |
| E-mailadres |                                 |

## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?  Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1187 Lege  
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.  Via een eenmalige incasso  
 Na ontvangst van de factuur
- Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*

## 5 Checklist bijlagen

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


## 6 Ondertekening


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

Centrale Commissie  
 Dierproeven  
 Postbus 20401  
 2500 EK Den Haag

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


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

Naam 

Functie 

Plaats Amsterdam

Datum 31 - 3/1 - 2016

Handtekening 





## Format

### Projectvoorstel dierproeven

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

### 1 Algemene gegevens

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

### 2 Categorie van het project

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

### 3 Algemene projectbeschrijving

#### 3.1 Achtergrond

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

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

Goed werkende spieren zijn noodzakelijk voor het dagelijks leven: problemen in skeletspieren (de

ademhalingsspier is een pregnant voorbeeld) kunnen leiden tot verslechtering van de kwaliteit van leven en een vroegtijdige dood. Verminderde spierfunctie kan zowel erfelijk als verworven zijn. Een voorbeeld van een erfelijke skeletspierziekte is nemaline myopathie. Dit is de meest voorkomende aangeboren spierziekte binnen de groep van aandoeningen waarin verstoringen in het *samentrekken* van de spier leiden tot spierzwakte (incidentie 1:50.000). Bij nemaline myopathie leiden mutaties in genen die coderen voor eiwitten in de sarcomeer – de kleinste contractiele eenheid in een spier – tot spierzwakte. De moleculaire mechanismen waardoor mutaties leiden tot spierzwakte zijn onvoldoende bekend en daarom is een specifieke en gerichte behandeling van patiënten nu niet mogelijk. Naast het vergroten van het inzicht in het verloop van de ziekte, willen we ook een medicijn testen die de sarcomeerfunctie verbetert.

Het project heeft zowel een fundamenteel als een translationeel karakter. Om spierfunctie van patiënten te verbeteren, is het allereerst van belang de mechanismen onderliggend aan spierzwakte in kaart te brengen. Inzicht verwerven in de pathofysiologie van aangeboren spierzwakte is de fundamentele kant van dit project. Het translationele deel betreft het testen van een nieuw en veelbelovend medicijn – een spieractivator- om spierkracht te verhogen.

### 3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

*Algemeen doel:* inzicht verwerven in de pathofysiologie van spierzwakte en het testen van een nieuw medicijn.

In dit project willen we meer inzicht vergaren over de onderliggende mechanismen van spierzwakte bij patiënten met nemaline myopathie. Met dit project willen we de volgende onderzoeksvragen beantwoorden;

1. Wat is de pathofysiologie van (1) de meest voorkomende vorm van nemaline myopathie en (2) de meest recent gediagnostiseerde vorm van nemaline myopathie? Waar bevinden de betrokken eiwitten zich en wat is hun rol in het genereren van spierkracht?  
Van zowel het meest voorkomende eiwit dat is aangedaan bij nemaline myopathie als het meest recent gediagnostiseerde eiwit is nauwelijks bekend waar de eiwitten zich bevinden in de spiercel en welke rol ze spelen bij de ontwikkeling van spierkracht. Daarom begrijpen we niet hoe genetische fouten die betrekking hebben op deze eiwitten kunnen leiden tot spierzwakte. Het is van essentieel belang om de lokalisatie en de rol van deze eiwitten in kaart te brengen om het ziektemechanisme te begrijpen en aangrijpingspunten voor therapieën te ontwikkelen.
2. Wat is het effect van acute en chronische blootstelling aan een spieractivator op spierfunctie in vijf nemaline myopathie muismodellen ?

#### *Haalbaarheid*

Onze afdeling heeft ruime ervaring met de voorgestelde experimenten en de benodigde infrastructuur, getuige meerdere publicaties in internationaal gerenommeerde tijdschriften. Ook zijn er voldoende financiële middelen om personeel aan te stellen en apparatuur aan te schaffen om de geplande experimenten uit te voeren.

### 3.3 Belang

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

Dit project heeft als doel meer inzicht te krijgen in aangeboren verstoringen in skeletspierfunctie en om nieuwe behandelingsmethoden te onderzoeken.



Spierzwakte is een grote belemmering in het dagelijks leven van mensen met een spierziekte, in de revalidatie en bij ouderen. Bij een groot aantal patiënten met een spierziekte leidt falen van de ademhalingspier (het diafragma) zelfs tot een vroegtijdige dood. Voor patiënten met nemaline myopathie – de meest voorkomende aangeboren spierafwijking met verstoorde contractie-eiwitten – is momenteel geen medicijn beschikbaar. Het is onze verwachting dat het medicijn dat we gaan testen, een spieractivator, de kwaliteit van leven van deze patiënten verbetert. We komen met de geplande experimenten veel te weten over de werking van een spieractivator op intacte spierfunctie in het gehele lichaam. De bevindingen zullen niet alleen van toepassing zijn op patiënten met nemaline myopathie, maar ook mensen met afgenomen spierfunctie door andere oorzaken, bijvoorbeeld een verminderde spieractivatie bij veroudering en diverse andere spierziektebeelden.

### 3.4 Onderzoeksstrategie

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

Het algemene doel van deze projectaanvraag is om meer inzicht te verkrijgen in de onderliggende mechanismen van verminderde skeletspierfunctie van patiënten met nemaline myopathie en om een potentieel medicijn te testen. Op deze manier willen we de kwaliteit van leven van de patiënten met nemaline myopathie verbeteren. Dit wordt op de volgende manier onderzocht.

#### *Pathofysiologie*

Nemaline myopathie is de meest voorkomende aangeboren spierziekte binnen de groep van aandoeningen waarin verstoringen in het samentrekken van de spier leiden tot spierzwakte. Vandaag de dag zijn we op de hoogte van 10 genen die betrokken zijn bij het ontstaan van nemaline myopathie. Er is echter nog geen medicijn voor handen. Om het inzicht in twee veelvoorkomende vormen van nemaline myopathie te vergroten, hebben we in twee verschillende muismodellen het betrokken eiwit gelabeld met een fluorescente probe. Van deze twee eiwitten, die de oorzaak zijn in het ontstaan van de ziekte, is nauwelijks bekend welke rol ze precies spelen. Door de eiwitten zichtbaar te maken middels fluorescentie, komen we te weten (1) waar de eiwitten zich bevinden in de cel, en (2) bij welke processen ze betrokken zijn. De skeletspier bestaat uit een zeer vernuftig raderwerk dat exact op elkaar is ingesteld om de spieren in beweging te brengen. De preciese plek van een eiwit in dit raderwerk voorspelt de rol die het eiwit speelt bij het genereren van kracht. Van twee eiwitten die vaak verstoord zijn bij nemaline myopathie, weten we niet precies waar deze eiwitten zich bevinden in het raderwerk. Als we deze informatie kunnen verkrijgen middels de fluorescente probe waarmee we de desbetreffende eiwitten kunnen labelen, vergroot dat ons inzicht in waarom deze spieren met aangedane eiwitten minder kracht kunnen leveren. Ook levert deze informatie hiermee aangrijpingspunten op voor therapieën om de spierkracht te herstellen. Zo vergroten we het inzicht in de pathofysiologie van nemaline myopathie.

#### *Testen medicijn*

Onlangs hebben we op *geïsoleerde individuele spiercellen* van nemaline myopathie patiënten een veelbelovende stof getest, een spieractivator, die de spierkracht aanzienlijk verbeterde. Om de stap te maken naar het testen van deze stof in nemaline myopathie patiënten is meer preklinisch werk noodzakelijk. We weten namelijk nog niet wat het effect van de spieractivator is op *intacte spieren* in nemaline myopathie. We verwachten dat de muizen bij gebruik van een spieractivator meer spierkracht kunnen leveren bij submaximale inspanning, en zuiniger met hun energie om kunnen gaan waardoor ze uiteindelijk minder last hebben van vermoeidheid. Om de belangrijke volgende stap naar de haalbaarheid van een spieractivator voor toekomstig gebruik in nemaline myopathie te testen, zijn we genooddaakt om het op effect intacte spieren en *in vivo* functie te bepalen. Daarom hebben we muismodellen gemaakt voor vijf verschillende vormen van nemaline myopathie. We hebben gekozen voor deze vijf modellen, omdat deze qua genetica vijf vormen van nemaline myopathie representeren die vaak voorkomen. Daarnaast zijn deze modellen interessant, omdat het verschillende vormen van ernst van spierzwakte betreft. Zo zijn sommige modellen mild qua spierzwakte, en andere zeer zwaar aangedaan. Door het verschil in spierzwakte zullen de tijdstippen waarop de dieren gemeten zullen worden dus ook verschillen. Onderstaande tabel geeft precies aan op welke leeftijd de verschillende modellen gemeten

worden; een tijdstip waarop het dier duidelijk spierzwakte vertoont ten opzichte van controle dieren.

<b>Genotype</b>	<b>Leeftijd</b>
<i>Acta1</i> (H40Y)	~3 maanden
Tg( <i>Acta1</i> )Asp286Gly	~4 maanden
<i>Neb</i> -cKO	~4 maanden
██████████	~6 maanden
██████████ (Dutch founder mutation)	~6 maanden

Op alle muizen zullen we drie belangrijke bepalingen doen om inzicht te krijgen in het effect van een spieractivator:

We bestuderen het effect van een spieractivator op (1) *in vitro* intacte spierfunctie, (2) *in vivo* uithoudingsvermogen en (3) *in vivo* ademhalingsfunctie.

De studie is opgedeeld in twee delen: eerst testen we het effect van *acute* toediening van een spieractivator op de bovengenoemde uitkomstmaten. Als deze studies significante verbetering van spierfunctie en uithoudingsvermogen laten zien, starten we de *chronische* studies waarbij een spieractivator wordt toegevoegd aan het voer.

---

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

---

#### *Pathofysiologie*

Om het inzicht in twee veelvoorkomende vormen van nemaline myopathie te vergroten, hebben we in twee verschillende muismodellen het betrokken eiwit gelabeld met een fluorescente probe. De lokalisatie en rol van deze eiwitten kunnen we bestuderen middels super-resolutie microscopie.

#### *Testen medicijn*

Nemaline myopathie komt voor in verschillende gradaties, mede omdat mutaties in verschillende genen kunnen leiden tot de spierziekte. We hebben de beschikking over vijf muismodellen voor nemaline myopathie, die verschillende mutaties dragen en voor zowel milde als ernstige varianten van de ziekte staan. Op deze dieren worden in totaal drie verschillende proeven gedaan (met cross-over design) om het effect van een spieractivator op intacte spierfunctie te onderzoeken.

#### *In vivo: uithoudingsvermogen*

Om te onderzoeken of toediening van een spieractivator de algemene prestatie van de muis verbetert zullen we de dieren op een loopband plaatsen en hun uithoudingsvermogen testen. Met een cross-over design zullen we het effect van een spieractivator op looptijd bestuderen.

#### *In vivo: ademhalingsfunctie*

Met name de ademhalingsspier (het diafragma) is vaak het meest aangedaan in nemaline myopathie, en falen van deze spier is in veel gevallen de doodsoorzaak. Om te onderzoeken of het *in vitro* effect op geïsoleerde diafragmaspiercellen te extrapoleren is naar verbetering van *in vivo* condities, meten we ademhalingsfunctie *in vivo* met behulp van plethysmografie.

#### *In vitro: intacte spierfunctie*

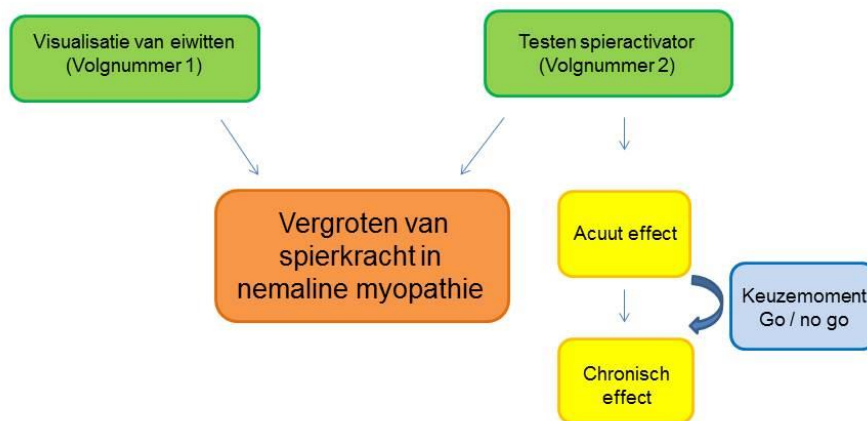
Het diafragma en perifere spieren worden gedissecteed voor intacte mechanica experimenten. Voor alle spieren zullen we tweemaal een standaard protocol voor spierfunctie draaien voor het bepalen van de (sub)maximale kracht, de vermoeibaarheid van de spier en de calciumhuishouding: eenmaal in aanwezigheid van een spieractivator, eenmaal met alleen placebo (met middel waarin een spieractivator is opgelost).

---

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

---

Ons hoofddoel 'Vergroten van spierkracht in nemaline myopathie' willen we bereiken door een tweeledige aanpak. De eerste strategie zal het ophelderen van de locatie en functie van 2 belangrijke eiwitten zijn in nemaline myopathie. Deze informatie kan in de toekomst leiden tot het testen van een specifiek medicijn dat aangrijpt op de nog te ontrafelen functie van de eiwitten. De tweede strategie betreft het testen van een nieuw medicijn dat beoogt algemene spierfunctie te versterken. Beide strategieën zullen inzicht geven in potentiële mechanismen om spierkracht te verhogen in nemaline myopathie. Het flowdiagram geeft de samenhang van de verschillende onderdelen aan. Per onderzoekslijn wordt daarna de fasering beschreven (mits aanwezig).



#### Pathofysiologie

De nog onbekende rol van twee belangrijke eiwitten die betrokken zijn bij skeletspierzwakte zal worden opgehelderd door ze fluorescent te labelen en functie in kaart te brengen (volgnummer 1).

#### Testen medicijn

Om spierzwakte in skeletspieren tegen te gaan zal het effect van een spieractivator getest worden op intacte spierfunctie, *in vivo* ademhalingsfunctie en *in vivo* uithoudingsvermogen.

##### Fase 1: acuut effect

Eerst zal het effect van *acuut* toedienen van een spieractivator worden getest op intacte spierfunctie, *in vivo* ademhalingsfunctie en *in vivo* uithoudingsvermogen (volgnummer 2).

##### Fase 2: chronisch effect

Als dit tot significante verbetering van spierfunctie leidt, wordt ook het *chronische* effect van een spieractivator getest op intacte spierfunctie, *in vivo* ademhalingsfunctie en *in vivo* uithoudingsvermogen (volgnummer 2).

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Visualisatie van skeletspiereiwitten

2	<i>In vitro</i> en <i>in vivo</i> skeletspierfunctie
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



## Format

### Niet-technische samenvatting

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

### 1 Algemene gegevens

- |                              |   |
|------------------------------|---|
| 1.1 Titel van het project    | Waardoor vermindert spierfunctie bij aangeboren spierafwijkingen en wat kunnen we er tegen doen?  |
| 1.2 Looptijd van het project | 5 jaar (deze duur is realistisch gezien de fokschema's van de dieren, de oude leeftijd waarop sommige diermodellen worden bestudeerd, en de tijdrovende fysiologische experimenten) |
| 1.3 Trefwoorden (maximaal 5) | Skeletspierfunctie, aangeboren spierziekte, nemaline myopathie, medicijn  |

### 2 Categorie van het project

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

### 3 Projectbeschrijving

- |   |   |
|---|---|
| 3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang) | <p>Goed werkende spieren zijn noodzakelijk voor het dagelijkse leven: zwakte van skeletspieren (zoals die van het middenrif, de belangrijkste ademhalingspier) kan leiden tot verslechtering van de kwaliteit van leven en tot een vroegtijdige dood. materiaal, waardoor er zieke spieren worden aangemaakt. Een voorbeeld Verminderde spierfunctie kan zowel aangeboren als verworven zijn. Wanneer een spierziekte aangeboren is, zitten er vanaf de geboorte al fouten in het erfelijk hiervan is de erfelijke skeletspierziekte nemaline myopathie: patiënten met nemaline myopathie hebben spierzwakte omdat de spieren niet goed kunnen samentrekken.</p> <p>Om de kwaliteit van leven van patiënten met nemaline myopathie te</p> |
|---|---|

verbeteren stellen wij het volgende onderzoek voor, onderzoek welke uit twee onderdelen bestaat: (1) het bestuderen van de oorzaken van afgenomen spierfunctie en (2) het testen van een veelbelovend medicijn om spierfunctie te herstellen.

We maken gebruik van zowel patiëntmateriaal om de oorzaken van afgenomen spierfunctie te begrijpen, maar ook van proefdieren. De proefdieren bieden ons de mogelijkheid om zowel tot in het kleinste detail als op het niveau van algemene lichaamsfunctie de oorzaken van afgenomen spierfunctie te bestuderen en het effect van nieuwe medicijnen te testen. Zo kunnen we zowel het effect van een erfelijke fout onderzoeken op de kleine eiwitten die onze spier doen samentrekken, maar kunnen we ook bestuderen hoe dit het uithoudingsvermogen van een organisme beïnvloedt. Daarnaast kunnen we bestuderen wat de effecten zijn van een nieuw medicijn - dat aangrijpt op skeletspieren - op het lichaam als geheel. Met de verworven inzichten hopen we een stap dichterbij therapieën te komen.

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

Ons doel is nieuwe aangrijpingspunten te vinden om spierfunctie te verbeteren. De oorzaak van spierzwakte in patiënten met nemaline myopathie (incidentie 1:50.000) is nog steeds onduidelijk. Studies van onze groep en ook die van andere internationale onderzoeksgroepen hebben recent aangetoond dat veranderingen in de kleinste contractiele eenheden in de spier waarschijnlijk een belangrijke bijdrage leveren. Het doel van onze studies is deze veranderingen beter te begrijpen. Tevens willen we, in samenwerking met een farmaceutisch bedrijf uit de VS, testen of een nieuw medicijn, dat specifiek de functie van die kleinste contractiele eenheden verbetert, spierzwakte vermindert. Met de verworven inzichten hopen we een stap dichterbij therapieën te komen. Helaas kunnen deze inzichten niet meteen in patiënten vergaard worden, maar moeten deze in eerste instantie in proefdieren worden vergaard.

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

Muizen  
Volgnummer 1: 400  
Volgnummer 2: 320

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

Dieren kunnen negatieve gevolgen ervaren bij het injecteren van vloeistoffen en het blootstellen aan anesthetica. Daarnaast kan ook de spierzwakte die de proefdieren ontwikkelen door veranderingen in hun genen leiden tot ongerief.

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

Maximaal matig ongerief

3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?

Na afloop van het onderzoek worden de dieren op humane wijze gedood en wordt er zo veel als mogelijk weefsel opgeslagen voor analyses: hart- en skeletspieren, bloedvaten en vet.

## 4 Drie V's

4.1 **Vervanging**  
Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig

Het onderzoeken van de onderliggende processen bij spierziekten is complex: interacties tussen diverse systemen in het lichaam spelen een rol. Deze interacties maken het noodzakelijk om deze processen in het intacte

is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.

dier te onderzoeken.

#### 4.2 **Vermindering**

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

Benadrukt dient te worden dat er wordt gestreefd naar een optimaal 'gebruik' van het proefdier middels het uitvoeren van verschillende analyses in één dier. Ook proberen we de studies zo slim mogelijk op te zetten, dat zo min mogelijk dieren nodig zijn om antwoord te vinden op de gestelde vragen. Een voorbeeld hiervan zijn de experimenten om een nieuw medicijn te testen. Omdat we gebruik maken van een cross-over opzet, dienen de dieren als hun eigen controle en halveren we hiermee het aantal benodigde proefdieren. Daarnaast investeren we in de aanschaf van goede apparatuur met een hoge meetnauwkeurigheid, zodat een zo laag mogelijk aantal dieren nodig is om verschillen tussen condities op te pikken. Ook hebben we extra apparatuur aangeschaft, zodat we meerdere spieren kunnen meten van hetzelfde dier - daar waar we hier voorheen, met de aanwezigheid van slechts 1 setup, meerdere dieren voor nodig hadden.

#### 4.3 **Verfijning**

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

We hebben gekozen voor de muis. Deze keuze is gemaakt omdat er diverse type muizen beschikbaar zijn die zich lenen om complexe fysiologische processen die ten grondslag liggen aan de verminderde spierfunctie te bestuderen.

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

Tijdens deze studie wordt er alles aan gedaan om het mogelijke ongerief voor de muizen te voorkomen: bij het transport van het proefdiercentrum naar het laboratorium wordt zo zorgvuldig mogelijk gehandeld om stress levels zo laag mogelijk te houden; de muizen zullen gedurende de experimenten nauwlettend in de gaten gehouden worden. Doding vindt plaats op humane wijze en onder volledige anesthesie, hetgeen het ongerief licht maakt. Pas wanneer de teenreflex volledig afwezig is, zal doding plaatsvinden.

## 5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11400	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	VUMC	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		1	Visualisatie van skeletspiereiwitten

*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Nemaline myopathie (NM) is een van de meest voorkomende aangeboren spierziekten. Vandaag de dag zijn er 10 genen bekend die betrokken zijn bij het ontstaan van NM. Er is echter nog geen medicijn voor handen. Dit komt met name omdat het ziekteproces nog niet duidelijk in kaart is gebracht. Van twee belangrijke eiwitten die betrokken zijn bij de ziekte, weten we niet (1) waar deze zich bevinden in de spier en (2) wat hun rol is in spierfunctie.

Daarom hebben we twee muismodellen gemaakt (de modellen zijn beschikbaar), waarbij we een fluorescente probe aan deze twee eiwitten hebben toegevoegd. Op deze manier kunnen we met behulp van super-resolutie microscopie de lokalisatie van de eiwitten precies in beeld brengen en inzicht krijgen in hun functie. Met het verworven inzicht hopen we spierzwakte beter te begrijpen, zodat we een gerichte therapie kunnen testen.

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

De dieren zullen onder anesthesie getermineerd worden, waarna vervolgens spieren zullen worden gedissecteed. Met behulp van super-resolutie microscopie zal de lokalisatie en functie van de eiwitten in beeld worden gebracht.

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

Per muismodel wordt de lokalisatie en functie van het eiwit op vier leeftijden vastgesteld: (1) neonataal, (2) 1 maand, (3) 3 maanden en (4) 1 jaar. Er zijn namelijk aanwijzingen dat de expressie en functie verandert met de tijd.

Het aantal benodigde dieren is lastig te schatten. De fluorescente probe die in het eiwit is ingebouwd is zelf een



eiwit (koraaleiwit) en blootstelling aan daglicht vermindert de foton-opbrengst van de probe. Dit betekent dat we spierweefsel niet lang kunnen opslaan in de vriezer, maar zo vers als mogelijk moeten gebruiken.

## **B. De dieren**

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

Per muismodel worden vier leeftijdsgroepen getest: (1) neonataal, (2) 1 maand, (3) 3 maanden en (4) 1 jaar.

Binnen ons vakgebied is een groepsgrootte van minimaal 10 dieren per parameter gebruikelijk om een betrouwbare uitspraak te kunnen doen over de exacte lokalisatie van een fluorescent eiwit. Aangezien we vers weefsel nodig hebben en we voor een 2-tal experimenten dezelfde spieren moeten gebruiken is het de verwachting dat we 20 knock-in en 20 wt muizen nodig hebben. We houden rekening met 25% uitval, (zeer lastige methodologie van isoleren materiaal en innovatieve microscopie), dus dat maakt een totaal van 25 knock-in en 25 wt muizen.

Een leeftijdsgroep bestaat in totaal uit 100 muizen. Dit komt dus op een totaal van  $4 * 50 = 200$  muizen per model. Omdat we in totaal 2 modellen gaan meten, komt het neer op en  $2 * 200 = 400$  muizen in totaal.

Geslacht: We maken gebruik van zowel vrouwtjes als mannetjes.

Herkomst: de twee muismodellen hebben we laten maken in een core-facility in de VS (University of Arizona). Zodra we goedkeuring verkrijgen, kunnen we de muizen naar Nederland overbrengen.

## **C. Hergebruik**

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

## **D. Vervanging, vermindering en verfijning**

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welke keuzes daarbij zijn gemaakt.

### *Vervanging*

Het onderzoeken van de lokalisatie en functie van grote en onbekende eiwitten (grote eiwit 1 = 800kD, de lokalisatie en functie van eiwit 2 is volledig onbekend) is een complex proces waarin de interacties tussen diverse fysiologische systemen in het lichaam een rol spelen. Deze interacties maken het noodzakelijk om de fysiologie in een intacte spier van een organisme te onderzoeken. Spieren in vissen of fruitvliegen (organismen die makkelijk genetisch gemodificeerd kunnen worden) hebben een andere structuur dan die in mensen en de eiwitten die de structuur bepalen hebben dikwijls een andere compositie. Om deze reden prefereren wij het gebruik van een zoogdier. Voor zover wij weten zijn muizen het enige zoogdier dat tot op heden relatief makkelijk genetisch te modificeren is. Om deze reden hebben we ervoor gekozen deze fluorescente probes in muizen in te bouwen. Het nadeel van een celcultuur is dat de spiereiwitten dikwijls in een embryonale/neonatale isovorm blijven steken en dat maak vergelijking met volwassen spieren onmogelijk. In muizen kunnen wel volwassen isovormen onderzocht worden.

### *Vermindering*

We zullen per leeftijdsgroep de resultaten evalueren. Het geschatte aantal proefdieren is een maximum. Als blijkt dat we met minder al de benodigde informatie hebben verzameld, zullen we minder dieren opnemen in het experiment. We werken met zeer innovatieve microscopie zodat we met de hoogste resolutie de lokalisatie van de eiwitten kunnen bepalen. Deze hoge resolutie draagt bij aan de vermindering van het aantal te gebruiken proefdieren.

### Verfijning

Tijdens deze studie wordt er alles aan gedaan om het mogelijke ongerief voor de muizen te voorkomen. De muizen zullen gedurende de huisvesting nauwlettend in de gaten gehouden worden. Terminatie vindt plaats onder volledige anesthesie, hetgeen het ongerief licht maakt.

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

Tijdens deze studie wordt er alles aan gedaan om het mogelijke ongerief voor de muizen te voorkomen. Dieren worden gemonitord tijdens huisvesting en het termineren vindt plaats onder anesthesie.

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

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

De beschreven proeven zijn nog nooit uitgevoerd. In de literatuur zijn de muismodellen ook niet beschreven.

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Omdat er geen experimentele procedures van toepassing zijn op de muizen, verwachten we geen aantasting van het welzijn. Het aanbrengen van de lichtgevende probe in het DNA van de dieren is in het verleden al eerder gedaan, dit resulteerde niet in aantasting van het welzijn. De muizen hebben geen spierzwakte.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

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

### J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Nee, omdat er geen experimentele handelingen worden uitgevoerd valt het niet te voorzien dat er zich omstandigheden voordoen om lijden van de dieren te voorkomen.

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

### K. Classificatie van ongerief

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

Soort ongerief	Kwalificatie	Percentage dieren
Vervoer naar afdeling	Licht	100%
Inductie anesthetica	Licht	100%
Termineren	Terminaal	100%

Het cumulatieve ongerief zal neerkomen op 'licht'.

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

Nee

Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

Het uitnemen van verse intacte spieren is inherent aan het experiment. Daarom kan hier dier daarna niet meer verder leven.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11400	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	VUMC	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		2	<i>In vitro</i> en <i>in vivo</i> skeletspierfunctie

*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Nemaline myopathie (NM) is de meest voorkomende aangeboren spierziekte binnen de groep van aandoeningen waarin verstoringen in het *samentrekken* van de spier leiden tot spierzwakte. Vandaag de dag zijn er 10 genen bekend die betrokken zijn bij het ontstaan van NM. Er is echter nog geen medicijn voor handen. Onlangs hebben we op *geïsoleerde enkele spiercellen* van NM patiënten een veelbelovende spieractivator getest die de spierkracht aanzienlijk verbeterd. Om de stap naar testen van deze stof in patiënten te maken is meer preklinisch werk noodzakelijk. We weten namelijk nog niet wat het effect van de spieractivator is op *intacte spieren* in NM.

Van voorgaande studies weten we dat een spieractivator spieren gevoeliger maakt voor calcium: bij een lager calciumconcentratie levert de spier al meer kracht. De verwachting is dat spieren bij aanwezigheid van een spieractivator minder calcium nodig hebben om dezelfde spierkracht te leveren. Omdat het rondpompen van calcium een grote aanspraak doet op onze energievoorraden, verwachten we dat bij gebruik van een spieractivator de muizen zuiniger met hun energie om kunnen gaan en uiteindelijk minder last hebben van vermoeidheid. Om de belangrijke volgende stap naar de haalbaarheid van een spieractivator voor toekomstig gebruik in NM te testen, zijn we genooddaakt om het effect op intacte spieren en *in vivo* functie te bepalen.

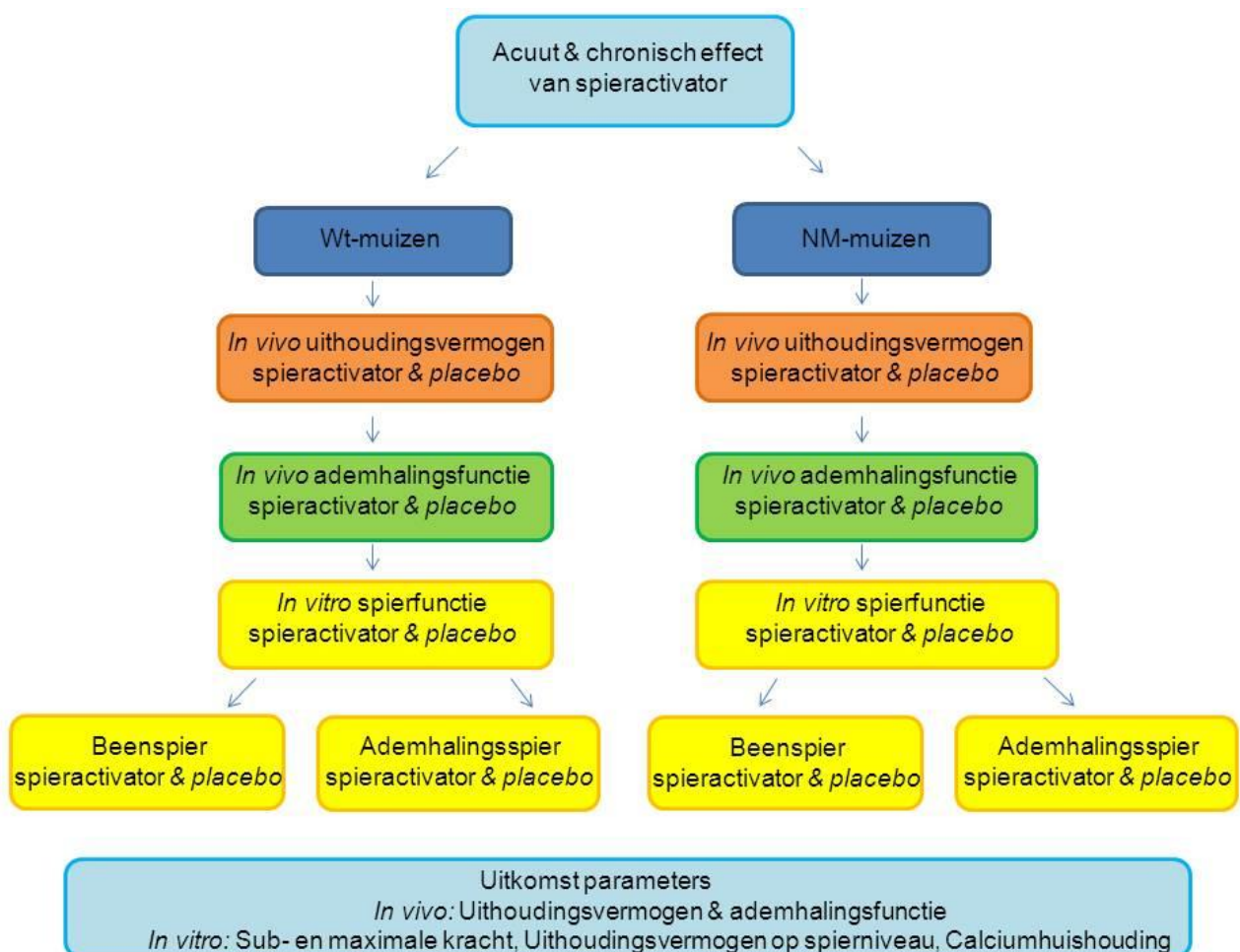
Daarom hebben we muismodellen gemaakt voor vijf verschillende vormen van NM: tezamen representeren zij ruim driekwart van de gevallen binnen de spierziekte: van milde tot zeer ernstige zwakte, van zeer kleine tot grote en recent ontdekte eiwitten die betrokken zijn bij de ziekte. Op dezelfde muizen zullen we drie belangrijke bepalingen doen om inzicht te krijgen in het effect van een spieractivator op intacte spierfunctie, uithoudingsvermogen en ademhalingsfunctie.

*In vitro* intacte spierfunctie geeft inzicht in hoeveel kracht een spier kan leveren bij sub-maximale en maximale stimulatie. Daarnaast verschaft het inzicht in het uithoudingsvermogen van de spier. Dit zou een belangrijk mechanisme zijn in het verminderen van de vermoeidheid van NM patiënten.

*In vivo* bepalingen zijn van uiterst belang om te onderzoeken hoe het lichaam als geheel reageert op een spieractivator. We bepalen het uithoudingsvermogen van de muizen op een loopband om te bepalen of een spieractivator de algehele lichaamsprestatie verbetert. Daarnaast kijken we naar *in vivo* ademhalingsfunctie. De ademhalingspier is een vaak aangedane spier in NM, en falen van deze spier is de meest voorkomende doodsoorzaak. Daarom is het verbeteren van ademhalingsfunctie van vitaal belang voor NM patiënten. We meten de ademhalingsfunctie met een plethysmograaf, welke als uitkomstparameters het ademminuutvolume, de inhaleercapaciteit en de ademfrequentie geeft.

De studie is opgedeeld in twee delen: eerst testen we het effect van *acute* toediening van een spieractivator op de bovengenoemde uitkomstmaten. Als deze studies significante verbetering van spierfunctie en uithoudingsvermogen laten zien, starten we de *chronische* studies. Vanaf drie weken na de geboorte, als de muizen niet meer van de moeder afhankelijk zijn, wordt de spieractivator aan het voer toegevoegd.

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



Per NM muismodel worden er twee groepen muizen gemeten: Het NM-model en een Wildtype van gelijke leeftijd en geslacht. Op deze dieren worden in totaal drie verschillende proeven gedaan (met cross-over design) om het effect van een spieractivator op spierfunctie te onderzoeken. Het flow-diagram hierboven geeft het design van de studie schematisch weer. Hieronder zullen we de verschillende proeven toelichten.

Á  
*In vivo: uithoudingsvermogen*

Om te onderzoeken of toediening van een spieractivator de algemene prestatie van de muis verbetert zullen we de dieren op een loopband plaatsen en hun uithoudingsvermogen testen. Als de muis het tempo niet meer bij kan benen wordt het experiment gestopt en de looptijd genoteerd. Wegens een cross-over design zullen we het effect van een spieractivator op looptijd bestuderen.

#### *In vivo: ademhalingsfunctie*

Met name de ademhalingspier is vaak het meest aangedaan in NM, en falen van deze spier is in veel gevallen de doodsoorzaak. Om te onderzoeken of het *in vitro* effect op geïsoleerde diaframacellen te extrapoleren is naar verbetering van *in vivo* condities, meten we diafragmafunctie (de belangrijkste ademhalingspier) *in vivo* met plethysmografie. Dit is een non-invasieve manier om de functie van het diafragma en ademhaling te bestuderen.

#### *In vitro: intacte spierfunctie*

De muis zal onder anesthesie gestrekt worden. Vervolgens worden het diafragma en perifere spieren gedissecteed voor intacte mechanica experimenten. Voor alle spieren zullen we tweemaal een standaard protocol voor spierfunctie uitvoeren voor het bepalen van de (sub)maximale kracht, de vermoeibaarheid van de spier en de calciumhuishouding: eenmaal in aanwezigheid van een spieractivator, eenmaal met alleen placebo (met middel waarin de spieractivator is opgelost).

De overige skeletspieren van beide benen en de hartspieren worden gedissecteed, gewogen en bewaard voor verdere analyses.

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

De benodigde groepsgrootte is geschat aan de hand van een power-analyse. De poweranalyse is uitgevoerd aan de hand van de magnitude van zwakte in diafragma- en beenspieren zoals die eerder is gevonden bij intacte mechanica op Wt en NM muizen: 15%. Met een standaarddeviatie die ongeveer 12% bedraagt in de wildtype groep en ongeveer 12% in de NM groep, met een significantie  $\alpha=0.05$  en een power  $\pi=0.9$  zullen we dan per groep 13 muizen nodig hebben. We houden rekening met 20% uitval, omdat uit ervaring blijkt dat de methode (*in vitro* intacte mechanica) lastig is en daarom onderhevig is aan relatief grote uitval. Daarom verwachten we een totaal van 16 muizen nodig te hebben. Dit maakt in totaal 32 muizen per leeftijdsgroep (16 NM en 16 Wt).

## **B. De dieren**

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

Per NM muismodel wordt eerst het effect van *acute* toediening van een spieractivator getest op 32 muizen (16 Wt en 16 NM). Dit komt dus op een totaal van  $5 * 32 = 160$  muizen. Bij een positieve evaluatie van acute toediening van de spieractivator (*in vivo* en *in vitro* spierfunctie neemt significant toe), wordt het *chronische* effect van de spieractivator getest op dezelfde parameters (dus gelijk aantal dieren per NM muismodel), dus wederom  $5 * 32 = 160$  dieren. In totaal gaat het dan om 320 dieren.

Geslacht: We maken gebruik van alleen mannetjes. De reden hiervoor is dat uit de literatuur blijkt dat spierfunctie in vrouwtjes onderhevig is aan hormonale schommelingen en daardoor ongewenste variatie introduceert (Ogawa *et al.*, 2015; Colson *et al.*, 2015). Het gebruik van vrouwtjes zal de spreiding op data vergroten, waardoor er meer dieren nodig zijn om bepaalde effecten aan te tonen.

De mate van spierzwakte die de verschillende muismodellen ontwikkelen verschilt per genotype. We zullen op die leeftijd meten, dat aanzienlijke spierzwakte optreedt. Zie hieronder voor een overzicht van de te meten leeftijd en afkomst.

<b>Genotype</b>	<b>Leeftijd</b>	<b>Oorsprong</b>
<i>Acta1</i> (H40Y)	~3 maanden	The University of Western Australia
Tg( <i>Acta1</i> )Asp286Gly	~4 maanden	The University of Western Australia
<i>Neb</i> -cKO	~4 maanden	University of Arizona
██████████	~6 maanden	UPC Amsterdam
██████████ (Dutch founder mutation)	~6 maanden	University of Arizona

## **C. Hergebruik**

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

#### **D. Vervanging, vermindering en verfijning**

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welke keuzes daarbij zijn gemaakt.

##### *Vervanging*

Het onderzoeken van de effecten van een spieractivator, een nieuwe veelbelovende stof om spierkracht te vergoten, is een complex proces waarin de interacties tussen diverse systemen in het lichaam een rol spelen. Deze interacties maken het noodzakelijk om de (patho)fysiologie in het intacte dier te onderzoeken.

##### *Vermindering*

Benadrukt dient te worden dat er wordt gestreefd naar een optimaal 'gebruik' van het proefdier middels het uitvoeren van verschillende analyses in één dier: zowel het effect van de spieractivator op *in vivo* uithoudingsvermogen, *in vivo* ademhalingsfunctie en *in vitro* skeletspierfunctie worden in één dier getest. Met de aanschaf van een extra setup voor het meten van intacte spieren kunnen we nu voor het eerst meerdere spieren meten van hetzelfde dier, daar waar we er tot nu toe – met de aanwezigheid van slechts één setup – drie dieren voor nodig hadden. Per dier wordt er op drie typen spieren getest wat het effect van de spieractivator is vergeleken met een placebo conditie. Zo dient het dier als eigen controle en hebben we geen controle groepen nodig (dit halveert het aantal benodigde proefdieren). Nadat de drie hierboven genoemde experimenten zijn uitgevoerd, worden er nog meer bepalingen op de spieren van de dieren gedaan, om zoveel mogelijk te leren van het effect van de spieractivator op spiergrootte, ultrastructuur en expressie van diverse eiwitten. Daarnaast bestuderen we de pathofysiologie van de verschillende soorten NM: mitochondriële functiebepalingen, eiwitexpressie, ultrastructuur, microscopie en metingen aan zowel geïsoleerde hart- als skeletspiercellen.

##### *Verfijning*

Tijdens deze studie wordt er alles aan gedaan om het mogelijke ongerief voor de muizen te voorkomen. De muizen zullen gedurende de experimenten nauwlettend in de gaten gehouden worden. Terminatie vindt plaats onder volledige anesthesie, hetgeen het ongerief licht maakt.

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

Tijdens deze studie wordt er alles aan gedaan om het mogelijke ongerief voor de muizen te voorkomen. Naar aanleiding van eerdere studies op de loopband en in de plethysmograaf, verwachten we echter dat de dieren geen last hebben van de experimentele bepalingen.

## **Herhaling en duplicering**

### **E. Herhaling**

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

Het nemaline myopathie veld werkt internationaal goed samen. We weten van elkaar welke proeven er worden gedaan. Er zijn geen andere labs die deze experimenten uitvoeren. Daarnaast werken we nauw samen met het bedrijf dat de spieractivator ontwikkelt. Zij hebben overzicht van alle studies met de spieractivator. Tot voor kort werd de stof alleen getest op modellen waarin de spier minder neuronale input heeft, zoals bij ALS, MS of Myasthenia Gravis. Onze NM modellen zijn de eerste modellen met sarcomeerdysfunctie waarin de

spieractivator getest wordt. Deze modellen hebben een intacte neuronale input, dus het is zeer interessant om te onderzoeken hoe deze dieren reageren op de spieractivator.

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Omdat er genetisch een spierziekte wordt geïnduceerd, verwachten we dat de spieren zwak kunnen zijn. De looptest en de ademhalingstest geven matig ongerief. De muizen worden op een loopband gedwongen te rennen. Tijdens de ademhalingstest zitten ze gedurende een uur in een kleine kooi. We weten uit de literatuur dat dit hun ademfrequentie verhoogt (welke na een uur normaliseert). Andere vormen van welzijnsaantasting worden niet verwacht (op basis van ervaring uit het verleden, er is al ervaring met de diverse muismodellen).

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Het aanbrenge van de mutatie in de genen van de muizen induceert spierzwakte.

De verhoogde stress tijdens de testen komt door het gedwongen rennen (looptest) en door de blootstelling aan en nieuwe, kleine kooi (ademhalingstest).



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

De dieren zullen uitgebreid gemonitord worden op symptomen van welzijnsaantasting. Blootstelling aan de stress als gevolg van de looptest en ademhalingstest is helaas niet te voorkomen.

#### J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Kenmerk van de spierziekte is dat bewegen bemoeilijkt is door zwakke spieren. De dieren zullen gemonitord worden op beweeglijkheid. Dit gebeurt op basis van visuele inspectie. Daarnaast zullen de dieren om de 3 dagen gewogen worden. Wanneer de muizen meer dan >20% van hun maximaal gewogen lichaamsgewicht verliezen zullen de muizen geëuthaniseerd worden.

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

Nihil <1%

#### K. Classificatie van ongerief

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

De *in vivo* experimenten, het transport naar [REDACTED] en het termineren onder isofluraan zijn allen handelingen die tot gering of hooguit licht ongerief zullen zorgen.

Hieronder een overzicht van het ongerief per handeling. Het cumulatieve ongerief zal neerkomen op 'matig'.

Soort ongerief	Kwalificatie	Percentage dieren
Looptest	Matig	100%
IP injectie (2x)	Licht	100%
Ademhalingstest	Matig	100%
IP injectie (2x)	Licht	100%
Vervoer naar afdeling	Licht	100%
Inductie anesthetica	Licht	100%

### Einde experiment

#### L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

Nee

Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

Bij het terminale experiment worden intacte spieren uitgenomen voor *in vitro* studies. Het is ethisch en fysiologisch niet mogelijk zonder beenspieren en ademhalingsspier verder te leven.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja

# DEC-advies

---

## A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer:

2. Titel van het project:

*Waardoor vermindert spierfunctie bij aangeboren spierafwijkingen en wat kunnen we er tegen doen?*

3. Titel van de NTS:

*Waardoor vermindert spierfunctie bij aangeboren spierafwijkingen en wat kunnen we er tegen doen?*

4. Type aanvraag:

- nieuwe aanvraag projectvergunning*
- wijziging van vergunning met nummer

5. Contactgegevens DEC:

- naam DEC: *Vrije Universiteit Amsterdam / VU medisch centrum*
- telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
- mailadres contactpersoon: [REDACTED]

6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):

- ontvangen door DEC: 17-12-2015*
- aanvraag compleet: 17-12-2015*
- in vergadering besproken: 12-1-2016*
- anderszins behandeld: *n.v.t.*
- termijnonderbreking(en) van / tot: *n.v.t.*
- besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen: *n.v.t.*
- aanpassing aanvraag: n.v.t.*
- advies aan CCD: 31-03-2016*

7. Eventueel horen van aanvrager: *n.v.t.*

8. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: *18-1-2016 en 3-2-2016*

- Strekking van de vraag / vragen:

*De DEC is van mening dat de strategie en het doel beter moeten worden toegelicht. Er moet meer achtergrondinformatie komen over de twee eiwitten die onderzocht worden, waarom kiest men voor deze twee en welke kennis heeft men over deze eiwitten? De samenhang tussen beide subdoelen moet worden toegelicht. De fasering en keuzemomenten moeten duidelijker naar voren komen. Bovendien moet er nog even een spellingscheck worden uitgevoerd.*

- Datum antwoord: 1-2-2016 en 10-2-2016

- Strekking van het (de) antwoord(en):

*De gevraagde aanpassingen zijn doorgevoerd en de toelichting is gegeven.*

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag: *Ja*

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

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

1. *Het project is vergunning plichtig. Het omvat dierproeven in de zin der wet.*
2. *De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.*
3. *De DEC is competent om over deze projectvergunningaanvraag te adviseren. De benodigde expertise op dit wetenschappelijk terrein is aanwezig binnen de DEC.*
4. *Vanwege betrokkenheid bij het betreffende project is een aantal DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken bij de advisering: n.v.t. (geen van de DEC-leden is betrokken bij het betreffende project)*

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

1. Het project is:

- ✓ *uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord*
- *uit onderwijskundig oogpunt verantwoord*
- *uit het oogpunt van productiedoelinden verantwoord*
- *wettelijk vereist*

2. *De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën fundamenteel en toegepast onderzoek zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling.*

*Het hoofddoel van deze studie is om meer inzicht verkrijgen over de onderliggende mechanismen van spierzwakte bij patiënten met aangeboren nemaline myopathie en om nieuwe behandelingsmethoden te onderzoeken. Dit zal worden onderzocht door een beter inzicht te verwerven in de pathofysiologie van spierzwakte en het testen van een spieractivator. Het uiteindelijke doel is om de kwaliteit van leven van patiënten met nemaline myopathie te verbeteren. De bevindingen zullen niet alleen van toepassing zijn op patiënten met nemaline myopathie, maar ook bij mensen met afgenomen spierfunctie door andere oorzaken, bijvoorbeeld een verminderde spieractivatie bij veroudering en diverse andere spierziektebeelden.*

3. *De DEC onderschrijft het wetenschappelijke en maatschappelijke belang van de doelstelling, te weten:*

*Het wetenschappelijk belang: Spierzwakte is een grote belemmering in het dagelijks leven van mensen met een spierziekte, in de revalidatie en bij ouderen. Nemaline myopathie (NM) is een van de meest voorkomende aangeboren spierziekten. Er is echter nog geen medicijn voor handen, dit komt vooral omdat het ziekteproces nog niet duidelijk in kaart is*

*gebracht. Van twee belangrijke eiwitten die betrokken zijn bij de ziekte willen de onderzoekers de lokalisatie bepalen om zo beter inzicht verkrijgen in de functie van deze eiwitten.*

*Het maatschappelijk belang: De verkregen kennis over de lokalisatie van de eiwitten kan bijdragen aan het beter begrijpen van de onderliggende biologische processen van de pathologie en dit kan bijdragen aan het opstellen van nieuwe/verbeterde therapieën. De onderzoekers gaan een nieuw mogelijk medicijn, een spieractivator testen. Dankzij dit geplande experiment komt men veel te weten over de effectiviteit van een spieractivator, zodat een gerichte therapie kan worden ontwikkeld. De bevindingen kunnen hopelijk de kwaliteit van leven van nemaline myopathie patiënten verbeteren. De resultaten van dit onderzoek zullen niet alleen van toepassing zijn op patiënten met nemaline myopathie, maar ook mensen met afgenomen spierfunctie door andere oorzaken. Het maatschappelijk belang van dit onderzoek is daarom, naar de mening van de DEC, substantieel.*

*Door dit onderzoek ontstaat er meer kennis over de pathofysiologie van spierzwakte en over de effectiviteit van een spieractivator. Het wetenschappelijke belang wordt door de DEC ingeschat als reëel, het maatschappelijk belang als substantieel.*

- 4. Naar de overtuiging van de DEC beschikt de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen om de projectdoelstelling met de gekozen strategie/aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren.*

*Binnen de onderzoeksgroep is zowel voldoende deskundigheid als financiering aanwezig om het project succesvol uit te voeren. De onderzoekers hebben ruime ervaring met de voorgestelde experimenten en alle technische voorzieningen die benodigd zijn voor uitvoering van het project zijn voorhanden, dit waarborgt het technisch succesvol uitvoeren van de dierexperimenten. Bovendien wordt er nauw samengewerkt met andere (internationale) onderzoeksinstituten in het veld van nemaline myopathie, om ervoor te zorgen dat de proeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Ook hebben de onderzoekers nauw contact met het bedrijf dat de spieractivator ontwikkelt. Dit bedrijf heeft een overzicht van alle studies met de spieractivator, welke eerder is getest met modellen waarin de spier een verminderde neuronale input ontvangt, zoals bij ALS, MS of Myasthenia Gravis. De gebruikte NM modellen in deze studie zijn de eerste modellen met sarcomeerdysfunctie waarin de spieractivator getest wordt. Eerder gevonden resultaten maken het aannemelijk dat de voorgestelde therapie op een gunstig effect zal wijzen.*

*De DEC acht het reëel om te veronderstellen dat op basis van de resultaten van de voorgenomen experimenten beschreven in het project nieuwe en/of aanvullende inzichten over nemaline myopathie en over de effectiviteit van een spieractivator als mogelijke therapie in nemaline myopathie zullen worden verkregen. De gevraagde looptijd van 5 jaar acht de DEC reëel gezien de fokschema's van de dieren, de leeftijd waarop sommige diermodellen worden bestudeerd en de langdurende fysiologische experimenten.*

*De aanvraag heeft een navolgbare opbouw. De onderzoekers betogen dat het hoofddoel zal worden bereikt door een tweeledige aanpak: 1) het ophelderen van de locatie en functie van twee belangrijke eiwitten in nemaline myopathie; de voorgestelde experimenten zullen naar het inzicht van de DEC resulteren in het behalen van dit subdoel,*

en 2) het testen van een specifiek medicijn dat beoogt de algemene spierfunctie te versterken en dat aangrijpt op de nog te ontrafelen functie van de eiwitten; de voorgestelde experimenten zullen naar het inzicht van de DEC resulteren in het behalen van dit subdoel. Beide strategieën zullen inzicht geven in potentiële mechanismen om spierkracht te verhogen in nemaline myopathie. Er is sprake van een duidelijk geformuleerd hoofddoel; de DEC heeft geconstateerd dat de twee subdoelen weliswaar beide bijdragen aan het inzicht in het verloop van de ziekte, maar dat er geen duidelijke afhankelijkheid is tussen de beide subdoelen.

5. Alle dieren worden gefokt voor het gebruik in dierproeven, er is geen sprake van afwijkende huisvesting en/of hergebruik. Er is geen sprake van bedreigde diersoorten, niet-menselijke primaten, zwerfdieren en/of dieren in/uit het wild. De toegepaste methoden voor anesthesie/euthanasie zijn conform de Richtlijn.
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is naar de mening van de DEC door de aanvragers realistisch ingeschat en geclassificeerd.

Het verwachte ongerief is licht tot matig. Licht ongerief wordt verwacht als gevolg van het vervoer, de inductie van anesthetica en de IP injecties. De dieren zullen een hoger stresslevel hebben tijdens de looptest (door het gedwongen rennen) en tijdens de ademhalingstest (door de blootstelling aan een nieuwe kleine kooi gedurende een uur, waardoor hun ademfrequentie tijdelijk wordt verhoogd) dit zorgt voor matig ongerief. Blootstelling aan de stress als gevolg van de testen is niet te voorkomen. Ernstig ongerief wordt niet verwacht.

Omdat er genetisch (mutatie van genen) een spierziekte wordt geïnduceerd, kunnen de spieren van de dieren zwak zijn. De dieren zullen gemonitord worden op symptomen van welzijnsaantasting zoals beweeglijkheid en gewicht, om zo het ongerief te minimaliseren. Wanneer de dieren meer dan 20% van hun maximaal gewogen lichaamsgewicht verliezen of er meer dan matig ongerief optreedt dan wordt het experiment beëindigd en worden de betreffende dieren geëuthanaseerd.

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

Voor het onderzoeken van de lokalisatie en functie van de eiwitten en het onderzoeken van de effecten van een spieractivator is het gebruik van diermodellen onvermijdelijk. Beide zijn complexe processen waarin de interacties tussen diverse fysiologische systemen in het lichaam een rol spelen, deze interacties maken het noodzakelijk om de fysiologie in een intacte spier van een organisme te onderzoeken.

Spieren in vissen of fruitvliegen (organismen die makkelijk genetisch gemodificeerd kunnen worden) hebben een andere structuur en eiwitcompositie dan die in mensen, om deze reden gebruikt men hier zoogdieren. De onderzoekers hebben hier gekozen voor muizen omdat deze dieren makkelijk genetisch te modificeren zijn en de benodigde transgene modellen al zijn gegenereerd. Onderzoek naar spieren in een celcultuur heeft als nadeel dat

*de spiereiwitten in een embryonale/neonatale isovorm kunnen blijven, wat de vergelijking met volwassen spieren onmogelijk maakt. In muizen kunnen wel volwassen isovormen onderzocht worden, daarom is het gebruik van proefdieren noodzakelijk.*

*Tijdens het onderzoek zal men bij dierproeftype 1 zowel vrouwtjes als mannetjes gebruiken. Bij dierproeftype 2 gebruikt men alleen mannelijke dieren. De reden hiervoor is dat de spierfunctie/spierzwakte van vrouwelijke dieren onderhevig is aan hormonale schommelingen, waardoor ongewenste variatie in de data ontstaat. Door alleen mannetjes te gebruiken vermindert men het gebruik van extra dieren die nodig zijn om deze variatie te verkleinen.*

8. *In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven.*

*Door het gefaseerd uitvoeren van de experimenten en een poweranalyse wordt voorkomen dat er teveel of te weinig dieren worden gebruikt. Het maximale aantal proefdieren is proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd. De DEC onderschrijft dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 720 muizen, en acht dit aantal realistisch onderbouwd.*

*Onnodige duplicatie van experimenten wordt voorkomen doordat de onderzoekers goed bekend zijn met het onderzoeksveld en samenwerken met de andere onderzoeksgroepen die vergelijkbaar onderzoek verrichten. De onderzoeksgroep werkt met zeer innovatieve microscopie, zodat ze met hoge resolutie de lokalisatie van de eiwitten kunnen bepalen, waardoor het aantal te gebruiken proefdieren minimaal is. Bovendien vinden er meerdere analyses plaats in één dier en kan men dankzij nieuwe apparatuur meerdere spiertypen meten in hetzelfde dier, zodat er optimaal gebruik wordt gemaakt van het aantal dieren. Tevens zijn de experimenten zo opgezet dat de dieren als eigen controle kunnen dienen, waardoor geen extra controle groepen nodig zijn.*

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

*Om het ongerief te minimaliseren worden alle handelingen door ervaren/bekwame onderzoekers en diervverzorgers uitgevoerd. De dieren worden nauwlettend in de gaten gehouden om ongerief te voorkomen en/of te minimaliseren. Mochten er onvoorziene complicaties optreden die meer dan matig ongerief veroorzaken dan wordt op basis van de geformuleerde humane eindpunten het experiment onmiddellijk beëindigd.*

*Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.*

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

## **D. Ethische afweging**

*Volgens de DEC rechtvaardigen de doeleinden van dit project het voorgestelde gebruik van dieren. Het doel van is om meer inzicht vergaren over de onderliggende mechanismen van spierzwakte bij patiënten met nemaline myopathie en om nieuwe behandelingsmethoden te onderzoeken.*

*Het verwachte resultaat, het verbeteren van de kwaliteit van leven van patiënten met spierzwakte (o.a. bij nemaline myopathie), is afgewogen tegen het, maximaal als matig ingeschatte ongerief, aantasting van integriteit en het doden van de dieren in de proef. De DEC onderschrijft dat de doelstellingen niet zonder het gebruik van proefdieren kunnen worden behaald en acht het gebruik van maximaal 720 muizen en de daarmee samenhangende schade aan deze dieren gerechtvaardigd.*

*Het wetenschappelijke belang wordt door de DEC ingeschat als reëel en het maatschappelijke belang als substantieel. De resultaten zullen bijdragen aan het verkrijgen van meer inzicht in spierzwakte en het ontwikkelen van een nieuwe therapie voor patiënten met nemaline myopathie. Op termijn kunnen de uitkomsten van het project leiden tot betere/effectievere behandelingsmethoden voor de patiënten met spierzwakte.*

*De DEC is van mening dat dit project verantwoord is vanuit wetenschappelijk oogpunt en acht het waarschijnlijk dat de projectdoelstelling binnen de gevraagde termijn wordt behaald. Er is sprake van een hoofddoelstelling (inzicht verwerven in de pathofysiologie van spierzwakte en het testen van een nieuwe medicijn) maar de DEC heeft geconstateerd dat er er feitelijk sprake is van twee tamelijk eigenstandige subdoelen; de nieuwe kennis over de lokalisatie van de eiwitten is geen noodzakelijke voorwaarden tot het uitvoeren van de experimenten met het nieuwe medicijn. Wij achten echter een onverdeeld advies over dit onderzoek toch mogelijk, omdat de waarden en belangen van de deelprojecten onderling niet afwijken en omdat de wetenschappelijke aard van het onderzoek zeer verwant is in beide deelprojecten. Er is er voldoende nauw verband tussen de deelprojecten in ethisch opzicht vaststelbaar. Beide subdoelen zijn elk apart voldoende belangrijk en wegen genoeg op tegen de mate waarin de dieren worden geschaad. Vandaar dat wij toch unaniem op dit punt het voorgestelde project als geheel toetsbaar hebben geacht.*

*De onderzoekers beschikken over ruime ervaring en kennis op het gebied van de te gebruiken methoden en werken nauw samen met andere onderzoeksgroepen. Dit in combinatie met de beschikbare faciliteiten en infrastructuur betekent dat de onderzoekers goed gekwalificeerd en geoutilleerd zijn voor het uitvoeren van het in dit project beschreven onderzoek.*

*Bij het uitvoeren van de dierproeven wordt een adequate invulling gegeven aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en verfijning van de dierproeven. Het project is van reëel wetenschappelijk en substantieel maatschappelijk belang en van goede kwaliteit. Samenvattend kan worden gesteld dat het belang van het onderzoek naar het oordeel van de DEC opweegt tegen het gebruik van maximaal 720 muizen en het daarbij verwachte maximale matige ongerief.*

## E. Advies

### 1. Advies aan de CCD

- De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen
- De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
- ✓ *De DEC adviseert de vergunning te verlenen*

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

### 3. Dilemma bij deze aanvraag

*Binnen de DEC is discussie geweest over de toetsbare eenheid van de aanvraag. Volgens sommigen is er sprake van een duidelijke eenheid omdat het weliswaar gaat om twee verschillende benaderingen maar met uiteindelijk dezelfde hoofddoelstelling. Anderen binnen de commissie vinden logische samenhang tussen beide subdoelen onvoldoende duidelijk en vinden dat er eerder sprake is van twee eigenstandige projecten; een fundamenteel wetenschappelijk project (de lokalisatie van de eiwitten betrokken bij NM) en daarnaast een translationeel project (het testen van een nieuw medicijn), min of meer toevallig in het kader van het onderzoek naar dezelfde aandoening.*

*Ondanks dit knelpunt is de DEC van mening dat de ethische afweging niet wezenlijk wordt gecompliceerd, terwijl de CCD hier om een eigenstandige beoordeling lijkt te vragen zoals aangegeven in haar (concept)-handreikingen. Wij achten een onverdeeld advies over dit project desondanks goed mogelijk, omdat de waarden en belangen van de deelprojecten onderling niet afwijken en omdat de wetenschappelijke aard van het onderzoek wel zeer verwant is in beide deelprojecten en beide projecten goed onderbouwd zijn in termen van doelstelling, uitvoering en gevolgen voor het ongerief van de betrokken proefdieren. Zelfs als de hoofddoelstelling in logische zin enigszins vaag is, is er wel een voldoende nauw verband tussen de deelprojecten in ethisch opzicht vaststelbaar.*





> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Medisch Centrum



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD114002016501

**Bijlagen**

2

Datum 1 april 2016

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 31 maart 2016.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD114002016501. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

**Wacht met de uitvoering van uw project**

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

**Factuur**

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

**Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

## Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 11400  
Naam instelling of organisatie: Vrije Universiteit Medisch Centrum  
Naam portefeuillehouder of  
diens gemachtigde: [REDACTED]  
KvK-nummer: 64156338  
Straat en huisnummer: De Boelelaan 1117  
Postcode en plaats: 1081 HV AMSTERDAM  
IBAN: NL07DEUT0549310002  
Tenaamstelling van het  
rekeningnummer: Stichting VU-VUMC

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens gemachtigde

BSN: [REDACTED]  
Naam: [REDACTED]  
Adres: [REDACTED]  
Postcode en plaats: [REDACTED] AMSTERDAM

Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Nee

Wat mag de gemachtigde doen?

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

**Over uw aanvraag**

Wat voor aanvraag doet u?

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





> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Medisch Centrum



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD114002016501

**Bijlagen**

2

Datum 1 april 2016

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 1 april 2016

Vervaldatum: 1 mei 2016

Factuurnummer: 16700501

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD114002016501	€ 1.187,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL41RBOS 056.999.6317 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93144, 2509 AC te 's Gravenhage.

---

**Van:** Info-zbo  
**Verzonden:** woensdag 18 mei 2016 11:35  
**Aan:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** RE: Aanvulling AVD114002016501

Beste meneer [REDACTED]  
De CCD is voornemens uw project te vergunnen, echter verzoeken wij u de NTS aan te passen. De eerste alinea, bij 3.1, bevat zinnen die niet goed op elkaar aansluiten. Zodra wij een nieuwe NTS hebben ontvangen waar dit is aangepast, ontvangt u de vergunning voor uw project.  
U mag uw project nog niet starten voordat u de vergunning hebt ontvangen.

Als er nog vragen zijn, dan hoor ik dat graag.

Met vriendelijke groeten,  
[REDACTED]

**Centrale Commissie Dierproeven**  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

T: 0900 – 28 000 28 (10 ct/min)

E: info@zbo-ccd.nl

---

**Van:** [REDACTED]  
**Verzonden:** woensdag 11 mei 2016 9:49  
**Aan:** 'Info-zbo'  
**CC:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** RE: Aanvulling AVD114002016501

Beste [REDACTED]  
Dank voor uw snelle respons. De antwoorden op uw aanvullende vragen zijn bijgesloten.  
Met vriendelijke groeten  
[REDACTED]

[REDACTED]  
Amsterdam  
Netherlands

---

**Van:** Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]  
**Verzonden:** maandag 9 mei 2016 15:46  
**Aan:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** RE: Aanvulling AVD114002016501

Geachte [REDACTED]  
Dank voor uw antwoord. Wij hebben aanvullend hierover nog enkele vragen.

Uit uw aanvraag maken wij op dat in Bijlage 2 een spieractivator getest zal worden die al geselecteerd is op basis van eerder experimenten, waarvoor geen informatie nodig is uit Bijlage 1. In onderstaand antwoord geeft u aan dat Bijlage 2 pas kan plaatsvinden als de locatie en functie van de bij spierzwakte betrokken eiwitten aangetoond is.  
U geeft aan dat u de functie van enkel deze eiwitten middels therapeutische interventie zult versterken in Bijlage 2. Kunt u dit verder toelichten?

Kunt u daarnaast aangeven wat de relatie is tussen de spieractivator van Bijlage 2 en de bovengenoemde eiwitten uit Bijlage 1, waarvan u de functie wilt versterken?

U heeft in uw aanvraag geen go-no go momenten benoemd. Kunt u de go-no go momenten binnen uw project benoemen? U wordt verzocht in ieder geval aandacht te besteden aan de go-no go momenten tussen Bijlage 1 en Bijlage 2. Kunt u daarbij aangeven op basis van welke criteria de keuzes gemaakt worden?

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

Stuur de ontbrekende informatie uiterlijk 12 mei op. Dit kan per e-mail, u hoeft stukken hier niet op aan te passen.

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

Als er nog vragen zijn, dan hoor ik dat graag.

Met vriendelijke groeten,

**Centrale Commissie Dierproeven**  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

.....  
T: 0900 – 28 000 28 (10 ct/min)

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

---

**Van:** [REDACTED]  
**Verzonden:** vrijdag 6 mei 2016 14:04  
**Aan:** 'Info-zbo'  
**Onderwerp:** RE: Aanvulling AVD114002016501

Beste [REDACTED]

Dank voor uw snelle respons. Beneden is onze respons op de vragen van de CCD. We hopen dat we hiermee de onduidelijkheden wegnemen (deze respons hebben we tevens verwerkt in het bijgesloten bestand, pagina 5)

Met vriendelijke groeten,

*Respons: er is weldegelijk samenhang en afhankelijkheid tussen beide bijlages, daar bijlage 1 zich concentreert op de pathofysiologie van vormen van nemaline myopathie, en bijlage 2 gericht is op het testen van therapieën. Deel 2 kan pas plaatsvinden als de pathofysiologie van bijlage 1 in kaart is gebracht. Zo hebben de experimenten beschreven in bijlage 1 als doel de locatie en functie van eiwitten die betrokken zijn bij spierzwakte in nemaline myopathie op te helderen, zodat we inzicht krijgen in de oorzaak van spierzwakte. Als het fundamentele werk is afgerond en we hebben aangetoond dat verstoringen in de locatie en functie van deze eiwitten spierzwakte veroorzaken in nemaline myopathie, dan kunnen we aanvangen met het versterken van de functie van deze eiwitten middels therapeutische interventie- beschreven in bijlage 2. De studies beschreven in bijlage 2 betreffen dus translationele experimenten waarbij het effect van een potentieel medicijn getest wordt dat beoogt spierkracht te verhogen.*

*Samenvattend, subdoel 1 'Pathofysiologie-Visualisatie van eiwitten' is van essentieel belang om subdoel 2 'Testen medicijn' tot een succes te maken en het hoofddoel te bereiken.*

---

**Van:** Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]  
**Verzonden:** dinsdag 3 mei 2016 14:13  
**Aan:** [REDACTED]



CC: [REDACTED]

Onderwerp: Aanvulling AVD114002016501

Geachte meneer, mevrouw,

Op 31 maart 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'Waardoor vermindert spierfunctie bij aangeboren spierafwijkingen en wat kunnen we er tegen doen?' met aanvraagnummer AVD114002016501. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden.

**Welke informatie nog nodig**

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

Uw aanvraag omvat twee subdoelen; inzicht verwerven in de pathofysiologie van spierzwakte en het testen van een nieuw medicijn. Kunt u de samenhang van deze verschillende doelen toelichten? Is er een afhankelijkheid tussen de dierproeven in resultaten of tijd?

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

**Opsturen binnen veertien dagen**

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. Indien wij de informatie deze week ontvangen, kan uw aanvraag de eerstvolgende vergadering van de CCD behandeld worden. U kunt uw antwoord aanleveren via e-mail.

**Wanneer een beslissing**

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Als er nog vragen zijn, dan hoor ik dat graag.

Met vriendelijke groeten,

[REDACTED]

**Centrale Commissie Dierproeven**

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

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

.....  
T: 0900 – 28 000 28 (10 ct/min)

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

*Uit uw aanvraag maken wij op dat in Bijlage 2 een spieractivator getest zal worden die al geselecteerd is op basis van eerder experimenten, waarvoor geen informatie nodig is uit Bijlage 1. In onderstaand antwoord geeft u aan dat Bijlage 2 pas kan plaatsvinden als de locatie en functie van de bij spierzwakte betrokken eiwitten aangetoond is.*

*U geeft aan dat u de functie van enkel deze eiwitten middels therapeutische interventie zult versterken in Bijlage 2. Kunt u dit verder toelichten?*

*Respons:* De spieractivator grijpt aan op de contractiele eiwitten van de spier, de eiwitten die de spiercel doen samentrekken, en deze bevinden zich op het dunne filament van de sacomeer. Om precies te zijn, de spieractivator zorgt ervoor dat calcium langer wordt vastgehouden op het troponine-complex en induceert zodoende een conformatieverandering in tropomyosine, waardoor er bij eenzelfde calciumconcentratie meer cross-bridges gevormd kunnen worden (de cross-bridges zorgen voor krachtgeneratie). De spieractivator grijpt dus selectief aan op het troponine-complex en de contractiele eiwitten die met het troponine-complex samenwerken.

*Kunt u daarnaast aangeven wat de relatie is tussen de spieractivator van Bijlage 2 en de bovengenoemde eiwitten uit Bijlage 1, waarvan u de functie wilt versterken?*

*Respons:* Om spiercontractie te realiseren, werkt het troponine-complex nauw samen met andere contractiele eiwitten, eiwitten die dikwijls gemuteerd zijn in nemaline myopathie. Nebuline is zo'n eiwit (meer dan 50% van de patienten met nemaline myopathie hebben een mutatie in het gen dat codeert voor nebuline). Er is indirect bewijs dat nebuline interacteert met troponine en dat mutaties in nebuline deze interactie vestoren en daardoor de affiniteit van het troponine complex en tropomyosine voor calcium verlagen. Dit geeft spierzwakte. Wij willen testen of, door toediening van de spieractivator, troponine/tropomyosine calcium langer kunnen vasthouden en zodoende de spier meer kracht kan leveren.

Echter, dan willen we wel eerst testen of nebuline en troponine/tropomyosine direct interacteren. Er is nog maar weinig bekend over nebuline omdat het een enorm groot eiwit is (>800 kD). Deze grootte maakt het lastig om met behulp van conventionele technieken de functie en locatie van het eiwit te achterhalen. Om exact te weten waar het eiwit zit - en of het dus een interessante kandidaat is voor gebruik van de spieractivator - zijn we dus genoodzaakt innovatieve technieken te gebruiken. Daarom hebben we de experimenten in Bijlage 1 ontworpen.

We hebben een muismodel gemaakt met een speciale fluorescerende probe (██████████) waarmee we met behulp van state-of-the-art microscopie (STORM/PALM, een type super-resolutiemicroscopie) de exacte locatie van nebuline ten op zichte van andere eiwitten kunnen bepalen.

Het tweede muismodel dat we beschrijven in Bijlage 1 heeft deze speciale fluorescerende probe ingebouwd in een geheel nieuw eiwit dat betrokken is bij nemaline myopathie: ██████████. Van dit eiwit weten we nog nauwelijks iets over locatie en functie binnen de spier. Recente artikelen laten nu wel zien dat twee andere eiwitten van dezelfde eiwitfamilie als ██████████ interacties aangaan met nebuline en de kwaliteit van het nebuline molecuul reguleren. We willen door middel van de experimenten beschreven in Bijlage 1 de locatie en functie van

■■■■■ achterhalen. Als het inderdaad samenwerkt met de contractiele eiwitten waarop de spieractivator aangrijpt, verwachten wij dat de spieractivator beschreven in Bijlage 2 een zeer interessante kandidaat is om spierfunctie te versterken in deze variant van nemaline myopathie.

*U heeft in uw aanvraag geen go-no go momenten benoemd. Kunt u de go-no go momenten binnen uw project benoemen? U wordt verzocht in ieder geval aandacht te besteden aan de go-no go momenten tussen Bijlage 1 en Bijlage 2. Kunt u daarbij aangeven op basis van welke criteria de keuzes gemaakt worden?*  
*Respons:* De experimenten beschreven in Bijlage 2 zijn gericht op het versterken van spieren middels een spieractivator die aangrijpt op contractiele eiwitten. Zoals hierboven beschreven is al wel bekend dat de activator aangrijpt op het troponine-complex en tropomyosine, maar we nog niet of nebuline ook interacteert en een conformatieverandering ondergaat met deze eiwitten na toedienen van de spieractivator. Dit willen we te weten komen door een combinatie van superresolutie microscopie om nebuline te lokaliseren en het gebruik van fluorescente antilichamen voor het aankleuren van het troponine-complex. Als uit de kleuringen blijkt dat nebuline interacteert met de eiwitten waarop de spieractivator aangrijpt, zal gestart worden met de experimenten beschreven in bijlage 2.

Hetzelfde criterium geldt ook voor het tweede muismodel dat beschreven is in Bijlage 1. Als blijkt uit de lokalisatiestudies dat het nieuwe eiwit ook interacteert met de contractiele eiwitten waarop de spieractivator aangrijpt (i.e. troponine-complex en tropomyosine), dan zal dat een Go geven voor het starten van de experimenten beschreven in bijlage 2.

Bijlage 2 bevat ook een go-no go moment, welke is aangegeven in het flow-diagram in het projectvoorstel. Pas wanneer experimenten waarbij de spieractivator acuut wordt toegevoegd laten zien dat spierkracht verhoogd wordt, zal gestart worden met de chronische experimenten waarbij we ook de lange termijn effecten van de spieractivator zullen bestuderen.



## Format

### Projectvoorstel dierproeven

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

### 1 Algemene gegevens

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

### 2 Categorie van het project

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

### 3 Algemene projectbeschrijving

#### 3.1 Achtergrond

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

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

Goed werkende spieren zijn noodzakelijk voor het dagelijks leven: problemen in skeletspieren (de

ademhalingsspier is een pregnant voorbeeld) kunnen leiden tot verslechtering van de kwaliteit van leven en een vroegtijdige dood. Verminderde spierfunctie kan zowel erfelijk als verworven zijn. Een voorbeeld van een erfelijke skeletspierziekte is nemaline myopathie. Dit is de meest voorkomende aangeboren spierziekte binnen de groep van aandoeningen waarin verstoringen in het *samentrekken* van de spier leiden tot spierzwakte (incidentie 1:50.000). Bij nemaline myopathie leiden mutaties in genen die coderen voor eiwitten in de sarcomeer – de kleinste contractiele eenheid in een spier – tot spierzwakte. De moleculaire mechanismen waardoor mutaties leiden tot spierzwakte zijn onvoldoende bekend en daarom is een specifieke en gerichte behandeling van patiënten nu niet mogelijk. Naast het vergroten van het inzicht in het verloop van de ziekte, willen we ook een medicijn testen die de sarcomeerfunctie verbetert.

Het project heeft zowel een fundamenteel als een translationeel karakter. Om spierfunctie van patiënten te verbeteren, is het allereerst van belang de mechanismen onderliggend aan spierzwakte in kaart te brengen. Inzicht verwerven in de pathofysiologie van aangeboren spierzwakte is de fundamentele kant van dit project. Het translationele deel betreft het testen van een nieuw en veelbelovend medicijn – een spieractivator- om spierkracht te verhogen.

### 3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

*Algemeen doel:* inzicht verwerven in de pathofysiologie van spierzwakte en het testen van een nieuw medicijn.

In dit project willen we meer inzicht vergaren over de onderliggende mechanismen van spierzwakte bij patiënten met nemaline myopathie. Met dit project willen we de volgende onderzoeksvragen beantwoorden;

1. Wat is de pathofysiologie van (1) de meest voorkomende vorm van nemaline myopathie en (2) de meest recent gediagnostiseerde vorm van nemaline myopathie? Waar bevinden de betrokken eiwitten zich en wat is hun rol in het genereren van spierkracht?  
Van zowel het meest voorkomende eiwit dat is aangedaan bij nemaline myopathie als het meest recent gediagnostiseerde eiwit is nauwelijks bekend waar de eiwitten zich bevinden in de spiercel en welke rol ze spelen bij de ontwikkeling van spierkracht. Daarom begrijpen we niet hoe genetische fouten die betrekking hebben op deze eiwitten kunnen leiden tot spierzwakte. Het is van essentieel belang om de lokalisatie en de rol van deze eiwitten in kaart te brengen om het ziektemechanisme te begrijpen en aangrijpingspunten voor therapieën te ontwikkelen.
2. Wat is het effect van acute en chronische blootstelling aan een spieractivator op spierfunctie in vijf nemaline myopathie muismodellen ?

#### *Haalbaarheid*

Onze afdeling heeft ruime ervaring met de voorgestelde experimenten en de benodigde infrastructuur, getuige meerdere publicaties in internationaal gerenommeerde tijdschriften. Ook zijn er voldoende financiële middelen om personeel aan te stellen en apparatuur aan te schaffen om de geplande experimenten uit te voeren.

### 3.3 Belang

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

Dit project heeft als doel meer inzicht te krijgen in aangeboren verstoringen in skeletspierfunctie en om nieuwe behandelingsmethoden te onderzoeken.

Spierzwakte is een grote belemmering in het dagelijks leven van mensen met een spierziekte, in de revalidatie en bij ouderen. Bij een groot aantal patiënten met een spierziekte leidt falen van de ademhalingspier (het diafragma) zelfs tot een vroegtijdige dood. Voor patiënten met nemaline myopathie – de meest voorkomende aangeboren spierafwijking met verstoorde contractie-eiwitten – is momenteel geen medicijn beschikbaar. Het is onze verwachting dat het medicijn dat we gaan testen, een spieractivator, de kwaliteit van leven van deze patiënten verbetert. We komen met de geplande experimenten veel te weten over de werking van een spieractivator op intacte spierfunctie in het gehele lichaam. De bevindingen zullen niet alleen van toepassing zijn op patiënten met nemaline myopathie, maar ook mensen met afgenomen spierfunctie door andere oorzaken, bijvoorbeeld een verminderde spieractivatie bij veroudering en diverse andere spierziektebeelden.

### 3.4 Onderzoeksstrategie

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

Het algemene doel van deze projectaanvraag is om meer inzicht te verkrijgen in de onderliggende mechanismen van verminderde skeletspierfunctie van patiënten met nemaline myopathie en om een potentieel medicijn te testen. Op deze manier willen we de kwaliteit van leven van de patiënten met nemaline myopathie verbeteren. Dit wordt op de volgende manier onderzocht.

##### *Pathofysiologie*

Nemaline myopathie is de meest voorkomende aangeboren spierziekte binnen de groep van aandoeningen waarin verstoringen in het samentrekken van de spier leiden tot spierzwakte. Vandaag de dag zijn we op de hoogte van 10 genen die betrokken zijn bij het ontstaan van nemaline myopathie. Er is echter nog geen medicijn voor handen. Om het inzicht in twee veelvoorkomende vormen van nemaline myopathie te vergroten, hebben we in twee verschillende muismodellen het betrokken eiwit gelabeld met een fluorescente probe. Van deze twee eiwitten, die de oorzaak zijn in het ontstaan van de ziekte, is nauwelijks bekend welke rol ze precies spelen. Door de eiwitten zichtbaar te maken middels fluorescentie, komen we te weten (1) waar de eiwitten zich bevinden in de cel, en (2) bij welke processen ze betrokken zijn. De skeletspier bestaat uit een zeer vernuftig raderwerk dat exact op elkaar is ingesteld om de spieren in beweging te brengen. De preciese plek van een eiwit in dit raderwerk voorspelt de rol die het eiwit speelt bij het genereren van kracht. Van twee eiwitten die vaak verstoord zijn bij nemaline myopathie, weten we niet precies waar deze eiwitten zich bevinden in het raderwerk. Als we deze informatie kunnen verkrijgen middels de fluorescente probe waarmee we de desbetreffende eiwitten kunnen labelen, vergroot dat ons inzicht in waarom deze spieren met aangedane eiwitten minder kracht kunnen leveren. Ook levert deze informatie hiermee aangrijpingspunten op voor therapieën om de spierkracht te herstellen. Zo vergroten we het inzicht in de pathofysiologie van nemaline myopathie.

##### *Testen medicijn*

Onlangs hebben we op *geïsoleerde individuele spiercellen* van nemaline myopathie patiënten een veelbelovende stof getest, een spieractivator, die de spierkracht aanzienlijk verbeterde. Om de stap te maken naar het testen van deze stof in nemaline myopathie patiënten is meer preklinisch werk noodzakelijk. We weten namelijk nog niet wat het effect van de spieractivator is op *intacte spieren* in nemaline myopathie. We verwachten dat de muizen bij gebruik van een spieractivator meer spierkracht kunnen leveren bij submaximale inspanning, en zuiniger met hun energie om kunnen gaan waardoor ze uiteindelijk minder last hebben van vermoeidheid. Om de belangrijke volgende stap naar de haalbaarheid van een spieractivator voor toekomstig gebruik in nemaline myopathie te testen, zijn we genooddaakt om het op effect intacte spieren en *in vivo* functie te bepalen. Daarom hebben we muismodellen gemaakt voor vijf verschillende vormen van nemaline myopathie. We hebben gekozen voor deze vijf modellen, omdat deze qua genetica vijf vormen van nemaline myopathie representeren die vaak voorkomen. Daarnaast zijn deze modellen interessant, omdat het verschillende vormen van ernst van spierzwakte betreft. Zo zijn sommige modellen mild qua spierzwakte, en andere zeer zwaar aangedaan. Door het verschil in spierzwakte zullen de tijdstippen waarop de dieren gemeten zullen worden dus ook verschillen. Onderstaande tabel geeft precies aan op welke leeftijd de verschillende modellen gemeten

worden; een tijdstip waarop het dier duidelijk spierzwakte vertoont ten opzichte van controle dieren.

<b>Genotype</b>	<b>Leeftijd</b>
<i>Acta1</i> (H40Y)	~3 maanden
Tg( <i>Acta1</i> )Asp286Gly	~4 maanden
<i>Neb</i> -cKO	~4 maanden
██████-KO	~6 maanden
██████-KI (Dutch founder mutation)	~6 maanden

Op alle muizen zullen we drie belangrijke bepalingen doen om inzicht te krijgen in het effect van een spieractivator:

We bestuderen het effect van een spieractivator op (1) *in vitro* intacte spierfunctie, (2) *in vivo* uithoudingsvermogen en (3) *in vivo* ademhalingsfunctie.

De studie is opgedeeld in twee delen: eerst testen we het effect van *acute* toediening van een spieractivator op de bovengenoemde uitkomstmaten. Als deze studies significante verbetering van spierfunctie en uithoudingsvermogen laten zien, starten we de *chronische* studies waarbij een spieractivator wordt toegevoegd aan het voer.

---

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

---

#### *Pathofysiologie*

Om het inzicht in twee veelvoorkomende vormen van nemaline myopathie te vergroten, hebben we in twee verschillende muismodellen het betrokken eiwit gelabeld met een fluorescente probe. De lokalisatie en rol van deze eiwitten kunnen we bestuderen middels super-resolutie microscopie.

#### *Testen medicijn*

Nemaline myopathie komt voor in verschillende gradaties, mede omdat mutaties in verschillende genen kunnen leiden tot de spierziekte. We hebben de beschikking over vijf muismodellen voor nemaline myopathie, die verschillende mutaties dragen en voor zowel milde als ernstige varianten van de ziekte staan. Op deze dieren worden in totaal drie verschillende proeven gedaan (met cross-over design) om het effect van een spieractivator op intacte spierfunctie te onderzoeken.

#### *In vivo: uithoudingsvermogen*

Om te onderzoeken of toediening van een spieractivator de algemene prestatie van de muis verbetert zullen we de dieren op een loopband plaatsen en hun uithoudingsvermogen testen. Met een cross-over design zullen we het effect van een spieractivator op looptijd bestuderen.

#### *In vivo: ademhalingsfunctie*

Met name de ademhalingsspier (het diafragma) is vaak het meest aangedaan in nemaline myopathie, en falen van deze spier is in veel gevallen de doodsoorzaak. Om te onderzoeken of het *in vitro* effect op geïsoleerde diafragmaspiercellen te extrapoleren is naar verbetering van *in vivo* condities, meten we ademhalingsfunctie *in vivo* met behulp van plethysmografie.

#### *In vitro: intacte spierfunctie*

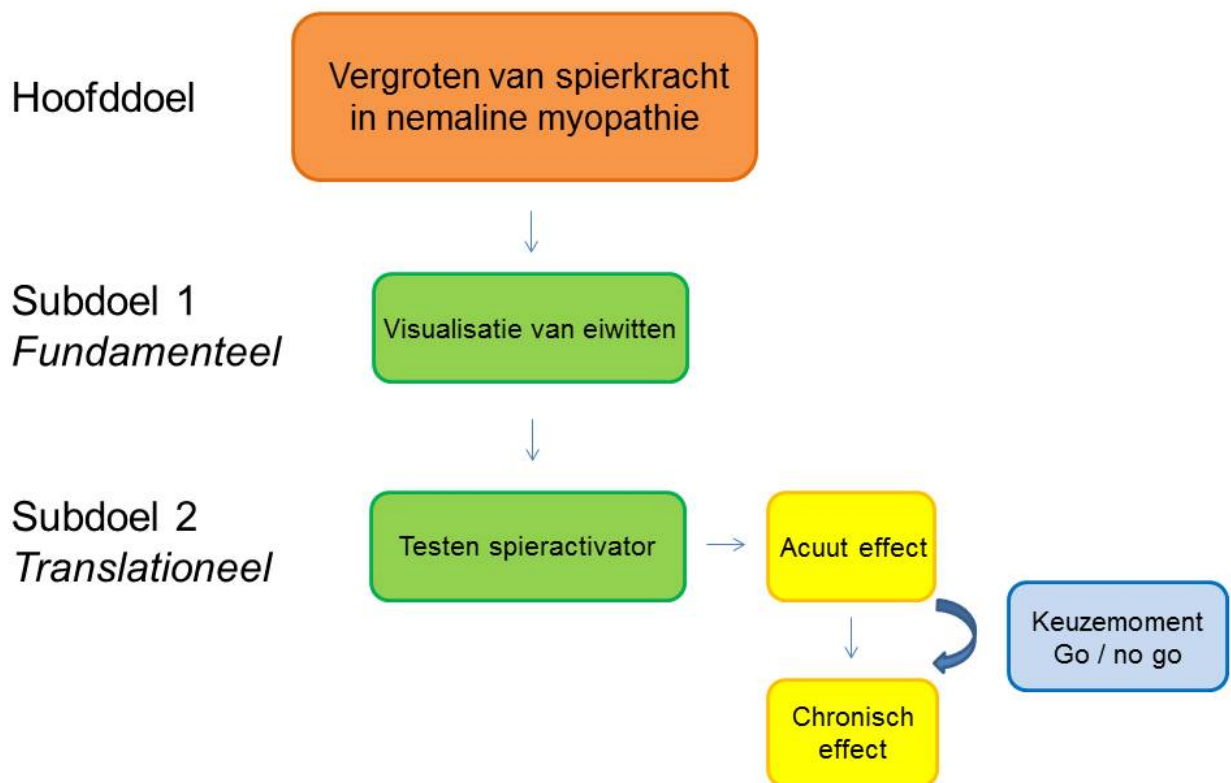
Het diafragma en perifere spieren worden gedissecteed voor intacte mechanica experimenten. Voor alle spieren zullen we tweemaal een standaard protocol voor spierfunctie draaien voor het bepalen van de (sub)maximale kracht, de vermoeibaarheid van de spier en de calciumhuishouding: eenmaal in aanwezigheid van een spieractivator, eenmaal met alleen placebo (met middel waarin een spieractivator is opgelost).

---

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

---

Het specifieke hoofddoel is het vergroten van spierkracht bij patiënten met nemaline myopathie. Om dit te bereiken moeten we allereerst weten wat er mis gaat in de spier om therapeutische aangrijpingspunten te identificeren. Subdoel 1 – beschreven in volgnummer 1 – heeft als doel de locatie en functie van eiwitten die betrokken zijn bij spierzwakte in nemaline myopathie in kaart te brengen, zodat we inzicht krijgen in de oorzaak van spierzwakte. Als het fundamentele werk is afgerond en we hebben aangetoond dat verstoringen in de locatie en functie van deze eiwitten spierzwakte veroorzaken in nemaline myopathie, dan kunnen we aanvangen met het versterken van de functie van deze eiwitten middels therapeutische interventie– beschreven in volgnummer 2. Dit betreft translationele experimenten waarbij het effect van een potentieel medicijn getest wordt dat beoogt spierkracht te verhogen. Het flowdiagram geeft de samenhang tussen de verschillende onderdelen aan.





### *Pathofysiologie*

De nog onbekende rol van twee belangrijke eiwitten die betrokken zijn bij skeletspierzwakte zal worden opgehelderd door ze fluorescent te labelen en functie in kaart te brengen (volgnummer 1).

### *Testen medicijn*

Om spierzwakte in skeletspieren tegen te gaan zal het effect van een spieractivator getest worden op intacte spierfunctie, *in vivo* ademhalingsfunctie en *in vivo* uithoudingsvermogen.

#### Fase 1: acuut effect

Eerst zal het effect van *acuut* toedienen van een spieractivator worden getest op intacte spierfunctie, *in vivo* ademhalingsfunctie en *in vivo* uithoudingsvermogen (volgnummer 2).

#### Fase 2: chronisch effect

Als dit tot significante verbetering van spierfunctie leidt, wordt ook het *chronische* effect van een spieractivator getest op intacte spierfunctie, *in vivo* ademhalingsfunctie en *in vivo* uithoudingsvermogen (volgnummer 2).

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Visualisatie van skeletspiereiwitten
2	<i>In vitro</i> en <i>in vivo</i> skeletspierfunctie
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Medisch Centrum

AMSTERDAM



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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD114002016501  
**Bijlagen**  
1

Datum 20 mei 2016  
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 31 maart 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Waardoor vermindert spierfunctie bij aangeboren spierafwijkingen en wat kunnen we er tegen doen?" met aanvraagnummer AVD114002016501. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 6, 11 en 18 mei 2016 heeft u uw aanvraag aangevuld. Dit betreft de samenhang tussen de aangevraagde Bijlagen Dierproeven en een nieuwe NTS.

#### **Beslissing**

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning. De algemene voorwaarde betreffende het afstemmen van de go/no go momenten met de IvD wordt gesteld om onnodige inzet van dieren in dierproeven te voorkomen. De algemene voorwaarde betreffende artikel 10, lid 1 sub a van de wet wordt gesteld om te voldoen aan datgene wat volgt uit dit artikel. U kunt met uw project "Waardoor vermindert spierfunctie bij aangeboren spierafwijkingen en wat kunnen we er tegen doen?" starten. De vergunning wordt afgegeven van 20 mei 2016 tot en met 1 mei 2021.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

#### **Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-VU-VUMC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 31 maart 2016. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel

10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie, nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

#### **Bezwaar**

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen. Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

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

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

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

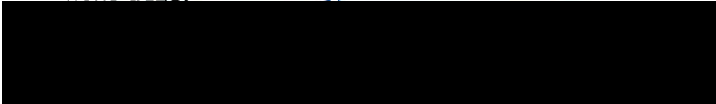
<http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

#### **Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:

  
Ir. G. de Peuter  
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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

## Projectvergunning

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

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Vrije Universiteit Medisch Centrum

Adres: De Boelelaan 1117

Postcode en plaats: 1081 HV AMSTERDAM

Deelnemersnummer: 11400

deze projectvergunning voor het tijdvak 20 mei 2016 tot en met 1 mei 2021, voor het project "Waardoor vermindert spierfunctie bij aangeboren spierafwijkingen en wat kunnen we er tegen doen?" met aanvraagnummer AVD114002016501, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-VU-VUMC. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]. De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 31 maart 2016
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 6 mei 2016;
  - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 31 maart 2016;
  - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 31 maart 2016, ontvangen op 31 maart 2016.
  - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 6, 11 en 18 mei 2016

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
Visualisatie van skeletspiereiwitten	Muizen (Mus musculus) / knock-in en wt	400	Licht	
In vitro en in vivo skeletspierfunctie	Muizen (Mus musculus) / Wt en NM	320	Matig	

### Voorwaarden

#### Op grond van artikel 10a1 lid 2 Wod zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen

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

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

# Weergave wet- en regelgeving

## **Dit project en wijzigingen**

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

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

## **Verzorging**

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

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

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

## **Pijnbestrijding en verdoving**

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

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

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

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

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

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

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

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

Inventaris Wob-verzoek W16-19S									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	<b>NTS2016503</b>								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel				x			x	
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1 oud				x			x	
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2 oud				x			x	
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3 oud			x					
7	DEC-advies			x					
8	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
9	Verzoek aanvullende informatie				x		x	x	
10	Reactie verzoek aanvulling				x		x	x	
11	Bijlage beschrijving dierproeven 1 herzien				x			x	
12	Bijlage beschrijving dierproeven 2 herzien				x			x	
13	Bijlage beschrijving dierproeven 3 herzien			x					
14	Advies CCD		x						x
15	Beschikking en vergunning				x		x	x	



07 APR. 2016

ARD 10800 2016503

## 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 10800 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen																
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table border="0"> <tr><td>Naam instelling of organisatie</td><td>Universiteit Utrecht</td></tr> <tr><td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td><td>[REDACTED]</td></tr> <tr><td>KvK-nummer</td><td>30275924</td></tr> <tr><td>Straat en huisnummer</td><td>Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht</td></tr> <tr><td>Postbus</td><td>12007</td></tr> <tr><td>Postcode en plaats</td><td>3501AA Utrecht</td></tr> <tr><td>IBAN</td><td>NL27INGB0000425267</td></tr> <tr><td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td><td>Universiteit Utrecht</td></tr> </table>	Naam instelling of organisatie	Universiteit Utrecht	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]	KvK-nummer	30275924	Straat en huisnummer	Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht	Postbus	12007	Postcode en plaats	3501AA Utrecht	IBAN	NL27INGB0000425267	Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Utrecht
Naam instelling of organisatie	Universiteit Utrecht																	
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]																	
KvK-nummer	30275924																	
Straat en huisnummer	Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht																	
Postbus	12007																	
Postcode en plaats	3501AA Utrecht																	
IBAN	NL27INGB0000425267																	
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Utrecht																	
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>																	
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="0"> <tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[REDACTED]</td><td><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td></tr> <tr><td>Functie</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr> <tr><td>Afdeling</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr> <tr><td>Telefoonnummer</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr> <tr><td>E-mailadres</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie	[REDACTED]		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]		
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.																
Functie	[REDACTED]																	
Afdeling	[REDACTED]																	
Telefoonnummer	[REDACTED]																	
E-mailadres	[REDACTED]																	
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="0"> <tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[REDACTED]</td><td><input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.</td></tr> <tr><td>Functie</td><td>Onderzoeksmedewerker</td><td></td></tr> <tr><td>Afdeling</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr> <tr><td>Telefoonnummer</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr> <tr><td>E-mailadres</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.	Functie	Onderzoeksmedewerker		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]		
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.																
Functie	Onderzoeksmedewerker																	
Afdeling	[REDACTED]																	
Telefoonnummer	[REDACTED]																	
E-mailadres	[REDACTED]																	



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

## 2 Over uw aanvraag

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

## 3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 1 - 5 - 2016
- Einddatum 1 - 9 - 2020
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Mechanism-based Integrated Systems for the Prediction of Drug Induced Liver Injury
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Mechanismen van leverschade door medicijngebruik
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC DEC Utrecht
- Postadres Postbus 85500 3508 GA Utrecht
- E-mailadres dec-utrecht@umcutrecht.nl

## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?  Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1441,- Lege  
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.  Via een eenmalige incasso  
 Na ontvangst van de factuur
- Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*

## 5 Checklist bijlagen

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

## 6 Ondertekening

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

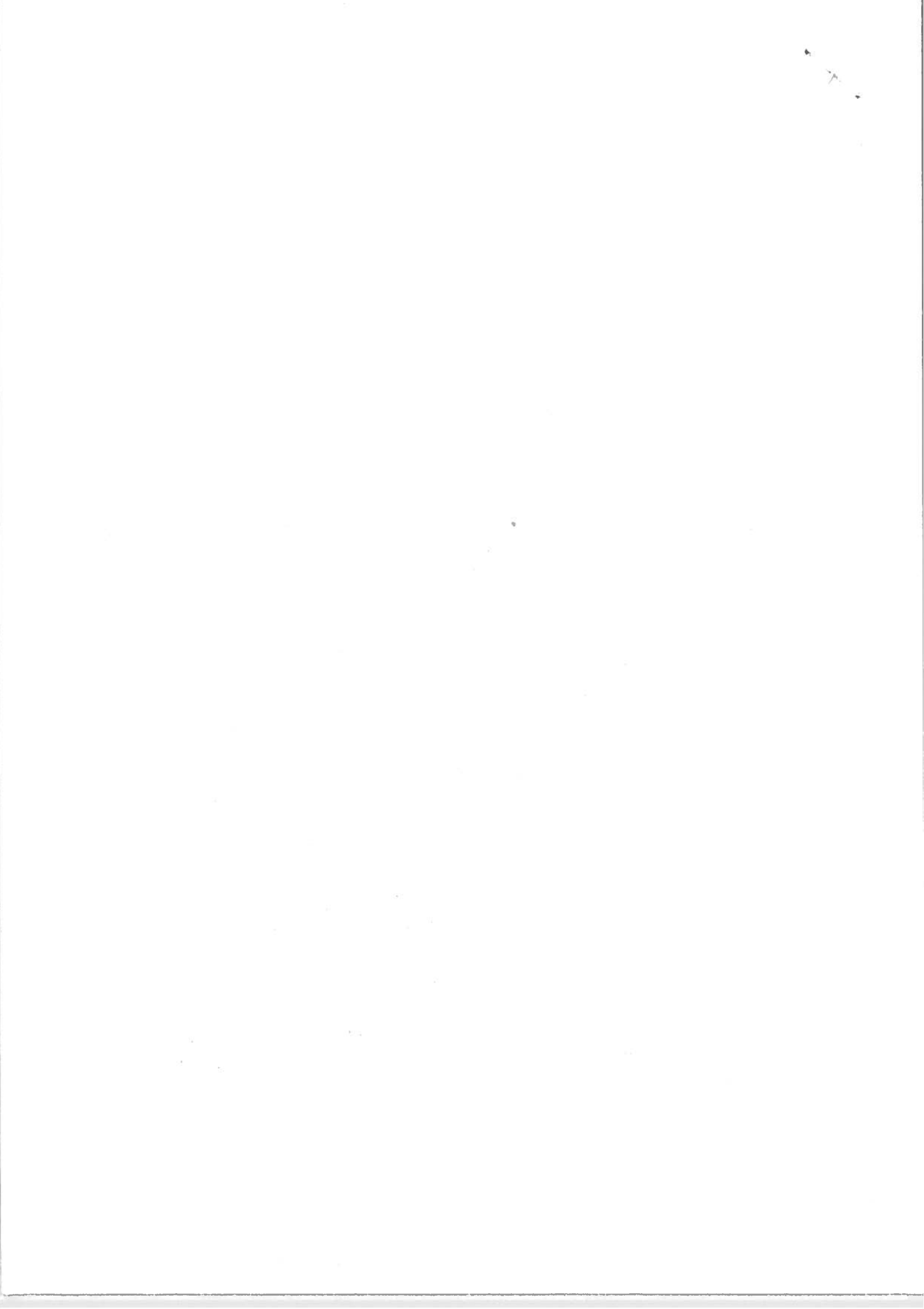
Naam 

Functie 

Plaats *Utrecht*

Datum *31 - 12 - 2016*

Handtekening 





## 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.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl)).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

### 1 General information

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

### 2 Categories

- 2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.
- Basic research
- Translational or applied research
- Regulatory use or routine production
- Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare
- Research aimed at preserving the species subjected to procedures
- Higher education or training
- Forensic enquiries

### 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.
- 

Drug induced liver injury (DILI) is a dramatic consequence of drug intake that cannot yet be reliably predicted preclinically. The EU-Innovative Medicines Initiative (IMI) MIP-DILI (co-funded by EFPHIA) aims to design a predictive translational strategy, comprised of in silico, in vitro and in vivo models. The [REDACTED] of Utrecht University is partner in this project because it has longstanding experience with testing drugs for immunological effects (that are related to DILI) and with translation of in vivo results to in vitro test systems.

The mechanism that underlying DILI is poorly understood. DILI may occur in various forms, e.g. from cholestasis to hepatocellular cell death and combinations of both. In a number of cases, DILI is accompanied by systemic adverse effects, including skin rashes and cytopenias (e.g. thrombocytopenia, eosinophilia). These diverse effects have been shown to involve both innate as well as adaptive immune components (Kaplowitz N, *Nature Reviews Drug Discovery*, 2005). Activation of innate immune components include inflammatory cells (e.g. neutrophils, NK cells) or factors (e.g. TNF), whereas cytopenias and skin rashes likely involve adaptive immune components (specific antibodies and sensitized T cells). Processes such as metabolic activation (leading to reactive metabolites that may form drug-protein adducts), induction of cell damage (including mitochondrial stress), and immunoregulation (that control adverse immune responses) have been demonstrated to be involved in DILI and related pathophysiological outcomes.

In this project, we use established models of immune-mediated DILI to unravel hepatotoxic mechanisms, which will be help to design predictive in vitro tests. An example of an established model has been developed and partly characterized by Shaw and colleagues in 2009 using trovafloxacin (TVX), a fluoroquinolone that has been withdrawn from the market after high incidence of liver failure in patients. In this model, TNF appears pivotal in causing severe liver damage. The availability of a clear protocol to perform a mouse model of DILI by Shaw et al. and the availability of a negative homologue levofloxacin (LVX) encouraged the MIP-DILI consortium to use TVX model as a suitable model to identify mechanisms of DILI. In this model a possible role of neutrophils in the liver pathology and an increase of several cytokines and chemokines have been demonstrated (Shaw et al., *Toxicological Sciences* 2009). Yet, it is unknown: 1- how the drug (e.g. trovafloxacin) affects liver cell to become sensitive to TNF; 2- which immune cells (innate (e.g. neutrophils and NK cells), and adaptive (e.g. T cells) or regulatory) are involved and; 3- to what extent these effects translate to long-term adaptive immune responses (e.g. T cell sensitization). In the latter, break of tolerance, which is a particular property of liver immune system, may be crucial. Interestingly, recent studies demonstrate indeed that for some drugs lack of immune tolerance may be crucial in development of DILI (Metushi IG et al., *Hepatology* 2015).

During our previous in vivo/in vitro experiments we observed that TVX and other DILI-associated compounds affected dendritic cells (DCs) (maturation and homing). These findings together with emerging evidences of the role of DC in the induction of tolerance (Goubier A et al., *Immunity* 2008; Metushi IG et al., *Hepatology* 2015) and in activation of lymphocytes (Woehrle T et al., *Blood* 2010), encouraged us to investigate if TVX and other DILI-associated compounds may lead to a disruption of tolerance. This disrupted tolerance may lead to further(uncontrolled) increase of development of cytotoxic lymphocytes that damage hepatic parenchyma. For this reason, we will investigate whether modulation of tolerance mechanisms affects DILI and associated effects in case of short-term or prolonged administration of TVX and other DILI-associated compounds. In view of the analyses of the role of the adaptive immune system in

---

DILI and -associated effects (e.g. sensitization, changes in spleen) we will also analyse how prolonged administration of DILI-associated compound influence sensitization to well-known bystander antigens such as OVA.

In this project we will focus on all of the above aspects of DILI and related effects. After the identification of in vivo mechanisms for trovafloxacin, other compounds associated with DILI in human will be tested in order to identify potential similarities and eventually validate in vitro/in silico tools for the identification of potential hepatotoxic compounds.

The use of mice in this model is a valid tool to investigate kinetics of DILI (e.g. recruitment of cells to the site of damage) and point to the pivotal players in the induction of liver failure and associated effects.

---

### 3.2 Purpose

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

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

The main aim of our project is to understand the mechanisms involved in DILI, and to develop an in vivo/in vitro test strategy for the proper identification of hepatotoxic compounds during pre-clinical studies.

In vivo/in vitro correlation of the mechanisms involved in DILI will be evaluated. Both [REDACTED] are involved in the project to focus on in vivo-in vitro translation. [REDACTED] has longstanding experience with the topic, both via 3 PhD projects (for instance with industry) and via a [REDACTED] project (on adverse drug reactions and liver). Translation of in vivo findings to in vitro approaches is an important pillar of the MIP-DILI project. For this reason, collaboration is set up with partners inside the consortium (both industrial partners (e.g. [REDACTED]), and academic partners (e.g. [REDACTED]) and outside the consortium (e.g. [REDACTED] UMC Utrecht).

---

### 3.3 Relevance

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

Increased knowledge of mechanisms of DILI will contribute to better prediction of DILI of compounds. In particular translational in vitro tests (designed based on animal data) will eventually reduce the number of general toxicity studies in animals and finally also the occurrence of unexpected hepatic adverse reactions to marketed drugs. Predictive *in vitro* tests may also be used earlier in the R&D phase of drug development and thus potentially **save** animal studies. Altogether the outcome of the project will have important economic benefits for pharmaceutical companies (prevent drug failure of marketed drugs) and of course also for society (prevention of severe liver injury).

DILI involves multiple organs as well as a complex interaction between various immune cells and molecules. This requires a holistic in vivo approach to identify crucial mechanisms.

---

### 3.4 Research strategy

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

The project will be based on a translational and integrated approach with the following components:

- 1- In vivo animal experiments based on single administration of a DILI-associated compound in non-immunological and immunological modified settings. These experiments will give insight into the cells that are involved in initial liver damage.

- 2- In vivo animal experiments based on multiple administration of a DILI-associated compound in non-immunological and immunological modified settings. These experiments will give more insight into dysfunction of immune cells (in particular related to lack of immunotolerance) in DILI.
- 3- Development of in vitro models of relevant aspects of DILI to identify intracellular mechanisms and confirm the interplay among several cell types, e.g. dendritic cells (DC) and hepatocytes.

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.

**1- In vivo animal models of DILI based on single administration of a DILI-associated compound in non-immunological and immunological modified settings:**

the DILI animal model that we used is described by Shaw PJ et al., 2009 in *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. In this model, TVX pre-treatment of mice challenged with TNF leads to liver injury (TNF will be used as a proximal mediator of LPS). Mechanisms involved in the induction of this injury are still matter of debate and the contribution of various immune cells to the damage is not yet defined. Importantly, TNF appears to be pivotal in infectious diseases as well as in most inflammatory diseases. In the last decade, several animal models of immune-mediated DILI have shown that combination of DILI-associated compounds with TNF as important inflammatory stimulus results in hepatic toxicity. Identification of the potential disruption in the inflammatory response promoted by TNF and other cytokines will be investigated.

**2- In vivo animal models of DILI based on multiple administration of a DILI-associated compound:**

Because we observed that TVX stimulates the innate immune system of the liver and because the activation of the innate immune system may induce an adaptive immune response we are interested to investigate the role of the adaptive immune system in DILI. In addition, DILI is often associated with delayed systemic clinical effects such as skin rash and cytopenias. The general idea is that these effects are due to stimulation of the adaptive immune system, either or not combined to specific interference with immunoregulation/immunotolerance (Metushi IG et al., *Hepatology* 2015). In all, this may lead to sensitization of the immune system (specific T cells and specific antibodies). From the findings by Metushi IG et al, it is hypothesized that tolerance induction may prevent the clinical effects as mentioned, and hence one of the reasons that these adverse effects occur in only few patients. We here aim to investigate whether tolerance induction is also important in preventing elicitation of adaptive immune responses in other examples of DILI.

In this project, we therefore want to test prolonged repetitive administration of different DILI-associated drugs in combination with a disruption of mechanisms involved in the onset of tolerance using specific monoclonal antibodies (to CTLA-4 and PD1, see Metushi IG et al., *Hepatology* 2015)).

Along with DILI-associated drugs, structural homologues that do not cause DILI will be tested.

Primary outcome parameters include immunological and histopathological changes in liver and spleen and levels of (auto)antibodies.

**3- Development of in vitro models of DILI for the identification of intracellular mechanisms and confirmation of interplay among several cell types:**

In vitro experiments with donor cells are dependent on in vivo findings, collected in 1 and 2. From previous in vivo experiments with TVX we already know that both neutrophils and dendritic cells are affected by TVX. To examine underlying mechanisms we aim to investigate the effect on these cells in vitro. In vitro experiments will include neutrophil recruitment tests (neutrophils migration and activation, Koenderman L et al., *Thrombosis and Haemostasis* 2010) and tests to evaluate DC stimulation (e.g. DC-induced lymphocyte proliferation, Garulli B et al., *Clinical and Vaccine Immunology* 2008). In vitro tests will represent a strategic asset to investigate intra-cellular pathways involved in the relevant physiological events linked to DILI. Moreover, those tests will eventually serve as predictive tools to exclude potential hepatotoxic compounds during pre-clinical drug development. For

these reasons, other DILI-associated compounds in human (and their non-toxic pharmacological analogues) will be tested, in order to validate the developed tests.

We aim to test a range of pharmaceuticals known to cause DILI and selected by the All these compounds were carefully selected by the MIP-DILI consortium (EFPIA companies, academia) as training compounds for investigations. Selection of drugs has been done within the consortium based on: literature findings (animal studies, in vitro findings and epidemiology (human data, from post marketing surveillance), experience by industry. Structural and pharmaceutical relationships are considered. In particular, in some cases, pairs of structural homologues (positive or negative for DILI) were selected allowing validation in vitro tests. For instance trovafloxacin was selected together with levofloxacin (as negative control).

The selected drugs that may be of interest to test in vivo are: Ximelagatran (anticoagulant, withdrawn from the market because of DILI), Amiodarone (anti-arrhythmic, causes DILI possibly dependent on LPS/TNF), Troglitazone (antidiabetic, causes DILI, mechanism not known), Tolcapone (improves side effects in Parkinson, withdrawn because of DILI, mechanism unknown), Diclofenac (causes DILI in some users, possibly dependent on LPS/TNF), Trovafloxacin (fluoroquinolone, withdrawn from market, because of DILI, possibly dependent on LPS/TNF), Fialuridine (antiviral, DILI with unknown mechanism) and proper pharmacological or chemical analogues of each drug which are not associated with DILI in man (Dabigatran, Primadone, Pioglitazone, Entacapone, Levofloxacin etc.).

In this project we will start with two other fluoroquinolones, difloxacin and tosufloxacin, which may have, based on literature, similar mechanism of action (Poon I et al., *Nature* 2014). After this first round of experiments, other ones will be tested (e.g. in combination with TNF) to investigate whether they elicit similar or other mechanisms than the fluoroquinolones.

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

The simultaneous presence of different kind of cells and their capability to be recruited/activated from different organs at the site of injury, make the in vivo approach the essential tool for the identification of the main mechanisms involved in DILI. The findings collected during in vivo experiments will be used for the development of in vitro/in silico models. Donor mice will be used to set up these in vitro experiments and to validate the possible use of cell lines to replace primary cells. We will perform acute (single exposures) to evaluate initiating mechanisms and repetitive exposures to investigate how initial changes translate to adaptive immune responses (these require at least 7 up to 20 days to develop and to show effects of tolerance).

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	Single dose models
2	Multiple dose models
3	Development of in vitro models of DILI for the identification of intracellular mechanisms and confirmation of interplay among several cell types
4	
5	



6	
7	
8	
9	
10	



## Appendix

### Description animal procedures

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

#### 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.
- 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 |
|---------------|--------------------------|
| 1             | Single dose models       |

*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.

##### Single dose model:

Since it is hypothesized that inflammation is one of the factors that determines whether DILI occurs in patients, we aim to test different DILI-associated compounds under the influence of inflammatory stimuli, such as TNF. In particular, we want to characterize the role of the immune system in development of

this type of DILI, thus identifying commonalities in mechanisms among different drugs. Outcome parameters will include biochemical (e.g. liver enzymes), immune and histopathological changes in various interacting organs (e.g. intestine, spleen, liver).

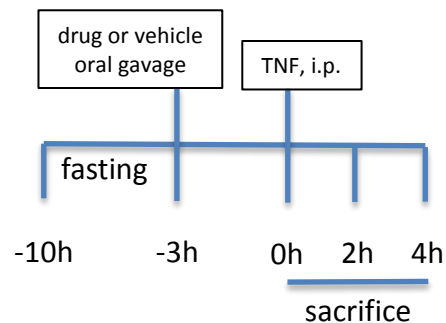
Describe the proposed animal procedures, including the nature, frequency and duration of the treatment. Provide justifications for the selected approach.

Fasting is used frequently in mouse models of DILI, in order to reduce the variance of drug availability. In addition fasting may represent an additional cellular stress that makes mice more sensitive to DILI. For this reason we will consider to introduce one group that receives TVX+TNF without fasting. This has been assessed for TVX (personal communication with consortium partners) but may differ per drug. For each drug we will evaluate the necessity of fasting in a small pilot study.

Depending on the outcome of the pilot, mice will be fasted and receive an oral gavage of:

- DILI-associated compounds
- related compounds not associated with DILI but pharmacologically or chemically resembling the DILI-associated compounds
- vehicle alone

The treatment scheme is as follows:



**In the general set-up 4 groups are used:**

- Group 1: mice receiving Trovafloxacin (DILI-associated compound) and TNF
- Group 2: mice receiving Levofloxacin (the pharmacological analogue of Trovafloxacin) and TNF
- Group 3: mice receiving vehicle and TNF
- Group 4: mice receiving none of the treatments
- Group 5: mice receiving Trovafloxacin and TNF without fasting

In words, three hrs after the single oral administration of the drug or vehicle, mice will be injected intraperitoneally with TNF. Organs (i.e. intestine, spleen, liver and also blood) will be collected at three time points. Until now we have used the time points T=0 (so 3 hrs after dosing with TVX as the drug, but before dosing of TNF) and T=2h and T=4h (both after administration of TNF). For new drugs we will use information from literature or the consortium to define the initial dose that will then be tested for one time point only (T=4 h).

In total an experiment according to the general set-up will last 14 hrs (taking into account fasting of 7 hrs and the treatment from drug exposure to final dissections). Analyses will include i.e. flow cytometry, immunohistology, PCR, levels of particular proteins in tissues and in serum/plasma (obtained by bleeding). Flow cytometry will include both innate and adaptive immune cells. Immunohistology will include detection of localization of tissue damage (apoptosis, necrosis), influx of inflammatory cells but also localized expression of cytokines, chemokines etc. PCR will be done to detect changes in RNA expression of signalling molecules and cytokines and chemokines whereas proteins to be detected in serum include liver enzymes, cytokines and chemokines. To characterize in depth the cause of changes mechanistically we will also analyse the effects of specific inhibiting or modulating substances on the onset and regulation of DILI. We aim to use specific substances such as [REDACTED] Shaw PJ et al., *Toxicological Sciences* 2007), or the [REDACTED] [REDACTED] (Hoque R et al., *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 2012)). In addition, we aim to interfere with certain immunological receptors and cells by using specific monoclonal antibodies to inhibit or deplete immune cells, [REDACTED] (Carr KD et al., *Immunology* 2011). The number of modulations (e.g. substances or monoclonal antibodies) depends on initial findings (e.g. changes in subsets of lymphocytes), but we estimate to include a maximum of 10 modulations per drug combination.

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

Power analysis will be performed before each experiment, based on the parameters which will be evaluated. Since damage of the liver will be our main parameter aside to immunological changes, power analysis will be based on liver enzyme levels (e.g. ALT) in blood. Based on this parameter, we have used 8 animals per group in previous experiments.

## B. The animals

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

**Species:** For these experiments, mice will be used (e.g. C56BL/6). The choice for a mouse model is based on the similarities between the immune system of humans and mice, but also because the immune system in mice is already well characterized and several tools are available to study the mechanisms involved in DILI. The aim of the project is not to develop a new in vivo model but to define mechanistic knowledge that will help to develop in vitro models to test potential hepatotoxic compounds during R&D.

Moreover, there are several evidences in scientific literature (Lucena MI et al., *Hepatology* 2009) which state that sex is a determinant in the severity and predisposition to DILI. Since we do not know whether gender matters for the selected compound, we suggest to start testing female for fluoroquinolones. Depending on results (e.g. statistical variance) we will decide whether we will use both female and male mice or use the most susceptible gender in the next experiments with the fluoroquinolones. For every new drug we have to test again the gender susceptibility. [REDACTED]

**Origin:** Animals will be purchased from a registered commercial provider in EU, including the Netherlands, such as Charles River Laboratories or Harlan Laboratories.

**Estimated numbers:** Previously, we used 8 animals per group, based on power calculation using liver enzymes (ALT) in the serum as the parameter. In case of an experiment according the general set up (4 treatment groups, see scheme) with only one time point we therefore need 32 animals per drug. With this set up we will confirm the effective dose for DILI. Since we will test a maximum of 5 drug combinations (5 DILI and 5 matching non-DILI drugs) we will need  $5 \times 32 = 160$  animals.

Subsequent experiments with modulating compounds will include 3 time points (to evaluate kinetics of effect) and 10 modulations (e.g. substances or monoclonal antibodies) at the most. Together, for these experiments we therefore estimate to use 3 (time points) x 10 (number of modulators) x 160 (number of animals for 5 drug combinations) = 4800 mice.

For the work described in this appendix we will need a total of 4960 mice.

### C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

### D. Replacement, reduction, refinement

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

#### Replacement:

The kinetics of recruitment and the activation of immune cells to the site of damage is difficult to reproduce in vitro due to the mutual interactions of different cell types (e.g. immune cells, hepatocytes, endothelial cells) from different organs of the body (e.g. interaction between intestine, liver and spleen). To evaluate these parameters an integrated in vivo approach is needed. Mechanistic information collected from these in vivo experiments will shed light on the crucial processes involved in DILI, which is needed in order to develop in vitro tests for the identification of potential DILI-inducing new drug entities. This will add also to reduction of animals in the future. The involvement in the MIP-DILI consortium, which aims to reduce animal use for this type of toxicology, ensures the translation from in vivo to in vitro.

#### Reduction:

The number of animals per group will be determined by the use of power analysis on the basis of the most relevant parameter needed for the study. The number of animals in experiment until now is based on expected effects (liver damage, particularly values of liver enzymes such as ALT in blood).

#### Refinements:

Mice will be housed in groups and in cages with environmental enrichment. They will be daily monitored in order to prevent any unexpected discomfort.

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

On the basis of findings (abnormal behavior and animal characteristics) and the level of discomfort (standard methods of [REDACTED], veterinary personnel will be consulted.

## 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.

NA

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

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

No

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

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

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

## Classification of discomfort/humane endpoints

### H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question 1.

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

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

Pain relieving method will not be possible for 3 reasons:

-the duration of the experiment is short (based on our experience the liver injury starts to develop from 2 hrs to 4 hrs after TNF injection, at max 4 hrs animals are killed and dissected, see scheme),

-the severity of the expected adverse reaction is overall mild (in more than 75 % of animals) and moderate to severe in less than 25% of animals (depending on the drug),

-pain relieving drugs may interfere with DILI inducing drugs and inflammatory responses

Yes

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

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

No evidences are in support of potential adverse effects due to the experimental procedures.

Explain why these effects may emerge.

We do not expect any other effects.

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

Alteration of animal behaviours and evaluation of the discomfort of the animal will result in immediate consultation of the animal welfare body or the designated veterinarian

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

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

No > Continue with question K.

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

Indicate the likely incidence.

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

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

Mild for 75% or more of the animals, possibly moderate for maximum 25% of the animals. That is, only animals that develop liver damage after exposure to DILI-drugs may suffer from moderate to severe discomfort. The experiments will last maximally 14 hrs, but only the last 2 hrs (i.e. from 2 to 4 hrs after TNF treatment) liver injury may become severe (based on TVX results, and depending on the drug tested).

### **End of experiment**

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

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'signatures'.

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

Excision of organs will be necessary to perform the analysis.

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

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

Yes



## Appendix

### Description animal procedures

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

#### 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.
- 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                          |
|--------------------------------|---|
| <input type="text" value="2"/> | <input type="text" value="Multiple dose models"/> |

*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.

##### Multiple dose models:

We here aim to investigate whether adaptive immunity and immunoregulation are important in preventing elicitation of adaptive immune responses in DILI, for instance TVX-induced DILI.



In this project, we aim to test prolonged repetitive administration of different DILI-associated drugs in combination with a disruption of mechanisms involved in the onset of tolerance using specific monoclonal antibodies [REDACTED]. Both [REDACTED] are important receptors on regulatory T cells to sustain their regulatory function. (moved to 3.4)

Importantly, innate immune responses triggered by TNF (as described in appendix 1) may contribute to adaptive immune responses. Therefore, mechanisms that are identified in single dose studies (appendix 1) will be translated to studies in this appendix, i.e. similar pharmacological modulators will be considered in multiple dose studies. Along with DILI-associated drugs, structural homologues that do not cause DILI will be tested.

Primary outcome parameters include immunological and histopathological changes in liver and spleen and levels of circulating T cells and antibodies.

---

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

Mice are treated with compounds via intragastric gavage once a day for six weeks. To analyse the capacity of suspected drugs to support adaptive immune responses, well-defined antigens (e.g. ovalbumin) will be co-injected during drug exposure as so-called bystander antigen. In this way, kinetics of specific immune responses can easily be analysed.

Specific monoclonal antibodies are administered i.p. before or around during exposure depending on the antibody. Injections will be done 3 times per week.

For pharmacological modulators dosing will be determined based on literature data or experience from other partners

Various mouse strains will be used, among those transgenic OT mice and KO mice [REDACTED]

As modulators monoclonal antibodies directed to immune receptors ([REDACTED]) will be used.

Blood samples will be taken several times, but not more than 8 ml/kg/14 days. Primary outcome parameters in blood are liver enzymes (e.g. ALT), cytokines and (auto-)antibodies. At 3 time points during 6 weeks treatment, mice will be dissected and various organs (e.g. liver, spleen and intestine) will be collected for further analyses, e.g. flow cytometry, analyses of antibody producing cells (to e.g. ovalbumin), specific antibodies, clinical parameters and gene and protein expression.

To determine the effects of modulation, vehicle controls with and without modulation will be included. DILI-associated compounds are compared to pharmacologically or chemically related compounds that are not associated with DILI.

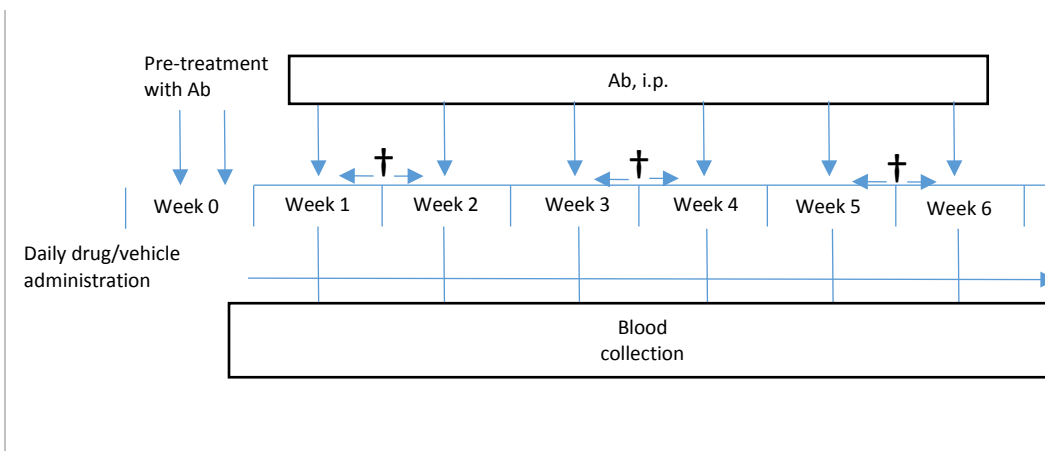
An example of a typical experiment is outlined below.

Mice will be treated up to 6 weeks with:

- 1- DILI-associated compounds + no modulation
- 2- compounds not associated with DILI but pharmacologically or chemically resembling the DILI-associated compounds + no modulation
- 3- DILI-associated compounds + specific modulation
- 4- compounds not associated with DILI but pharmacologically or chemically resembling the DILI-associated compounds + specific modulation
- 5- vehicle alone + no modulation
- 6- vehicle alone + specific modulation

Only in groups 1 and 3, DILI or associated immune changes are expected.

**Mice will be treated as follow:**



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

Power analysis will be performed before each experiment, based on the parameters that will be evaluated. Since damage of the liver will be our main parameter, power analysis will be based on liver enzyme levels (ALT) in blood.

## B. The animals

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

**Species:** For these experiments, 6-8 wk old mice will be used (e.g. C56BL/6). The choice for mouse as a model species is based on the similarities between the immune system of humans and mice, but also because the immune system in mice is well characterized and several tools are available on the market in order to study the mechanisms involved in DILI. In addition dosing regimen of various DILI-inducing drugs are known for the mouse.

The MIP-DILI project aims to develop in vitro models in order to test potential hepatotoxic compounds and not to develop new in vivo models.

Moreover, there are several evidences in scientific literature (Lucena MI et al., Hepatology 2009) which state that sex is a determinant in the severity and predisposition to DILI. Since gender difference is not relevant for MIP-DILI (**Mechanism-based Integrated Systems for the Prediction of Drug Induced Liver Injury**) project we do not consider to test female and male together because this will lead to more variance in the parameters used.

**Origin:** Animals will be purchased from a registered commercial provider in EU, including the Netherlands, such as Charles River Laboratories or Harlan Laboratories, or in US (Jackson).

**Estimated numbers:** The estimated number of animals is derived from the above set up of 6 experimental groups. Based on experience and ALT levels in serum as key parameter (to perform power analyses) the required number of mice per group is 8. A maximum of 3 drug combinations will be tested in this set-up of multiple dosing. The selection of drug combinations will be based on studies done in appendix 1. Based on earlier findings and literature, we expect to do maximum 10 modulations, whereas a max of 3 time points per experiment will be analysed. In total this accounts for a maximum of: 6 (experimental groups per drug combinations) x 3 (drug combinations) x 10 (modulations) x 3 (time points) x 8 animals = 4320.

## C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

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

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

##### **Replacement:**

The kinetics of recruitment and the activation of immune cells to the site of damage is difficult to reproduce in vitro due to the mutual interactions of different cell types (e.g. immune cells, hepatocytes, endothelial cells) from different organs of the body (e.g. interaction between intestine, liver and spleen). To evaluate these parameters an integrated in vivo approach is needed. Mechanistic information collected from these in vivo experiments will shed light on the crucial processes involved in DILI, which is needed in order to develop in vitro tests for the identification of potential DILI-inducing new drug entities. This will add also to reduction of animals in the future. The involvement in the ■■■-MIP-DILI consortium, which aims to reduce animal use for this type of toxicology, ensures the translation from in vivo to in vitro.

##### **Reduction:**

The amount of animals will be limited by choosing the minimal number of control and treatment groups, necessary to achieve optimal results. The number of animals per group will be determined by the use of power analysis on the basis of the most relevant parameter needed for the study.

The number of animals in experiment until now is based on expected effects (liver damage, particularly values of liver enzymes such as ALT in blood).

##### **Refinements:**

Mice will be housed in groups and in cages with environmental enrichment. They will be daily monitored in order to prevent any unexpected discomfort.

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

Treatment will be performed by trained personnel to limit stress as a result of animal handling.

### **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.

NA

### **Accommodation and care**

#### F. Accommodation and care

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

No

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

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

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

### Classification of discomfort/humane endpoints

#### H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question 1.

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

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

Pain relieving methods will not be possible as they will interfere with drug-induced effects (involving activation of innate immune system and inflammation) in the liver.

Yes

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

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

For antibiotic drugs mild diarrhoea might be observed.

Explain why these effects may emerge.

Depletion of gut flora may alter motility of the intestine leading to diarrhoea

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

Mice will be carefully monitored and in case of diarrhoea liquefied feed (weekvoer) will be supplied. Animals will be sacrificed when weight drops more than 20%

## 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.

If the above mentioned adverse effects will occur, animals will be sacrificed if body weight drops more than 20% over whole period of the experiment. In addition, in case severe health issues (diarrhea, prolapse, dehydration, lethargy) mice will be sacrificed.

Indicate the likely incidence.

Unlikely

## 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').

Moderate: max 66% of animals. In the multiple exposure study, doses will be used that by itself do not cause severe liver damage, but this damage may be enhanced by modulations. The potential damage in the liver tissue will be revealed by the blood ALT evaluation (once a week). Based on literature information, animals may suffer from the treatment and lose body weight. see J for humane endpoints.

Mild: 33% of animals not receiving a modulation treatment.

## End of experiment

### L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'signatures'.

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

Excision of organs will be necessary to perform the analysis.

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

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

Yes



## Appendix

### Description animal procedures

- This appendix should be enclosed

#### 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure   |
|---------------|--|
| 3             | Development of in vitro models of DILI for the identification of intracellular mechanisms and confirmation of interplay among several cell types |
- 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.

We aim to develop and validate predictive in vitro tests for the identification of DILI-associated compound during preclinical drug development. Based in mechanisms of DILI identified in vivo (experiments listed in appendixes 1 and 2), relevant in vitro tests will be explored and developed. Currently,

we are using in vitro tests to detect: -1. leukocytes recruitment (neutrophils migration and activation, Koenderman L et al., *Thrombosis and Haemostasis* 2010) ; and 2-responses to antigen stimulation (e.g. dendritic cell (DC)-induced lymphocyte proliferation, Garulli B et al., *Clinical and Vaccine Immunology* 2008); and 3- hepatocyte-DC cocultures. These three in vitro tests have been selected because the mechanistically link to in vivo findings obtained in mouse studies with TVX

Importantly, in vitro tests will represent a strategic asset to investigate intra-cellular pathways involved in the relevant physiological events linked to DILI. Those tests will serve as predictive tool to exclude potential hepatotoxic compounds during pre-clinical drug development. For these reasons, other DILI-associated compounds in human (and their non-toxic pharmacological analogues) will be tested, in order to validate the developed tests. Based on results obtained in experiments done in appendix 1 and 2, we may also set up other in vitro tests based on donor material.

---

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

Mice will:

- 1- be anesthetized in order to isolate different cell types from liver: hepatocytes and leukocytes. Anaesthetic administration is required in order to perfuse the liver with collagenase and ensure a proper yield of viable cells.
- 2- undergo cervical dislocation in order to isolate bone marrow and spleen: several cell cultures will be obtained using cells from those organs (e.g. bone marrow-derived DC culture, Lutz MB et al., *Journal of Immunological Methods* 1999)

---

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

Power analysis will be performed before each experiment, based on the parameters that will be evaluated. Depending on the mechanism investigated different parameters will be taken into account. The number of mice depends on the cell yield for each cell type.

An experiment with co-cultures of freshly isolated hepatocytes and DC with 10 compounds needs around 6480 incubations (based on three concentrations (3) x 4 (inflammatory conditions, i.e combinations of LPS and or cytokines) x 2 (incubated with or without modulator or with and without UV light) x 3 time points x 3 (triplo) x 3 (repetitions) x 10 (compounds). Per mouse we obtain  $20 \times 10^6$  DC, and  $10^6$  hepatocytes.

#### **Example of an experimental setup:**

##### Primary hepatocytes:

Group 1a/b: incubated with Trovafloxacin (TVX) and with/or without modulator

Group 2: incubated with Levofloxacin (LVX) and with/or without modulator

Group 3: incubated with vehicle and with/or without modulator

Monocytes and neutrophils migration will be tested using the supernatant of hepatocytes incubated as mentioned above and different time points after treatment with drug or modulating chemicals (Koenderman L et al., *Thrombosis and Haemostasis* 2010; Elliott M et al., *Nature* 2010).

For modulators see appendix 1 and 2

Per incubation  $0.5 \times 10^6$  cells are needed, so per mouse 20 incubations (based on hepatocytes) can be done. Since it is estimated that we will do 6500 incubations we will need 325 mice. In addition we need separate mice for DC isolations. These cannot be obtained from the same animals for logistic reasons (DC need to be cultured for 6-10 days to fully mature from bone marrow cells, whereas hepatocytes are cultured only for a short period). At most we will culture DC with hepatocytes in a ratio of 1 (DC) to 1 (hepatocytes). The number of DC that we obtain from one mouse is  $20 \times 10^6$  (i.e enough for 40 incubations) which indicates that we need 160 mice. In total we need 500 mice.

Monocytes and neutrophil can be obtained from same mice so for this we do not need extra mice.

*NOTE; triplo means that we will perform 3 incubations per experiment; repetitions means that we repeat the entire experiment. Triplo is to take into account the intra-experimental variation (e.g. errors in pipetting), whereas repetitions will account for extra-experimental (for instance day-to-day or donor-to-donor variation). Repetition experiments may not always be exactly the same; for instance extra controls may be added if needed.*

## B. The animals

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

**Species:** For these experiments, mice will be used (e.g. C56BL/6). The choice for a mouse model is based on the similarities between the immune system of humans and mice, but also because the immune system in mice is already well characterized and several tools are available on the market in order to study the mechanisms involved in DILI. The project aims to develop in vitro models in order to test potential hepatotoxic compounds and not to develop a new in vivo model. For this reason we would like not to consider variation in sex, age and strain which might lead to more variance in the parameter used.

**Origin:** Animals will be purchased from a registered commercial provider in EU, including the Netherlands, such as Charles River Laboratories or Harlan Laboratories or in US (Jackson).

**Estimated numbers:** The number of donor mice will be 500.

## C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

## D. Replacement, reduction, refinement

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

### Replacement:

It is still not clear if available cell lines (hepatocytes, DC etc) are resembling the behaviour of primary cells. To evaluate these parameters an integrated approach is needed. For this reason, we will compare results obtained from primary cells with the use of available cell lines (such as hepatocytes and macrophage cell-lines (which are NOT DC)). Evidences collected from these experiments will shed light on the mechanisms involved in DILI, needed to develop in vitro tests for the identification of potential DILI-inducing new drug entities. Experiments will also provide information as the applicability of cell-lines for specific questions.

### Reduction:



The number of animals will be determined, based on the cell yield, and an estimation of the conditions to be tested. The test conditions are selected such that we will obtain optimum results with a minimal number of conditions.

**Refinements:**

Mice will be housed in groups, in cages with environmental enrichment and they will be periodically monitored in order to prevent any unexpected discomfort.

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

Experienced personnel will treat the mice, to prevent unnecessary discomfort due to animal handling. As a limited number of mice is needed to perform the studies, solitary housing can occur when for instance only one animal is needed for isolation of cells. Optimal planning will reduce this risk.

### **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.

nvt

### **Accommodation and care**

**F. Accommodation and care**

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

No

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

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

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

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

**H. Pain and pain relief**

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question 1.

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

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

Yes

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

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

No adverse effects are expected due to absence of treatment.

Explain why these effects may emerge.

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

### **J. Humane endpoints**

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

No > Continue with question K.

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

Indicate the likely incidence.

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

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

mild

## **End of experiment**

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

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'signatures'.

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

Excision of the organs is needed.

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

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

Yes

### **A. Algemene gegevens over de procedure**

1. Aanvraagnummer : 2015.II.814.043
2. Titel van het project : Mechanism-based Integrated Systems for the Prediction of Drug Induced Liver Injury
3. Titel van de NTS : Hoe leverschade ontstaat door medicijngebruik.

#### 4. Type aanvraag:

- nieuwe aanvraag projectvergunning
- wijziging van vergunning met nummer :

#### 5. Contactgegevens DEC

- Naam DEC : DEC Utrecht
- Telefoonnummer contactpersoon : 088 – 75 59 247
- Emailadres contactpersoon : dec-utrecht@umcutrecht.nl

#### 6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):

ontvangen door DEC: 20-11-2015

- aanvraag compleet:
- in vergadering besproken: 02-12-2015 en 02-03-2016
- anderszins behandeld: per mail: 15-12-2015, 04-01-2016, 29-01-2016 en 03-02-2016
- termijnonderbreking(en) van / tot : 09-12-2015 tot 14-12-2015  
18-12-2015 tot 04-01-2016  
13-01-2016 tot 29-01-2016
- besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
- aanpassing aanvraag:
- advies aan CCD: 22-03-2016

#### 7. Eventueel horen van aanvrager

- Datum: 02-03-2016
- Plaats: Utrecht
- Aantal aanwezige DEC-leden: 4
- Aanwezige (namens) aanvrager: Groepsleider (PI)
- Strekking van de vragen:
- De DEC zou graag antwoord willen hebben op de vragen 1) waarom de onderzoekers zeven geneesmiddelen willen gebruiken en 2) wat de argumentatie is rondom de te gebruiken sekse.
- Strekking van de antwoorden:
- De onderzoekers lichtten toe dat ze deze geneesmiddelen hebben gekozen, omdat deze allemaal interessant zijn en allemaal gerelateerd zijn aan DILI en omdat het consortium dat onderzoek naar DILI doet een lijst heeft opgesteld van modelstoffen waarop deze

geneesmiddelen voorkomen. De onderzoekers weten niet of ze alle zeven geneesmiddelen nodig hebben, maar ze zijn bang dat ze, wanneer ze er slechts twee aanvragen bijvoorbeeld, er toch meer nodig blijken te hebben en dan opnieuw een aanvraag moeten indienen. De DEC stelt voor om te beginnen met een lager aantal en dan een go/no go-moment in te bouwen, waarbij er meerdere geneesmiddelen gebruikt kunnen worden, mocht dit nodig zijn. Verder lichten de onderzoekers toe dat ze geen goed argument hebben om slechts één sekse te gebruiken, omdat ze niet weten of er verschil zal zijn in het effect dat afhankelijk is van het geslacht. Het valt te verwachten dat er op dit punt verschillen zijn tussen mannelijke en vrouwelijke dieren en mogelijk is dat ook afhankelijk van de stof (bij de ene stof wel en bij de andere niet). De onderzoekers hebben momenteel geen data met betrekking tot vrouwelijke dieren. Deze twee punten zouden een argument kunnen zijn om te beginnen met vrouwelijke dieren.

- Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag: Ja

## 8. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: 09-12-2015
- Strekking van de vragen:

### Niet Technische Samenvatting

- 3.2, Opbrengsten project en wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang: De DEC verzoekt u te noemen dat u uiteindelijk streeft naar een ex vivo-model. Graag aanpassen.
- 3.5, Indeling dierproeven naar de verwachte ernst: De DEC verzoekt u 'maar kortdurend' aan de zin toe te voegen. Graag aanpassen.

### Projectvoorstel

- 3.1, achtergrond: Op de 6e regel van onderen staat '*in vitro/in vitro*'. Graag aanpassen.
- 3.3, belang: Het woord 'safe' moet vervangen worden door 'save', graag aanpassen.
- 3.4, onderzoeksstrategie, 3.4.1, punt 3: De DEC verzoekt u in de zin 'to identify of' het woord 'of' weg te laten. Graag aanpassen.
- 3.4, onderzoeksstrategie, 3.4.2: De DEC verzoekt u duidelijk aan te geven waarom u hebt gekozen voor de door u genoemde geneesmiddelen. Tevens ziet de DEC graag een uitleg voor het gebruik van TNF (in plaats van bijvoorbeeld IgA). Graag toelichten.

### Bijlage 1

- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: De DEC verzoekt u om u te beperken tot het design van het experiment. De overige informatie graag verplaatsen naar 3.4. Deze opmerking geldt ook voor bijlage 2.
- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Gezien het feit dat u het belang van vasten onderzoekt, suggereert de DEC u een extra groep op te nemen van dieren die niet vasten. Indien van toepassing, aanpassen.

- B. De dieren: Graag noemen en toelichten wat het geslacht, de leeftijd en de stam zijn van de door u te gebruiken dieren. Daarbij merkt de DEC op dat de toepassing bedoeld is voor mannen en vrouwen en dus in het onderzoek volgens de DEC ook beide geslachten meegenomen zouden moeten worden. Deze opmerking geldt ook voor de andere bijlagen.
- B. De dieren: U noemt hier vijf stoffencombinaties, terwijl u er eerder zeven noemt. De DEC verzoekt u dit toe te lichten. Tevens spreekt u over modulations. De DEC vraagt zich af wat deze precies inhouden.
- K. Classificatie van ongerief: De DEC verzoekt u het ongerief bij de 25% aan te passen naar moderate.

### Bijlage 2

- J. Humane eindpunten: De DEC vraagt zich af over welke periode u dit gewichtsverlies bepaalt. Graag toelichten.

### Bijlage 3

- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters, pagina 2: U noemt drie punten en spreekt vervolgens over 'these two'. Graag toelichten en aanpassen.
- D. Vervanging, vermindering en verfijning, pagina 4, bovenaan: U hebt een zin in het Nederlands geschreven. Graag aanpassen.

- Datum antwoord: 18-12-2015
- Strekking van de antwoorden:  
Verwerkt in de aanvraag.

- Datum: 13-01-2016
- Strekking van de vragen:

### Projectvoorstel

- 3.4.2 De bedoeling van de vraag van de DEC was dat u per stof zou aangeven wat de wetenschappelijke gronden zijn om die stof te gebruiken, en waarom het nodig is om ze alle 7 te gebruiken? (Het aantal geneesmiddelen bepaalt immers hoeveel dieren er nodig zijn).

### Bijlage 1

- Niet beantwoord is de vraag welk geslacht en welke leeftijd (Geldt voor alle bijlagen). Er wordt niet aangegeven hoeveel groter de variatie zou zijn als beide geslachten gebruikt zouden worden en wat daarvan de gevolgen voor de aantallen zijn.

### Bijlage 2

- De DEC raadt u aan om bij de humane eindpunten onder J te vermelden dat het gaat om een gewichtsverlies van 20% gedurende de gehele proef.
- J: De DEC raadt u aan om de tekst zorgvuldiger te formuleren.

- Datum: 29-01-2016
- Strekking van de antwoorden:  
Verwerkt in de aanvraag.

9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC)

- Aard expertise:
- Deskundigheid expert:
- Datum verzoek:
- Strekking van het verzoek:
- Datum expert advies:
- Expert advies:

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

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

**C. Beoordeling (inhoud):**

1. Het project is:
  - uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord.
  - uit onderwijskundig oogpunt verantwoord.
  - uit het oogpunt van productiedoeleinden verantwoord.
  - X Niet wettelijk vereist.
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.
3. De DEC onderschrijft, op grond van onderstaande argumenten, het belang van de doelstelling. Het belang wordt ingeschat als substantieel.

Veel geneesmiddelen zijn schadelijk voor de lever. **Drug Induced Liver Injury (DILI)** is nu een van de belangrijkste oorzaken van leveraandoeningen in de Westerse wereld, niet zelden leidend tot de noodzaak van levertransplantatie. Voorspellen welke geneesmiddelen toxisch zullen zijn voor de lever is echter tot nu toe zeer moeilijk en de problemen worden in veel gevallen pas duidelijk als de drug al op de markt is.

Het EU-programma **Mechanism-Based Integrated Systems for the Prediction of DILI (MPI-DILI)** is gericht op de ontwikkeling van nieuwe testmethoden die het mogelijk zullen maken levertoxiciteit veel vroeger in het ontwikkelingsproces van geneesmiddelen te detecteren waardoor leverbeschadiging bij medicijngebruikers voorkomen kan worden. Als leverbeschadiging te verwachten is zal het kostbare ontwikkelingsproces veelal worden afgebroken.

Het EU-programma is gericht op een voorspellende, translationele strategie die bestaat uit *in silico*-, *in vitro*- en *in vivo*-modellen. Van de *in silico*- en *in vitro*-modellen wordt een aanzienlijke besparing van proefdieren verwacht.

Samengevat: voorkomen van leverschade door medicijngebruik, beperking van proefdiergebruik en kostenbesparend in medicijnontwikkeling.

4. Er worden verschillende oorzaken, of combinaties daarvan, verondersteld voor de pathofysiologie van DILI. Het kan gaan om metabolische activatie, waarbij reactieve metabolieten ontstaan die interactie met de drug kunnen aangaan; er kan celschade worden aangericht, inclusief mitochondriale stress, en de immunoregulatie kan worden verstoord met als gevolg een verstoorde immuunresponse en/of immuuntolerantie.

Dit project richt zich op immuungerelateerde DILI. Er wordt daarbij gebruik gemaakt van gevalideerde modellen voor immuungemedieerde DILI om hepatotoxische mechanismen te ontrafelen en deze kennis te gebruiken bij de ontwikkeling van *in vitro* tests. Zo'n model is het TVX (trovafloxacin) model, waarin TNF (tumor necrosis factor) een centrale rol speelt. Het is tot dusverre echter onbekend hoe de drug levercellen (over)gevoelig maakt voor TNF, welke immuuncellen betrokken zijn, en in hoeverre op lange termijn de immuunresponse en immuuntolerantie beïnvloed worden. Door de effecten te vergelijken met die van levoflaxine (LVX), een negatieve homoloog m.b.t. DILI wordt getracht de mechanismen achter DILI te doorgronden. Dit moet dan de basis vormen voor de ontwikkeling van een *in vivo-in vitro* strategie.

Onder 3.4.1 en 3.4.2 wordt een duidelijke onderzoeksstrategie uiteen gezet. Volgens een 3-stappenplan zal een aantal geneesmiddelen getest worden waarvan bekend is dat ze DILI veroorzaken (en die daarom veelal van de markt gehaald zijn); de effecten en mechanismen zullen vergeleken worden met die van analoga die geen DILI induceren. Gestart zal worden met een tweetal TVX-analoga (beide ook fluoroquinolones). Daarna zullen andere geneesmiddelen getest worden om verschillen en overeenkomsten in DILI-mechanismen bloot te leggen. Deze onderzoeksstrategie wekt bij de DEC het vertrouwen dat de beoogde resultaten binnen de gestelde termijn bereikt kunnen worden.

5. Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:

Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)

Niet-menselijke primaten (10e)

Dieren in/uit het wild (10f)

Gefokt voor dierproeven (11)

Zwerfdieren (10h)

Hergebruik (1e lid 2)

Huisvesting en verzorging

Locatie: instelling vergunninghouder (10g)



In bijlage 1, onder B: De Dieren, wordt aandacht besteed aan het geslacht van de proefdieren. Op voorhand is niet te zeggen of mannetjes, dan wel vrouwtjes de voorkeur verdienen bij het testen van een bepaalde stof. Wel staat echter vast dat sekseverschillen bestaan in de mate van ernst en predispositie voor DILI. Afgaande op de resultaten zal steeds beslist worden welk geslacht het meest gevoelig is voor een bepaalde stof. Met dat geslacht zullen dan de volgende stappen in het onderzoek uitgevoerd worden. Deze afweging zal voor iedere nieuwe stof gemaakt moeten worden. Op grond van deze overwegingen zullen geen gemengde proefgroepen worden ingezet.

6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat: 80% van de dieren ondervindt gering ongerief vooral als gevolg van de toediening van geneesmiddelen (zonder effect), en 20% matig ongerief, met name in die gevallen waarin de toegediende geneesmiddelen leverschade veroorzaken. Het gaat *steeds* in veel gevallen om kortdurende experimenten waarbij verwacht mag worden dat de dieren slechts enkele uren aan het eind van het experiment ongerief door leverschade zullen ondervinden. In de langdurige experimenten (Bijlage 2) worden humane eindpunten gehanteerd die in principe zouden moeten voorkomen dat de dieren ernstig ongerief ondervinden.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen vervangen.  
Het onderzoek heeft echter wel tot doel dierproeven uiteindelijk te vervangen door *in vitro* protocollen.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de vermindering van dierproeven.  
Daar waar variabelen in de uitleesparameters bekend zijn is een poweranalyse toegepast en zijn de juiste statistische methoden van toepassing. Voor de *in vitro* experimenten wordt het aantal dieren bepaald door de celopbrengst en het aantal condities dat in de test wordt opgenomen. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat.
9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven in die zin dat standaard huisvesting met kooiverrijking wordt toegepast. Dat in een aantal gevallen leverschade kan ontstaan is onlosmakelijk verbonden met de aard van de experimenten. Het project is echter zo opgezet dat de proeven zo min mogelijk ongerief zullen veroorzaken. Er is geen sprake van een negatief milieueffect.
10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd.

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

Op basis van de overwegingen in deel C komt de DEC-Utrecht tot de volgende afweging over de ethische toelaatbaarheid van het project.

Het aantal dieren dat gebruikt zal worden, alsmede het geringe ongerief dat 80% van de dieren zal ondergaan en het matige ongerief voor de overige 20% zijn in verhouding tot de te verwachte baten van het project: het voorkomen van leverschade door medicijngebruik; het vervangen van dierproeven door *in vitro* methoden met het doel in ontwikkeling zijnde geneesmiddelen op DILI-activiteit te kunnen testen; en de ontwikkeling van geneesmiddelen die DILI veroorzaken tijdig te kunnen stoppen en zeker voor ze de patiënt bereiken.

Deze kosten en baten tegen elkaar afwegend acht de DEC-Utrecht dit project ethisch toelaatbaar.

### **E. Advies**

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden

De DEC-Utrecht adviseert de vergunning te verlenen.

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

### **Dierexperimentencommissie Utrecht**



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht

[REDACTED]

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD108002016503

**Bijlagen**

2

Datum 1 april 2016

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 1 april 2016.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD108002016503. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

**Wacht met de uitvoering van uw project**

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

**Factuur**

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

**Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur



Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]  
Functie: Onderzoeksmedewerker  
Afdeling: [REDACTED]  
Telefoonnummer: [REDACTED]  
E-mailadres: [REDACTED]

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

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

**Over uw aanvraag**

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

**Over uw project**

Geplande startdatum: 1 mei 2016  
Geplande einddatum: 1 april 2020  
Titel project: Mechanism-based Integrated Systems for the Prediction of Drug Induced Liver Injury  
Titel niet-technische samenvatting: Mechanismen van leverschade door medicijngebruik  
Naam DEC: DEC Utrecht  
Postadres DEC: Postbus 85500 3508 GA Utrecht  
E-mailadres DEC: dec-utrecht@umcutrecht.nl

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 1.441,-  
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

Verplichte bijlagen:             Projectvoorstel  
    Beschrijving Dierproeven  
    Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen:                 DEC-advies

**Ondertekening**

Naam:                                  
Functie:                               
Plaats:                              Utrecht  
Datum:                               31 maart 2016



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UU-ASC  
Postbus 80.011  
3508 TA UTRECHT  


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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD108002016503  
**Bijlagen**  
2

Datum 1 april 2016  
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**  
Factuurdatum: 1 april 2016  
Vervaldatum: 1 mei 2016  
Factuurnummer: 16700503  
Ordernummer: CB.841910.3.01.011

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD108002016503	€ 1.441,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL41RBOS 056.999.6317 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93144, 2509 AC te 's Gravenhage.



**Van:** Info-zbo  
**Verzonden:** dinsdag 10 mei 2016 15:16  
**Aan:** [REDACTED]  
**CC:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** AVD108002016503: aanvullende informatie

Geachte [REDACTED]

Zojuist hebben wij u een e-mail gestuurd met daarin de verkeerde titel en het verkeerde aanvraagnummer ([REDACTED]). Onze excuus daarvoor. U kunt deze e-mail verwijderen. Onderstaand vindt u de correcte informatie.

Wij hebben een aanvraag van u in behandeling getiteld 'Mechanism-based Integrated Systems for the Prediction of Drug Induced Liver Injury' met aanvraagnummer AVD108002016503.

Wij hebben nog twee vragen over deze aanvraag.

De ongeriefsclassificatie in bijlage 3.4.4.1 lijkt niet correct. U geeft aan dat een deel van de dieren matig tot ernstig ongerief zullen ondergaan. Het ernstig ongerief komt in de ongeriefsclassificatie echter niet naar voren (75% licht, 25% matig).

U wordt verzocht aan te geven welk percentage dieren ernstig ongerief zullen ondergaan. Kunt u, indien er in bijlage 3.4.4.1 sprake is van ernstig ongerief, aangeven of dit voor bijlage 3.4.4.2. ook het geval is.

Ook de ongeriefsclassificatie in bijlage 3.4.4.3. lijkt niet correct. Op basis van de in de aanvraag verstrekte informatie zou dit terminaal moeten zijn i.p.v. licht: Levercellen worden geïsoleerd terwijl de dieren onder narcose zijn. Daarna worden de dieren gedood en wordt het beenmerg en de milt geïsoleerd. Er lijken geen voorafgaande handelingen te zijn. Kunt u bevestigen dat dit correct is. Indien de dieren wel handelingen ondergaan voor zij onder narcose worden gebracht, wordt u verzocht deze te vermelden.

#### **Opsturen informatie**

U heeft 14 dagen de tijd om te antwoorden. De CCD wil uw aanvraag echter graag in haar eerstvolgende vergadering bespreken. Wij zouden daarom de antwoorden graag uiterlijk donderdag 12 mei 2016 ontvangen.

#### **Wanneer een beslissing**

De beslistermijn op uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat bovengenoemde informatie is ontvangen. Na ontvangst van uw reactie/de ontbrekende informatie nemen wij uw aanvraag verder in behandeling. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]  
**Centrale Commissie Dierproeven** [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

**T: 0900 2800028**

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

**Van:** [REDACTED]  
**Verzonden:** vrijdag 13 mei 2016 9:27  
**Aan:** 'Info-zbo'  
**Onderwerp:** RE: AVD108002016503: Aanvullende informatie  
**Categorieën:** Dossier: [REDACTED]

Geachte CCD,

3.4.4.1. Acute ernstige leverschade leidt niet binnen 4 uur tot ernstig ongerief. De schade kan in die korte tijd ernstig zijn, maar het ongerief niet.

3.4.4.2: Mocht er in bijlage 2 ernstig ongerief zijn, dan betreft het waarschijnlijk een humaan eindpunt en zal het ernstige ongerief hoogstens kortdurend zijn.

3.4.4.3: Als er zonder voorafgaande handeling eerst onder anesthesie levercellen worden geïsoleerd en de dieren daarna onder dezelfde anesthesie worden gedood, dan is de categorie terminaal van toepassing. Als het dier eerst onder anesthesie gedood wordt en de levercellen na de dood worden geïsoleerd, dan is het ongerief licht. Voor de DEC maakt dat voor de ethische afweging niets uit. In beide gevallen bestaat het ongerief er uit dat het dier onder anesthesie wordt gebracht.

Met vriendelijke groeten,



[REDACTED]  
 [REDACTED] Postbus 85500 | 3508 GA UTRECHT  
 [REDACTED] [www.umcutrecht.nl](http://www.umcutrecht.nl)

De informatie opgenomen in dit bericht kan vertrouwelijk zijn en is uitsluitend bestemd voor de geadresseerde. Indien u dit bericht onterecht ontvangt, wordt u verzocht de inhoud niet te gebruiken en de afzender direct te informeren door het bericht te retourneren. Het Universitair Medisch Centrum Utrecht is een publiekrechtelijke rechtspersoon in de zin van de W.H.W. (Wet Hoger Onderwijs en Wetenschappelijk Onderzoek) en staat geregistreerd bij de Kamer van Koophandel voor Midden-Nederland onder nr. 30244197.

 Denk s.v.p. aan het milieu voor u deze e-mail afdrukt.

**Van:** Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]  
**Verzonden:** dinsdag 10 mei 2016 15:17  
**Aan:** dec-utrecht  
**Onderwerp:** AVD108002016503: Aanvullende informatie

Geachte DEC,

Wij hebben een aanvraag van u in behandeling waarover u ons van advies heeft voorzien. Het gaat om het project getiteld 'Mechanism-based Integrated Systems for the Prediction of Drug Induced Liver Injury' met aanvraagnummer AVD108002016503.

Wij hebben de aanvrager zojuist nog een aantal vragen gesteld over deze aanvraag.

De ongeriefsclassificatie in bijlage 3.4.4.1 lijkt niet correct. U geeft aan dat een deel van de dieren matig tot ernstig ongerief zullen ondergaan. Het ernstig ongerief komt in de ongeriefsclassificatie echter niet naar voren (75% licht, 25% matig).

U wordt verzocht aan te geven welk percentage dieren ernstig ongerief zullen ondergaan. Kunt u, indien er in bijlage 3.4.4.1 sprake is van ernstig ongerief, aangeven of dit voor bijlage 3.4.4.2. ook het geval is.

Ook de ongeriefsclassificatie in bijlage 3.4.4.3. lijkt niet correct. Op basis van de in de aanvraag verstrekte informatie zou dit terminaal moeten zijn i.p.v. licht: Levercellen worden geïsoleerd terwijl de dieren onder narcose zijn. Daarna worden de dieren gedood en wordt het beenmerg en de milt geïsoleerd. Er lijken geen voorafgaande handelingen te zijn. Kunt u bevestigen dat dit correct is. Indien de dieren wel handelingen ondergaan voor zij onder narcose worden gebracht, wordt u verzocht deze te vermelden.

Mocht u ons over deze onderwerpen nog aanvullend willen adviseren, zouden wij graag uiterlijk donderdag 12 mei uw aanvullend advies willen ontvangen.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

**T: 0900 2800028**

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

De Rijksdienst voor Ondernemend Nederland (RVO.nl) stimuleert Duurzaam, Agrarisch, Innovatief en Internationaal ondernemen. RVO.nl is per 2014 ontstaan uit de fusie van Agentschap NL en Dienst Regelingen.

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.

---

De inhoud van dit bericht is vertrouwelijk en alleen bestemd voor de geadresseerde(n). Anderen dan de geadresseerde(n) mogen geen gebruik maken van dit bericht, het niet openbaar maken of op enige wijze verspreiden of vermenigvuldigen. Het UMCG kan niet aansprakelijk gesteld worden voor een incomplete aankomst of vertraging van dit verzonden bericht.

The contents of this message are confidential and only intended for the eyes of the addressee(s). Others than the addressee(s) are not allowed to use this message, to make it public or to distribute or multiply this message in any way. The UMCG cannot be held responsible for incomplete reception or delay of this transferred message.



## Appendix

### Description animal procedures

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

#### 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.
- 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 |
|---------------|--------------------------|
| 1             | Single dose models       |

*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.

##### Single dose model:

Since it is hypothesized that inflammation is one of the factors that determines whether DILI occurs in patients, we aim to test different DILI-associated compounds under the influence of inflammatory stimuli, such as TNF. In particular, we want to characterize the role of the immune system in development of

this type of DILI, thus identifying commonalities in mechanisms among different drugs. Outcome parameters will include biochemical (e.g. liver enzymes), immune and histopathological changes in various interacting organs (e.g. intestine, spleen, liver).

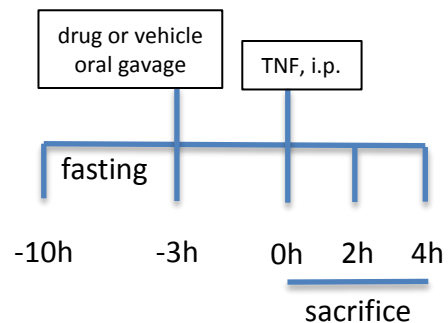
Describe the proposed animal procedures, including the nature, frequency and duration of the treatment. Provide justifications for the selected approach.

Fasting is used frequently in mouse models of DILI, in order to reduce the variance of drug availability. In addition fasting may represent an additional cellular stress that makes mice more sensitive to DILI. For this reason we will consider to introduce one group that receives TVX+TNF without fasting. This has been assessed for TVX (personal communication with consortium partners) but may differ per drug. For each drug we will evaluate the necessity of fasting in a small pilot study.

Depending on the outcome of the pilot, mice will be fasted and receive an oral gavage of:

- DILI-associated compounds
- related compounds not associated with DILI but pharmacologically or chemically resembling the DILI-associated compounds
- vehicle alone

The treatment scheme is as follows:



**In the general set-up 4 groups are used:**

- Group 1: mice receiving Trovafloxacin (DILI-associated compound) and TNF
- Group 2: mice receiving Levofloxacin (the pharmacological analogue of Trovafloxacin) and TNF
- Group 3: mice receiving vehicle and TNF
- Group 4: mice receiving none of the treatments
- Group 5: mice receiving Trovafloxacin and TNF without fasting

In words, three hrs after the single oral administration of the drug or vehicle, mice will be injected intraperitoneally with TNF. Organs (i.e. intestine, spleen, liver and also blood) will be collected at three time points. Until now we have used the time points T=0 (so 3 hrs after dosing with TVX as the drug, but before dosing of TNF) and T=2h and T=4h (both after administration of TNF). For new drugs we will use information from literature or the consortium to define the initial dose that will then be tested for one time point only (T=4 h).

In total an experiment according to the general set-up will last 14 hrs (taking into account fasting of 7 hrs and the treatment from drug exposure to final dissections). Analyses will include i.e. flow cytometry, immunohistology, PCR, levels of particular proteins in tissues and in serum/plasma (obtained by bleeding). Flow cytometry will include both innate and adaptive immune cells. Immunohistology will include detection of localization of tissue damage (apoptosis, necrosis), influx of inflammatory cells but also localized expression of cytokines, chemokines etc. PCR will be done to detect changes in RNA expression of signalling molecules and cytokines and chemokines whereas proteins to be detected in serum include liver enzymes, cytokines and chemokines. To characterize in depth the cause of changes mechanistically we will also analyse the effects of specific inhibiting or modulating substances on the onset and regulation of DILI. We aim to use specific substances such as [REDACTED]

[REDACTED] In addition, we aim to interfere with certain immunological receptors and cells by using specific monoclonal antibodies to inhibit or deplete immune cells, [REDACTED]. The number of modulations (e.g. substances or monoclonal antibodies) depends on initial findings (e.g. changes in subsets of lymphocytes), but we estimate to include a maximum of 10 modulations per drug combination.

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

Power analysis will be performed before each experiment, based on the parameters which will be evaluated. Since damage of the liver will be our main parameter aside to immunological changes, power analysis will be based on liver enzyme levels (e.g. ALT) in blood. Based on this parameter, we have used 8 animals per group in previous experiments.

## B. The animals

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

**Species:** For these experiments, mice will be used (e.g. C56BL/6). The choice for a mouse model is based on the similarities between the immune system of humans and mice, but also because the immune system in mice is already well characterized and several tools are available to study the mechanisms involved in DILI. The aim of the project is not to develop a new in vivo model but to define mechanistic knowledge that will help to develop in vitro models to test potential hepatotoxic compounds during R&D.

Moreover, there are several evidences in scientific literature (Lucena MI et al., Hepatology 2009) which state that sex is a determinant in the severity and predisposition to DILI. Since we do not know whether gender matters for the selected compound, we suggest to start testing female for fluoroquinolones. Depending on results (e.g. statistical variance) we will decide whether we will use both female and male mice or use the most susceptible gender in the next experiments with the fluoroquinolones. For every new drug we have to test again the gender susceptibility. [REDACTED] MIP-DILI project (**Mechanism-based Integrated Systems for the Prediction of Drug Induced Liver Injury**).

**Origin:** Animals will be purchased from a registered commercial provider in EU, including the Netherlands, such as Charles River Laboratories or Harlan Laboratories.

**Estimated numbers:** Previously, we used 8 animals per group, based on power calculation using liver enzymes (ALT) in the serum as the parameter. In case of an experiment according the general set up (4 treatment groups, see scheme) with only one time point we therefore need 32 animals per drug. With this set up we will confirm the effective dose for DILI. Since we will test a maximum of 5 drug combinations (5 DILI and 5 matching non-DILI drugs) we will need  $5 \times 32 = 160$  animals.

Subsequent experiments with modulating compounds will include 3 time points (to evaluate kinetics of effect) and 10 modulations (e.g. substances or monoclonal antibodies) at the most. Together, for these experiments we therefore estimate to use 3 (time points) x 10 (number of modulators) x 160 (number of animals for 5 drug combinations) = 4800 mice.

For the work described in this appendix we will need a total of 4960 mice.

### C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

### D. Replacement, reduction, refinement

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

#### Replacement:

The kinetics of recruitment and the activation of immune cells to the site of damage is difficult to reproduce in vitro due to the mutual interactions of different cell types (e.g. immune cells, hepatocytes, endothelial cells) from different organs of the body (e.g. interaction between intestine, liver and spleen). To evaluate these parameters an integrated in vivo approach is needed. Mechanistic information collected from these in vivo experiments will shed light on the crucial processes involved in DILI, which is needed in order to develop in vitro tests for the identification of potential DILI-inducing new drug entities. This will add also to reduction of animals in the future. The involvement in the MIP-DILI consortium, which aims to reduce animal use for this type of toxicology, ensures the translation from in vivo to in vitro.

#### Reduction:

The number of animals per group will be determined by the use of power analysis on the basis of the most relevant parameter needed for the study. The number of animals in experiment until now is based on expected effects (liver damage, particularly values of liver enzymes such as ALT in blood).

#### Refinements:

Mice will be housed in groups and in cages with environmental enrichment. They will be daily monitored in order to prevent any unexpected discomfort.

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

On the basis of findings (abnormal behavior and animal characteristics) and the level of discomfort (standard methods of [REDACTED], veterinary personnel will be consulted.

## 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.

NA

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

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

No

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

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

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

## Classification of discomfort/humane endpoints

### H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question 1.

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

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

Pain relieving method will not be possible for 3 reasons:

-the duration of the experiment is short (based on our experience the liver injury starts to develop from 2 hrs to 4 hrs after TNF injection, at max 4 hrs animals are killed and dissected, see scheme),

-the severity of the expected adverse reaction is overall mild (in more than 89 % of animals) and possibly severe in less than 11% of animals (depending on the drug and time of cytokine exposure),

-pain relieving drugs may interfere with DILI inducing drugs and inflammatory responses

Yes

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

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

No evidences are in support of potential adverse effects due to the experimental procedures.

Explain why these effects may emerge.



We do not expect any other effects.

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

Alteration of animal behaviours and evaluation of the discomfort of the animal will result in immediate consultation of the animal welfare body or the designated veterinarian

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

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

No > Continue with question K.

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

Indicate the likely incidence.

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

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

Mild for 89% or more of the animals, possibly severe for 11% of the animals. That is, only animals that receive the DILI-associated compound are expected to develop severe damage after exposure to the drugs; and only between 2 and 4 hrs after the injection of the cytokine (1/3 of the animals receive the potentially toxic compound, and of these only 1/3, will last until 4 hrs). The experiments will last maximally 14 hrs, but only the last 2 hrs (i.e. from 2 to 4 hrs after TNF treatment) liver injury may become severe, based on TVX results, and depending on the drug tested.

### **End of experiment**

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

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'signatures'.

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

Excision of organs will be necessary to perform the analysis.

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

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

Yes



## Appendix

### Description animal procedures

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

#### 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.
- 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                          |
|--------------------------------|---|
| <input type="text" value="2"/> | <input type="text" value="Multiple dose models"/> |

*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.

##### Multiple dose models:

We here aim to investigate whether adaptive immunity and immunoregulation are important in preventing elicitation of adaptive immune responses in DILI, for instance TVX-induced DILI.

In this project, we aim to test prolonged repetitive administration of different DILI-associated drugs in combination with a disruption of mechanisms involved in the onset of tolerance using specific monoclonal antibodies [REDACTED] are important receptors on regulatory T cells to sustain their regulatory function. (moved to 3.4)

Importantly, innate immune responses triggered by TNF (as described in appendix 1) may contribute to adaptive immune responses. Therefore, mechanisms that are identified in single dose studies (appendix 1) will be translated to studies in this appendix, i.e. similar pharmacological modulators will be considered in multiple dose studies. Along with DILI-associated drugs, structural homologues that do not cause DILI will be tested.

Primary outcome parameters include immunological and histopathological changes in liver and spleen and levels of circulating T cells and antibodies.

---

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

Mice are treated with compounds via intragastric gavage once a day for six weeks. To analyse the capacity of suspected drugs to support adaptive immune responses, well-defined antigens (e.g. ovalbumin) will be co-injected during drug exposure as so-called bystander antigen. In this way, kinetics of specific immune responses can easily be analysed.

Specific monoclonal antibodies are administered i.p. before or around during exposure depending on the antibody. Injections will be done 3 times per week.

For pharmacological modulators dosing will be determined based on literature data or experience from other partners

Various mouse strains will be used, among those transgenic OT mice and KO mice [REDACTED]

As modulators monoclonal antibodies directed to immune receptors (e.g. costimulatory receptors) will be used.

Blood samples will be taken several times, but not more than 8 ml/kg/14 days. Primary outcome parameters in blood are liver enzymes (e.g. ALT), cytokines and (auto-)antibodies. At 3 time points during 6 weeks treatment, mice will be dissected and various organs (e.g. liver, spleen and intestine) will be collected for further analyses, e.g. flow cytometry, analyses of antibody producing cells (to e.g. ovalbumin), specific antibodies, clinical parameters and gene and protein expression.

To determine the effects of modulation, vehicle controls with and without modulation will be included. DILI-associated compounds are compared to pharmacologically or chemically related compounds that are not associated with DILI.

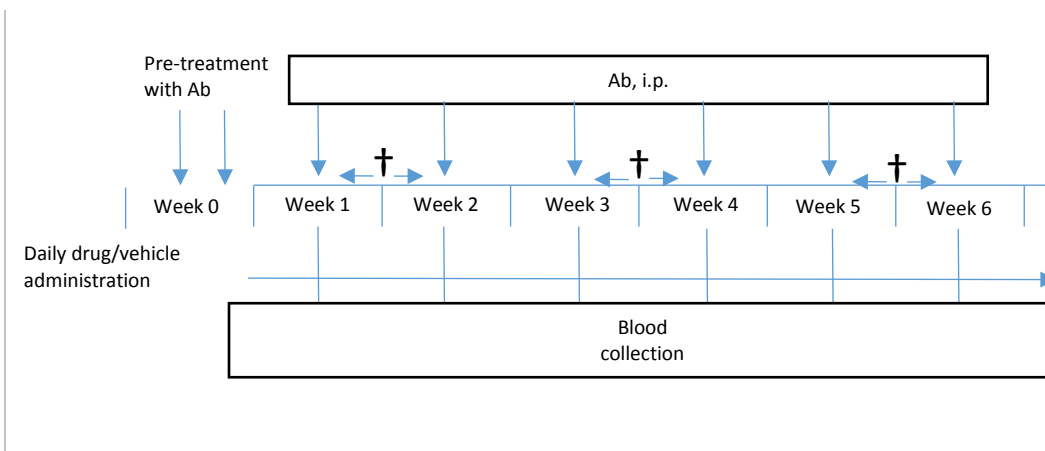
An example of a typical experiment is outlined below.

Mice will be treated up to 6 weeks with:

- 1- DILI-associated compounds + no modulation
- 2- compounds not associated with DILI but pharmacologically or chemically resembling the DILI-associated compounds + no modulation
- 3- DILI-associated compounds + specific modulation
- 4- compounds not associated with DILI but pharmacologically or chemically resembling the DILI-associated compounds + specific modulation
- 5- vehicle alone + no modulation
- 6- vehicle alone + specific modulation

Only in groups 1 and 3, DILI or associated immune changes are expected.

**Mice will be treated as follow:**



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

Power analysis will be performed before each experiment, based on the parameters that will be evaluated. Since damage of the liver will be our main parameter, power analysis will be based on liver enzyme levels (ALT) in blood.

## B. The animals

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

**Species:** For these experiments, 6-8 wk old mice will be used (e.g. C56BL/6). The choice for mouse as a model species is based on the similarities between the immune system of humans and mice, but also because the immune system in mice is well characterized and several tools are available on the market in order to study the mechanisms involved in DILI. In addition dosing regimen of various DILI-inducing drugs are known for the mouse.

The ■-MIP-DILI project aims to develop in vitro models in order to test potential hepatotoxic compounds and not to develop new in vivo models.

Moreover, there are several evidences in scientific literature (Lucena MI et al., Hepatology 2009) which state that sex is a determinant in the severity and predisposition to DILI. Since gender difference is not relevant for MIP-DILI (**Mechanism-based Integrated Systems for the Prediction of Drug Induced Liver Injury**) project we do not consider to test female and male together because this will lead to more variance in the parameters used.

**Origin:** Animals will be purchased from a registered commercial provider in EU, including the Netherlands, such as Charles River Laboratories or Harlan Laboratories, or in US (Jackson).

**Estimated numbers:** The estimated number of animals is derived from the above set up of 6 experimental groups. Based on experience and ALT levels in serum as key parameter (to perform power analyses) the required number of mice per group is 8. A maximum of 3 drug combinations will be tested in this set-up of multiple dosing. The selection of drug combinations will be based on studies done in appendix 1. Based on earlier findings and literature, we expect to do maximum 10 modulations, whereas a max of 3 time points per experiment will be analysed. In total this accounts for a maximum of: 6 (experimental groups per drug combinations) x 3 (drug combinations) x 10 (modulations) x 3 (time points) x 8 animals = 4320.

## C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

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

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

##### **Replacement:**

The kinetics of recruitment and the activation of immune cells to the site of damage is difficult to reproduce in vitro due to the mutual interactions of different cell types (e.g. immune cells, hepatocytes, endothelial cells) from different organs of the body (e.g. interaction between intestine, liver and spleen). To evaluate these parameters an integrated in vivo approach is needed. Mechanistic information collected from these in vivo experiments will shed light on the crucial processes involved in DILI, which is needed in order to develop in vitro tests for the identification of potential DILI-inducing new drug entities. This will add also to reduction of animals in the future. The involvement in the ■■■-MIP-DILI consortium, which aims to reduce animal use for this type of toxicology, ensures the translation from in vivo to in vitro.

##### **Reduction:**

The amount of animals will be limited by choosing the minimal number of control and treatment groups, necessary to achieve optimal results. The number of animals per group will be determined by the use of power analysis on the basis of the most relevant parameter needed for the study.

The number of animals in experiment until now is based on expected effects (liver damage, particularly values of liver enzymes such as ALT in blood).

##### **Refinements:**

Mice will be housed in groups and in cages with environmental enrichment. They will be daily monitored in order to prevent any unexpected discomfort.

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

Treatment will be performed by trained personnel to limit stress as a result of animal handling.

### **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.

NA

### **Accommodation and care**

#### F. Accommodation and care

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

No

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

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

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

### Classification of discomfort/humane endpoints

#### H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question 1.

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

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

Pain relieving methods will not be possible as they will interfere with drug-induced effects (involving activation of innate immune system and inflammation) in the liver.

Yes

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

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

For antibiotic drugs mild diarrhoea might be observed.

Explain why these effects may emerge.

Depletion of gut flora may alter motility of the intestine leading to diarrhoea

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

Mice will be carefully monitored and in case of diarrhoea liquefied feed (weekvoer) will be supplied. Animals will be sacrificed when weight drops more than 20%

### 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.

If the above mentioned adverse effects will occur, animals will be sacrificed if body weight drops more than 20% over whole period of the experiment. In addition, in case severe health issues (diarrhea, prolapse, dehydration, lethargy) mice will be sacrificed.

Indicate the likely incidence.

Unlikely

### 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').

Moderate: max 67% of animals. In the multiple exposure study, doses will be used that by itself do not cause severe liver damage, but this damage may be enhanced by modulations. The potential damage in the liver tissue will be revealed by the blood ALT evaluation (once a week). Based on literature information, animals may suffer from the treatment and lose body weight. see J for humane endpoints.

Mild: 33% of animals not receiving a modulation treatment.

## End of experiment

### L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'signatures'.

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

Excision of organs will be necessary to perform the analysis.

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

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

Yes



## Appendix Description animal procedures

- This appendix should be enclosed

### 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure   |
|---------------|--|
| 3             | Development of in vitro models of DILI for the identification of intracellular mechanisms and confirmation of interplay among several cell types |
- 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.

We aim to develop and validate predictive in vitro tests for the identification of DILI-associated compound during preclinical drug development. Based in mechanisms of DILI identified in vivo (experiments listed in appendixes 1 and 2), relevant in vitro tests will be explored and developed. Currently,



we are using in vitro tests to detect: -1. leukocytes recruitment (neutrophils migration and activation, Koenderman L et al., *Thrombosis and Haemostasis* 2010) ; and 2-responses to antigen stimulation (e.g. dendritic cell (DC)-induced lymphocyte proliferation, Garulli B et al., *Clinical and Vaccine Immunology* 2008); and 3- hepatocyte-DC cocultures. These **three** in vitro tests have been selected because the mechanistically link to in vivo findings obtained in mouse studies with TVX

Importantly, in vitro tests will represent a strategic asset to investigate intra-cellular pathways involved in the relevant physiological events linked to DILI. Those tests will serve as predictive tool to exclude potential hepatotoxic compounds during pre-clinical drug development. For these reasons, other DILI-associated compounds in human (and their non-toxic pharmacological analogues) will be tested, in order to validate the developed tests. Based on results obtained in experiments done in appendix 1 and 2, we may also set up other in vitro tests based on donor material.

---

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

Mice will:

- 1- be anesthetized in order to isolate different cell types from liver: hepatocytes and leukocytes. Anaesthetic administration is required in order to perfuse the liver with collagenase and ensure a proper yield of viable cells.
- 2- undergo cervical dislocation in order to isolate bone marrow and spleen: several cell cultures will be obtained using cells from those organs (e.g. bone marrow-derived DC culture, Lutz MB et al., *Journal of Immunological Methods* 1999)

---

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

Power analysis will be performed before each experiment, based on the parameters that will be evaluated. Depending on the mechanism investigated different parameters will be taken into account. The number of mice depends on the cell yield for each cell type.

An experiment with co-cultures of freshly isolated hepatocytes and DC with 10 compounds needs around 6480 incubations (based on three concentrations (3) x 4 (inflammatory conditions, i.e combinations of LPS and or cytokines) x 2 (incubated with or without modulator or with and without UV light) x 3 time points x 3 (triplo) x 3 (repetitions) x 10 (compounds). Per mouse we obtain  $20 \times 10^6$  DC, and  $10^6$  hepatocytes.

#### **Example of an experimental setup:**

##### Primary hepatocytes:

Group 1a/b: incubated with Trovafloxacin (TVX) and with/or without modulator

Group 2: incubated with Levofloxacin (LVX) and with/or without modulator

Group 3: incubated with vehicle and with/or without modulator

Monocytes and neutrophils migration will be tested using the supernatant of hepatocytes incubated as mentioned above and different time points after treatment with drug or modulating chemicals (Koenderman L et al., *Thrombosis and Haemostasis* 2010; Elliott M et al., *Nature* 2010).

For modulators see appendix 1 and 2

Per incubation  $0.5 \times 10^6$  cells are needed, so per mouse 20 incubations (based on hepatocytes) can be done. Since it is estimated that we will do 6500 incubations we will need 325 mice. In addition we need separate mice for DC isolations. These cannot be obtained from the same animals for logistic reasons (DC need to be cultured for 6-10 days to fully mature from bone marrow cells, whereas hepatocytes are cultured only for a short period). At most we will culture DC with hepatocytes in a ratio of 1 (DC) to 1 (hepatocytes). The number of DC that we obtain from one mouse is  $20 \times 10^6$  (i.e enough for 40 incubations) which indicates that we need 160 mice. In total we need 500 mice.

Monocytes and neutrophil can be obtained from same mice so for this we do not need extra mice.

*NOTE; triplo means that we will perform 3 incubations per experiment; repetitions means that we repeat the entire experiment. Triplo is to take into account the intra-experimental variation (e.g. errors in pipetting), whereas repetitions will account for extra-experimental (for instance day-to-day or donor-to-donor variation). Repetition experiments may not always be exactly the same; for instance extra controls may be added if needed.*

## B. The animals

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

**Species:** For these experiments, mice will be used (e.g. C56BL/6). The choice for a mouse model is based on the similarities between the immune system of humans and mice, but also because the immune system in mice is already well characterized and several tools are available on the market in order to study the mechanisms involved in DILI. The project aims to develop in vitro models in order to test potential hepatotoxic compounds and not to develop a new in vivo model. For this reason we would like not to consider variation in sex, age and strain which might lead to more variance in the parameter used.

**Origin:** Animals will be purchased from a registered commercial provider in EU, including the Netherlands, such as Charles River Laboratories or Harlan Laboratories or in US (Jackson).

**Estimated numbers:** The number of donor mice will be 500.

## C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

## D. Replacement, reduction, refinement

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

### Replacement:

It is still not clear if available cell lines (hepatocytes, DC etc) are resembling the behaviour of primary cells. To evaluate these parameters an integrated approach is needed. For this reason, we will compare results obtained from primary cells with the use of available cell lines (such as hepatocytes and macrophage cell-lines (which are NOT DC)). Evidences collected from these experiments will shed light on the mechanisms involved in DILI, needed to develop in vitro tests for the identification of potential DILI-inducing new drug entities. Experiments will also provide information as the applicability of cell-lines for specific questions.

### Reduction:

The number of animals will be determined, based on the cell yield, and an estimation of the conditions to be tested. The test conditions are selected such that we will obtain optimum results with a minimal number of conditions.

**Refinements:**

Mice will be housed in groups, in cages with environmental enrichment and they will be periodically monitored in order to prevent any unexpected discomfort.

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

Experienced personnel will treat the mice, to prevent unnecessary discomfort due to animal handling. As a limited number of mice is needed to perform the studies, solitary housing can occur when for instance only one animal is needed for isolation of cells. Optimal planning will reduce this risk.

### 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.

nvt

### Accommodation and care

**F. Accommodation and care**

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

No

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

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

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

### Classification of discomfort/humane endpoints

**H. Pain and pain relief**

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question 1.

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

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

Yes

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

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

No adverse effects are expected due to absence of treatment.

Explain why these effects may emerge.

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

### **J. Humane endpoints**

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

No > Continue with question K.

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

Indicate the likely incidence.

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

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

Non-recovery, animals will not be treated before sacrifice.

## **End of experiment**

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

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'signatures'.

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

Excision of the organs is needed.

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

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

Yes

**Centrale Commissie Dierproeven**

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht

t.a.v. de Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht  
Postbus 12007  
3501 AA Utrecht

**Centrale Commissie Dierproeven**

Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

T 0900-28 000 28 (10 ct /min)

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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD108002016503

**Uw referentie**

Datum 02 juni 2016

Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

**Bijlagen**

1

Geachte [REDACTED]

Op 1 april 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'Mechanism-based integrated systems for the prediction of drug induced liver injury' met aanvraagnummer AVD108002016503. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

**Beslissing**

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). U kunt met uw project 'Mechanism-based integrated systems for the prediction of drug induced liver injury' starten. De vergunning wordt afgegeven van 02 juni 2016 tot en met 1 september 2020.

**Voorwaarden**

Aan deze vergunning is de voorwaarde verbonden zoals genoemd in de vergunning en hieronder toegelicht.

In uw aanvraag geeft u aan niet beide geslachten te willen gebruiken, omdat er in de literatuur aanwijzingen zijn dat het geslacht van DILI patiënten bepalend is voor de ernst en predispositie voor DILI. Uit de literatuur blijkt echter niet dat deze verschillen ook in de muis tot uiting komen. Uit het DEC advies blijkt dat u aan de DEC heeft toegelicht dat u geen goede argumenten heeft om slechts één geslacht te gebruiken. Wij zijn daarom van mening dat er niet voldoende grond is om het project met alleen vrouwelijke dieren uit te voeren. Wij hebben daarom een voorwaarde toegevoegd aan deze vergunning waarbij u mannelijke en vrouwelijke dieren in evenredige aantallen dient te gebruiken. Indien gedurende het project blijkt dat er geslachts-specifieke effecten zijn, kunt u deze informatie als wijziging rapporteren aan de CCD. Deze rapportage kan voor de CCD aanleiding zijn om de voorwaarde van gelijk gebruik van beide geslachten te wijzigen of in te trekken. Deze voorwaarde is toegevoegd om het aantal in voorraad gedode dieren te beperken.

**Beoordeling achteraf**

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

**Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Utrecht gevoegd. Dit advies is ontvangen op 1 april 2016. Bij de beoordeling van uw aanvraag is het advies betrokken

**Datum**

02 juni 2016

**Onze referentie**

Aanvraagnummer

AVD108002016503

overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet. Op 13 mei 2016 heeft de DEC ons van aanvullend advies voorzien over de ongeriefsclassificaties. Bij de beoordeling van uw aanvraag is zowel het advies als het aanvullend advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet. Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit. Wij nemen het advies van de Dierexperimentencommissie grotendeels over met uitzondering van bovenstaande afwijkingen. Met het oog op artikel 10a, lid 1 van de wet wordt een algemene voorwaarde toegevoegd.

Wij hebben u op 10 mei 2016 om aanvullende informatie gevraagd over de in de aanvraag beschreven ongeriefsclassificaties. Op 12 mei 2016 heeft u digitaal gereageerd op onze vragen. Wij kunnen ons vinden in de nadere verduidelijking van uw aanvraag.

**Bezwaar**

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen. Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

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

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

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

**Meer informatie**

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

De Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:



ir. G. de Peuter  
Algemeen Secretaris

Dit besluit is genomen met inachtneming van het Besluit mandaat, volmacht en machtiging van de Centrale Commissie Dierproeven CCD 2014 zoals de Centrale Commissie Dierproeven heeft vastgesteld op 19 december 2014, ref 2014-04 en is gepubliceerd in de Staatscourant van 2 januari 2015, Nr. 163

**Bijlagen**

- Vergunning

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



## Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan  
Naam: Universiteit Utrecht  
Postbus: 12007  
Postcode en woonplaats: 3501 AA Utrecht  
Deelnemersnummer: 10800

deze projectvergunning voor het tijdvak 02 juni 2016 tot en met 1 september 2020, voor het project 'Mechanism-based integrated systems for the prediction of drug induced liver injury' met aanvraagnummer AVD108002016503, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Utrecht.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 1 april 2016;
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 1 april 2016;
  - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 1 april 2016;
  - c. Advies van Dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 1 april 2016;
  - d. De aanvullingen op uw aanvraag, zoals ontvangen op 12 mei 2016;
  - e. Aanvullend advies van Dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 13 mei 2016.

### Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst
3.4.4.1. Single dose models	Muizen	4960	Licht: 89% Ernstig: 11%
3.4.4.2. Multiple dose models	Muizen	4320	Licht: 33% Matig: 67%
3.4.4.3. Development of in vitro models of DILI for the identification of intracellular mechanisms and confirmation of interplay among several cell types	Muizen	500	Terminaal

Na afloop van dit project wordt een beoordeling achteraf uitgevoerd. Deze beoordeling zal uiterlijk 1 december 2020 plaatsvinden.

### Voorwaarden

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

Mannelijke en vrouwelijke dieren moeten in evenredige aantallen gebruikt worden. Indien gedurende het project blijkt dat er geslachts-specifieke effecten zijn, kunt u deze informatie als wijziging rapporteren aan de CCD. Deze informatie kan voor de CCD aanleiding zijn om bovenstaande voorwaarde van gelijk gebruik van beide geslachten te wijzigen of in te trekken. Indien voorafgaand aan de proeven al informatie in de literatuur beschikbaar is waaruit blijkt dat een model of proces geslachtsafhankelijk zou zijn, is het ook mogelijk om deze informatie te gebruiken om wetenschappelijk te onderbouwen dat het gebruik van zowel mannelijke als vrouwelijke dieren zou leiden tot een grote toename van het benodigd aantal dieren en dit aan ons te rapporteren.

### Algemene voorwaarde

1) In artikel 10, lid 1a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden



**Datum**

02 juni 2016

**Onze referentie**Aanvraagnummer  
AVD108002016503

bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning.

Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

## **Weergave wet- en regelgeving**

### **Dit project en wijzigingen**

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

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

### **Verzorging**

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

In artikel 9 staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn.

In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.

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

### **Pijnbestrijding en verdooving**

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdooving wordt uitgevoerd tenzij dat niet mogelijk is, dan wel bij het verrichten van een dierproef worden pijnstillers toegediend of andere goede methoden gebruikt die de pijn, het lijden, de angst of de blijvende schade bij het dier tot een minimum beperken. Een dierproef die bij het dier gepaard gaat met zwaar letsel dat hevige pijn kan veroorzaken, wordt niet zonder verdooving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdooving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdooving onverenigbaar is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd voldoende verdooving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn kunnen lijden als de verdooving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

### **Einde van een dierproef**

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

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

**Datum**

02 juni 2016

**Onze referentie**

Aanvraagnummer

AVD108002016503

Uit artikel 13c 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 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, lid 1d en lid 3 van de wet moeten projecten waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt, projecten die als ernstig ingedeelde dierproeven omvatten of een dierproef die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, achteraf beoordeeld worden. In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet en wordt daarom voorzien van een beoordeling achteraf. Deze beoordeling zal uiterlijk 1 september 2020 plaatsvinden. Er zal dan beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt. Daarnaast wordt bekeken of de schade die de dieren hebben ondervonden, het aantal en soorten proefdieren en de ernst van de dierproeven conform de vergunning waren.

Inventaris Wob-verzoek W16-19S									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	<b>NTS2016504</b>								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel				x	x		x	
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1				x	x		x	
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2				x	x		x	
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3				x	x		x	
7	Bijlage beschrijving dierproeven 4				x	x		x	
8	DEC-advies				x		x	x	
9	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
10	Verzoek aanvulling vergunninghouder				x		x	x	
11	Verzoek aanvulling DEC				x		x	x	
12	Reactie aanvulling vergunninghouder				x	x	x	x	
13	Reactie aanvulling DEC				x		x	x	
14	Advies CCD		x						x
15	Beschikking en vergunning				x	x	x	x	

Ard 105002016504



14 APR. 2016

### Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

#### 1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 10500 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen															
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">Naam instelling of organisatie</td> <td>Rijksuniversiteit Groningen</td> </tr> <tr> <td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td> <td>[Redacted]</td> </tr> <tr> <td>KvK-nummer</td> <td>1 1 7 9 0 3 7</td> </tr> </table>	Naam instelling of organisatie	Rijksuniversiteit Groningen	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]	KvK-nummer	1 1 7 9 0 3 7									
Naam instelling of organisatie	Rijksuniversiteit Groningen																
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]																
KvK-nummer	1 1 7 9 0 3 7																
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>	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">Straat en huisnummer</td> <td>A. Deusinglaan 1, [Redacted]</td> </tr> <tr> <td>Postbus</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Postcode en plaats</td> <td>9713AV GRONINGEN</td> </tr> <tr> <td>IBAN</td> <td>NL80ABNA0446049352</td> </tr> <tr> <td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td> <td>Rijksuniversiteit Groningen</td> </tr> </table>	Straat en huisnummer	A. Deusinglaan 1, [Redacted]	Postbus		Postcode en plaats	9713AV GRONINGEN	IBAN	NL80ABNA0446049352	Tenaamstelling van het rekeningnummer	Rijksuniversiteit Groningen					
Straat en huisnummer	A. Deusinglaan 1, [Redacted]																
Postbus																	
Postcode en plaats	9713AV GRONINGEN																
IBAN	NL80ABNA0446049352																
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Rijksuniversiteit Groningen																
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">(Titel) Naam en voorletters</td> <td>[Redacted]</td> <td style="width: 50%;"><input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td>[Redacted]</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td>[Redacted]</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> <td>[Redacted]</td> <td></td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td>[Redacted]</td> <td></td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.	Functie	[Redacted]		Afdeling	[Redacted]		Telefoonnummer	[Redacted]		E-mailadres	[Redacted]	
(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.															
Functie	[Redacted]																
Afdeling	[Redacted]																
Telefoonnummer	[Redacted]																
E-mailadres	[Redacted]																
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">(Titel) Naam en voorletters</td> <td>[Redacted]</td> <td style="width: 50%;"><input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td>[Redacted]</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td>[Redacted]</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> <td>[Redacted]</td> <td></td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td>[Redacted]</td> <td></td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie	[Redacted]		Afdeling	[Redacted]		Telefoonnummer	[Redacted]		E-mailadres	[Redacted]	
(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.															
Functie	[Redacted]																
Afdeling	[Redacted]																
Telefoonnummer	[Redacted]																
E-mailadres	[Redacted]																

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

## 2 Over uw aanvraag

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

## 3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- |            |                     |
|------------|---------------------|
| Startdatum | 0 1 . 0 6 . 2 0 1 6 |
| Einddatum  | 3 1 . 0 5 . 2 0 2 1 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- |   |
|---|
| Development of therapeutic strategies for a regenerative therapy for multiple sclerosis |
|---|
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- |   |
|---|
| Ontwikkelen van therapeutische strategieën voor een remyelinisatie therapie in MS |
|---|
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- |             |                      |
|-------------|----------------------|
| Naam DEC    | DEC-RUG              |
| Postadres   | A. Deusinglaan 1     |
| E-mailadres | secrdec.umcg@umcg.nl |

## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?  Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1.584,00 Lege  
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.  
*Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*  
 Via een eenmalige incasso  
 Na ontvangst van de factuur

## 5 Checklist bijlagen

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

## 6 Ondertekening


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

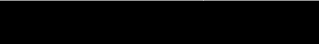
Centrale Commissie  
 Dierproeven  
 Postbus 20401  
 2500 EK Den Haag




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


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

Naam 

Functie 

Plaats Groningen

Datum 12-04-2016 

Handtekening 







## Format Projectvoorstel dierproeven

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

### 1 Algemene gegevens

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

### 2 Categorie van het project

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

### 3 Algemene projectbeschrijving

#### 3.1 Achtergrond

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

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

#### Multiple sclerosis: remyelination failure and disease progression

Multiple sclerosis (MS) is a chronic demyelinating disease of the central nervous system (CNS). Clinical symptoms are manifested in a relapsing-remitting or progressive course, leading to an ultimate decline in neurological activity [1]. Current MS therapies focus on immunomodulation, which is effective in relapsing-remitting MS, but not in the progressive stages. The latter would benefit from a neuroprotective approach, including a regenerative therapy. Indeed, remyelination following demyelination is essential for axonal survival and restoration of saltatory conduction, and its failure, despite the presence of oligodendrocyte progenitor cells (OPCs), is a major cause of the neurological deficits in MS [2,3]. Therefore, restoring remyelination in MS should provide an effective treatment in halting disease progression and reversing disability. For the development of such a therapy, elucidation of molecular and cellular mechanisms that contribute to failure or restoration of remyelination are imperative. Therefore, our goal is to identify environmental abnormalities, i.e., extrinsic and intrinsic factors that hamper remyelination or factors that are able to modulate remyelination but are lacking in MS lesions. This will be followed by their selective functional targeting to favour the development of therapeutic strategies for remyelination in MS. Evidently, the development of strategies to promote remyelination might also benefit other demyelinating, dysmyelinating and neurodegenerative diseases.

Previous and further research:

1. Extrinsic factors that contribute to remyelination (failure)

a) [redacted] We and others have [redacted]  
[redacted] More specifically, we [redacted]  
[redacted] We have [redacted]  
[redacted]  
[redacted]  
[redacted]  
[redacted]  
[redacted]  
[redacted]

b) [redacted]. Previously, we have  
[redacted]  
[redacted]  
[redacted].  
[redacted]  
[redacted]

c) [redacted]  
[redacted]  
[redacted] This finding may explain why [redacted]  
[redacted]  
[redacted]

d) [redacted]  
[redacted]  
[redacted]  
[redacted]  
[redacted]  
[redacted]  
[redacted]  
[redacted]

2. [REDACTED]

a) [REDACTED]

References:

[1] Compston A, Coles A. (2008). Multiple sclerosis. *Lancet* 372: 1502-17

[2] Goldschmidt T, Antel J, König FB, Brück W, Kuhlmann T. (2009). Remyelination capacity of the MS brain decreases with disease chronicity. *Neurology* 72: 1914-21.

[3] Kuhlmann T, Miron V, Cui Q, Wegner C, Antel J, Brück W (2008). Differentiation block of oligodendroglial progenitor cells as a cause for remyelination failure in chronic multiple sclerosis lesions. *Brain* 131:1749-58.

[4] Franklin RJ, French-Constant C. (2008). Remyelination in the CNS: from biology to therapy. *Nat Rev Neurosci.* 9:839-55.

[5] [REDACTED]

[6] Lau LW, Keough MB, Haylock-Jacobs S, Cua R, Döring A, Sloka S, Stirling DP, Rivest S, Yong VW (2012). Chondroitin sulfate proteoglycans in demyelinated lesions impair remyelination. *Ann Neurol.* 72:419-32.

[7] Back SA, Tuohy TM, Chen H, Wallingford N, Craig A, Struve J, Luo NL, Banine F, Liu Y, Chang A, Trapp BD, Bebo BF Jr, Rao MS, Sherman LS (2005). Hyaluronan accumulates in demyelinated lesions and inhibits oligodendrocyte progenitor maturation. *Nat Med* 11:966-72.

[8] [REDACTED]

[9] Simons M, and Trajkovic K (2006). Neuron-glia communication in the control of oligodendrocyte function and myelin biogenesis. *J Cell Sci* 119:4381-9.

[10] [REDACTED]

[11] [REDACTED]

[12] Geurts JGJ, Stys PK, Minagar A, Amor S, Zivadinov R. Gray matter pathology in (chronic) MS: Modern views on an early observation. *J Neurol Sci* 2009; 282: 12-20.

[13] Chang A, Staugaitis SM, Dutta R, Batt CE, Easley KE, Chomyk AM, Yong VW, Fox RJ, Kidd GJ, Trapp BD (2012). Cortical remyelination: a new target for repair therapies in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 72:918-26.

[14] Viganò F, Möbius W, Götz M, Dimou L (2013). Transplantation reveals regional differences in oligodendrocyte differentiation in the adult brain. *Nat Neurosci.* 6:1370-2.

[15] Chari DM, Crang AJ, Blakemore WF (2003). Decline in rate of colonization of oligodendrocyte progenitor cell (OPC)-depleted tissue by adult OPCs with age. *J*

Neuropathol Exp Neurol 62:908-16.

[16] [REDACTED]

[17] Selmaj K, Raine AH, and Cross AH (1991). Anti-tumor necrosis factor therapy abrogates autoimmune demyelination. Ann. Neurolog 30:694-700.

[18] Batoulis H, Recks, MS, Holland FO, Thomalla F, Williams RO, Kuerten S (2014). Blockade of TNF-alpha in EAE reveals differential effects on the antigen-specific immune response and central nervous system histopathology. Clin Exp Immunol 175:41-48.

[19] Van Oosten BW, Barkhof F, Truyen L Boringa JB, Bertelsmann FW, von Blomberg BM, et al. (1996). Increased MRI activity and immune activation in two MS patients treated with the monoclonal anti-TNF antibody cA2. Neurology 47:1531-4

[20] Caminero A, Comabella M, and Montalban X (2011). TNF-alpha, anti-TNF-alpha, and demyelination revisited: an ongoing story. J. Neuroimmuno. 234:1-6.

[21] Arnett HA, Mason J, Marino M, Suzuki K, Matsushima GK, and Ting JP (2001). TNF-alpha promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination. Nat Neurosci 4:1116-22.

### 3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

#### Goal

The quiescence of OPCs is one of the major impediments to remyelination failure in MS [3,4]. During normal CNS development, neurons provide instructive signals for OPC behaviour. Indeed, regulation of OPC behaviour depends on very precise temporal and spatial appearances of an appropriate mix of interacting signalling molecules. In contrast, in a *demyelinated* area signal factors derived from astrocytes and microglia play also a prominent role in the regulation of (re)myelination. [REDACTED]

[REDACTED] Therefore, the main goal of this project is to identify **targets** and subsequently design **tools** to develop strategies for a regenerative therapy for MS.

#### Feasibility

[REDACTED]

### 3.3 Belang

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

Multiple sclerosis (MS) is the most common progressive and disabling neurological condition in young adults. It has a prevalence that ranges between 2 and 150

per 100,000, which adds up to approximately 2.5 million people worldwide that are dealing with this debilitating disease. MS is characterized by inflammation, multiple demyelinated lesions, axonal degeneration and reactive glial scar formation. Demyelination is a result of a direct loss of oligodendrocytes, but can also be a consequence of primary axonal degeneration. Remyelination, i.e., when myelin sheaths are restored and functional deficits repaired, is a common feature at early stages of MS (RR-MS), but fails at later stages, resulting in secondary axonal degeneration (SP-MS). Current available therapies rely primarily on immunomodulating- and immunosuppressive strategies, which in essence delay the process of new lesion formation. However, these therapies often fail in patients with progressive MS, indicating that once the cascade of events leading to axonal degeneration has been initiated, suppression of inflammation does not protect clinical disease progression. Thus, the development of treatments that preserve axons by means of remyelination is an essential therapeutic goal. Moreover, since remyelination is crucial for functional neurological recovery and axonal survival, a therapeutic treatment aimed at restoring remyelination is a prerequisite for halting disease progression. Strikingly, in most MS lesions the number of OPCs to produce new myelin suffices, but their differentiation to myelinating oligodendrocytes fails. Therefore, elucidating the underlying mechanism of OPC differentiation failure, and accordingly develop a strategy to overcome OPC differentiation failure, will be a major tool in further exploiting therapeutic potentials in the treatment of MS. In addition, the proposed experiments may provide tools to treat other demyelinating and dysmyelinating disorders and spinal cord injury. Stem cell research will also benefit from this research since it will provide indicators of optimal OPC production in order to enhance remyelination efficiency.

### **3.4 Onderzoeksstrategie**

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

[Redacted content]

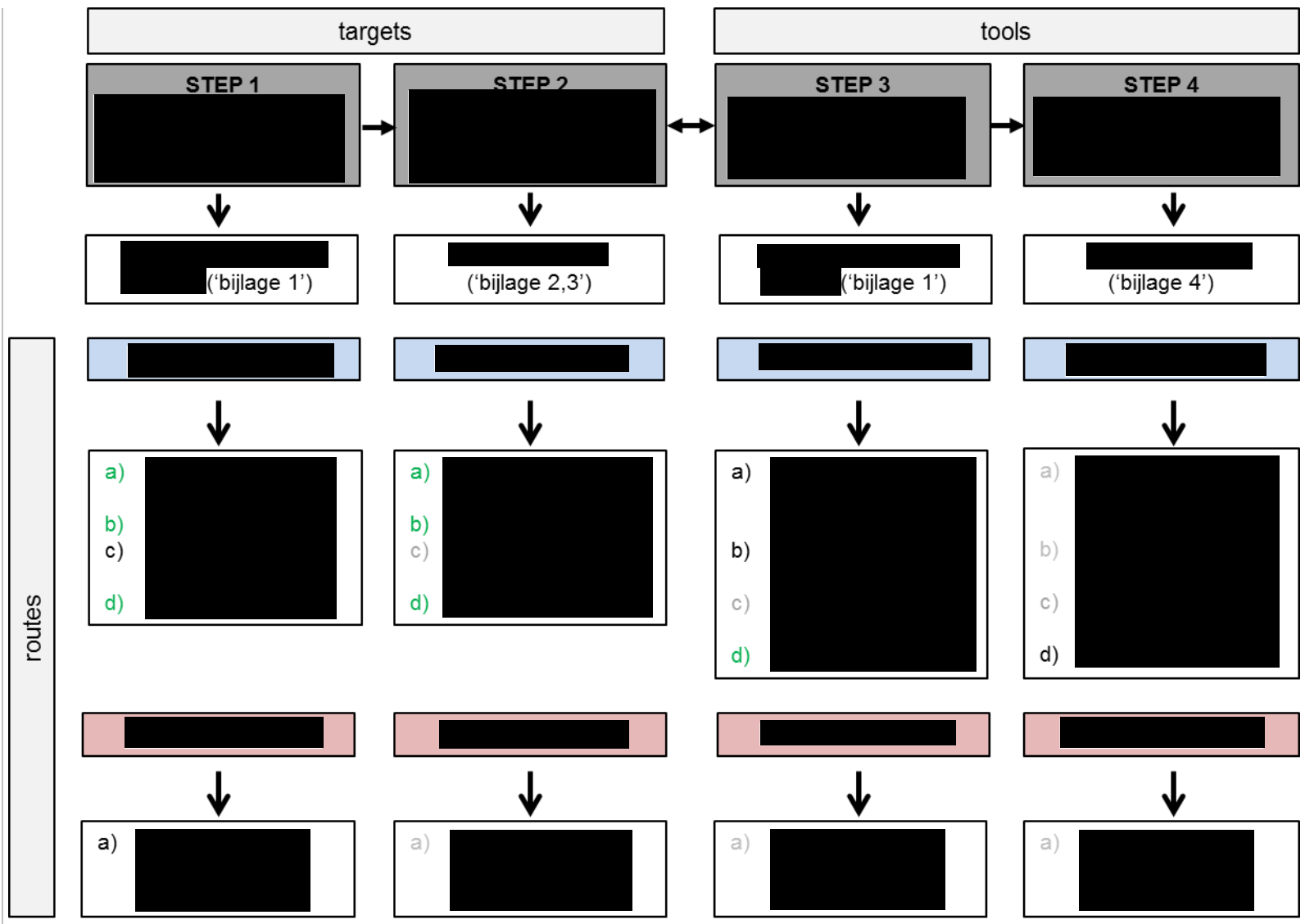


Figure 1: [redacted] (1a-d) [redacted] (2a) [redacted] step 1 and 2, [redacted] (steps 3 and 4, [redacted] (1a-d), [redacted] (1a-d) [redacted] (1c and 2a).

Remyelination is executed by local OPCs. Therefore, our comprehension of the biology of complete remyelination grows from studying OPCs in several models. To start with, OPCs are examined *in vitro* (fig. 1, steps 1, 3), with the major culture systems being a) primary OPCs and oligodendrocytes, b) co-cultures of OPCs with cortical neurons, dorsal root ganglion (DRG) neurons, microglia, macrophages or (grey and white matter) astrocytes, c) embryonic spinal cord myelinating cultures which depend on an astrocyte feeding layer and d) organotypic cerebellar slice cultures. Also, in the latter, demyelination can be induced via addition of lysolecithin to the culture medium and is followed by remyelination over two weeks. Despite their artificial nature, observations from these models are generally in agreement with *in vivo* findings and can be translated to the human setting, and, from a practical perspective, genetic manipulation and addition of experimental factors and factors derived from other primary cell cultures, are relatively feasible. [REDACTED]

[REDACTED] Examination of remyelination *in vivo* is made possible by several rodent toxin-induced animal models. These models induce demyelination by administering toxins harmful to oligodendrocytes, which evokes an endogenous response to achieve robust remyelination over time, usually several weeks. To understand why remyelination fails, findings in these primary cell culture and toxin-induced animal models will be complemented with studies on post-mortem human MS lesions. [REDACTED]

---

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

1a. [REDACTED] (step 3 and 4). An effective strategy to [REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]

1b. [REDACTED] (step 3 and 4): To be able to specifically [REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]



[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]

**1c. [REDACTED] (step 1 and 2):**

To unravel [REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]

[REDACTED]

**2a. [REDACTED] (step 1 and 2): To examine whether [REDACTED]**  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]

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

We aim to [REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]

[REDACTED]

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

Volgnummer	Type dierproef
1	primary cell culture models
2	cuprizone model
3	transplantation model
4	treatment models
5	
6	
7	
8	
9	
10	



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

#### 1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10500	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Rijksuniversiteit Groningen	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		1	Primary cell culture models

*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*

#### 2 Beschrijving dierproeven

##### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Any attempt to enhance remyelination in multiple sclerosis (MS) will require a detailed understanding of the molecular and cellular (signaling) environment and why remyelination fails. Upon identification of targets, tools can be designed and validated to develop strategies for a regenerative therapy for MS.

Remyelination is executed by local processing of oligodendrocyte progenitor cells (OPCs), and as such an identical process as developmental myelination. Therefore, primary cell cultures models are suitable and valuable to examine effects of cellular and molecular factors on (re)myelination. To identify targets and to develop tools able to promote remyelination in MS lesions, we will make use of the following well-established primary in vitro cell culture models [1-6,

- [REDACTED]
1. Primary OPCs/oligodendrocytes generated from brain [REDACTED] of neonates and adult rats [REDACTED]
  2. Primary microglia and astrocytes generated from brain [REDACTED] of neonates (P1-3) in monoculture or in co-culture with OPCs/oligodendrocytes (see 1).
  3. Primary astrocytes generated from brain [REDACTED] of adult rats in monoculture or in co-culture with OPCs/oligodendrocytes (see 1)
  4. Neuronal monocultures from embryonic brains (E15-17, cortical neurons) and spinal cords (dorsal root ganglion (DRG) neurons, E15-17), i.e., when they are still mitotic.
  5. Primary macrophage monocultures generated from neonatal bone marrow (P1-3).
  6. In vitro myelinating cultures. We will apply 2 different in vitro myelinating cultures: i) co-cultures of DRGs (E15-17, see 4)) and OPCs (P1-3, see 1) and ii) embryonic spinal cord cultures (E15-17) which are seeded onto an astrocyte feeding layer.
  7. Organotypic cerebellar slice cultures obtained from neonatal cerebellum. Axons in these cultures will be demyelinated with lysocleithin and effects on remyelination evaluated.

[REDACTED]

1a. [REDACTED]

[REDACTED]

1b. [REDACTED]

[REDACTED]

[Redacted]

[Redacted]

1c. [Redacted]

[Redacted]

2a. [Redacted]

[Redacted]

Primary outcome parameters are :

- [Redacted]
- [Redacted]
- [Redacted]
- [Redacted]
- [Redacted]
- [Redacted]
- [Redacted]
- [Redacted]
- [Redacted]
- [Redacted]

References:

- [1] [REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]
- [3] [REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]
- [4] [REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]
- [5] [REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]
- [6] [REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]

---

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

We will perform in vitro experiments on primary cell cultures isolated from cells, i.e., after the animals have been sacrificed. Neonates (P1-3, 1-week-old) will be decapitated, adult rats (pregnant, 9-months and 21 months old) will receive an overdosis of nembutal via IC injection when under anaesthesia (isoflurane). The embryos (E15-17) will die from the nembutal injection of the mother. IC injection is not essential but results in a quicker response compared to IP injection.

---

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

We will use an isolation procedure which enables us to obtain purified OPC, oligodendrocyte, microglia, astrocyte, and macrophage cultures from the same neonate (P1-3, [REDACTED]) using a shake-off method. From the same animal, we will also obtain organotypic cerebellar slice cultures. To isolate and culture neurons E15-17 embryo's, i.e., when neurons are still postmitotic, are necessary. In addition, from one litter we will combine, whenever possible, experiments. [REDACTED]  
[REDACTED]

Experimental techniques to be used on the primary cell culture models: RNA-Seq, Western blotting, proteomics, ELISA, immunocytochemistry, immunoprecipitation, thin layer chromatography, qPCR, RNAi, and different functional (cell behavior, activity) assays. Especially the RNA-Seq studies, TLC and biochemical assays (Western blotting, proteomics and co-immunoprecipitation) require high cell numbers.

Prior to the experiments with the primary cell culture models, we will perform a power analysis to calculate the minimum number of independent experiments that are required to obtain sufficient statistical power to detect differences. Usually, dependent on the experimental set up, 3-5 independent experiments are required ([REDACTED]). Based on the power analysis, we will make a calculation of how many animals that are needed for the experiments based on how many cells we approx. generate from one animal and how many cells we need for a particular experiment and technique. Of note, we have on average a yield of (i) 1 million OPCs/oligodendrocytes, 400,000 microglia, 600,000 bone marrow macrophages, and 2 million astrocytes per P1-3 neonate, (ii) 200,000 cortical neurons and 250,000 DRGs per E15-17 embryo, (iii) 6 million astrocytes per adult brain (cortical vs non-cortical 1:2) and (iv) 100.000 OPCs from the cortex, and 50.000 from the corpus callosum.

## B. De dieren

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

Wistar rats, purchased from a recognized supplier in Europe.

Total estimated numbers:

1. 20 pregnant rats (200 E15-17 embryo's)
2. 200 pregnant rats (2000 P1-3 neonates)
3. 60 pregnant rats (600 1 week-old neonates)
4. 100 9 months-old rats
5. 100 20 months-old rats

These estimated numbers are based on the number of animals that were required for similar kind of experiments with these primary cell culture models we performed in the last couple of years, the amount of cells required per experimental set up, the number of cells generated per animal, and 10 neonates (embryos) per litter.

## C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

## D. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welke keuzes daarbij zijn gemaakt.

Replacement

The project examines primary cells culture models of brain resident cells (astrocytes, OPCs, oligodendrocytes, DRG and cortical neurons, total spinal cord cultures, microglia) from different regions, and therefore requires the use of brain tissue from embryonic, new-born and adults rats to acquire monocultures, co-cultures (myelinating, astrocyte-OPC) and organotypic cerebellar slice cultures. Whilst it might be possible to perform some of these experiments in cell lines, such an approach would have significant disadvantages. The cell lines available represent very poor models for the questions being addressed here, i.e., oligodendrocyte cell lines do not terminal differentiate and proper myelin membrane formation is very limited, if at all present. In addition, cell lines do not



face regional cues and the effect of (local) aging. Also, such a controlled study is not possible with post-mortem human material, as obtaining pure OPCs from human origin will be technically challenging, if possible at all. Importantly, in order to properly extrapolate the findings to humans, animal species with myelinated axons are required and rodents are the lowest relevant species we can use to study (re)myelination. All the experiments will be performed with rat-derived cells, which have been characterised extensively for remyelination research by several groups including our own, and therefore most appropriate to further expand knowledge on existing data.

#### Reduction

We will use an isolation procedure which enables us to obtain purified OPC, oligodendrocyte, microglia, astrocyte, and bone-marrow derived macrophage cultures from the same neonate (P1-3, [REDACTED]). From the same animal, we will also obtain organotypic cerebellar slice cultures. To isolate and culture neurons E15-17 embryo's, i.e., when neurons are still postmitotic, are necessary. In addition, from one litter we will combine, whenever possible, experiments as well as the brain of the mother to isolate and culture adult [REDACTED] astrocytes. [REDACTED]

#### Refinement

In order to obtain newborn or embryonic animals we will purchase timed-pregnant females, each of which will be single housed and kept for up to one week before the embryo's or newborns are used. Two days before the due date, the pregnant animal will be monitored twice a day. If the pregnant rat will notably suffer when she is giving birth, we will sacrifice the animal.

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

The pregnant rats will be single housed.

### Herhaling en duplicering

#### E. Herhaling

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

n.a. (fundamental research)

### Huisvesting en verzorging

#### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

#### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

1. Pregnant animals can become uncomfortable and stressed when giving birth.
2. Pups can die from being trampled when the mothers are housed with other animals.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

1. Several (pregnant) animals in one cage.
2. Overcrowded cages.

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

1+2. Pregnants animals will be single housed.

### J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

If the pregnant rat will notably suffer when she is giving birth, we will sacrifice the animal.

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

<1%

### **K. Classificatie van ongerief**

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

Animals will have minimal pain since they will die before we perform our (in vitro) experiments from an overdose of nembutal under isoflurane anaesthesia (adult (pregnant) rats and embryo's) or fast decapitation (neonates). For neuronal cultures, pregnant rats will be sacrificed with an overdose of nembutal (IC injection upon isoflurane anaesthesia), after which the embryo's will be removed. The embryo's will die in the uterus of the nembutal.

Given that the animals will be sacrificed without previous action, the total discomfort is classified as 'lichtl'.

## **Einde experiment**

### **L. Wijze van doden**

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

Nee > Ga verder met de ondertekening.

Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

The animals have to be sacrificed to perform the in vitro experiments on isolated cells.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Newborn rats (P1-3, 1 week) will be decapitated. Given the age of the animals this will give less discomfort.

Ja



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

#### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer                     | Type dierproef                               |
|--------------------------------|--|
| <input type="text" value="2"/> | <input type="text" value="Cuprizone model"/> |

*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*

#### 2 Beschrijving dierproeven

##### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Any attempt to enhance remyelination in multiple sclerosis (MS) will require a detailed understanding of the molecular and cellular (signalling) environment and why remyelination fails. Upon identification of targets, tools can be designed and validated to develop strategies for a regenerative therapy for MS.

Examination of remyelination in vivo is made possible by several rodent toxin-induced animal models. In these models demyelination is induced by administering toxins harmful to oligodendrocytes, which evokes an endogenous response to achieve remyelination over time, usually several weeks. An example is the dietary cuprizone model. Feeding cuprizone results in demyelination of distinct brain regions, mostly studied in the corpus callosum (white

matter area) and cortex (grey matter area), with remarkable preservation of the axons. Given its reproducibility and that demyelination is followed by robust remyelination in both grey and white matter, the acute cuprizone model is chosen to validate and analyse the expression and cellular localisation of potential targets and tools during de- and remyelination. The targets have been identified in primary cell culture models and/or MS lesions, and are involved in remyelination per se or remyelination failure.

The cuprizone model is best characterized in the C57BL/6 mice strain, while rats are resistant to cuprizone-induced demyelination and therefore do not represent a suitable model to study remyelination events [1,2]. Female mice are more resistant to cuprizone-induced demyelination, which will result in variable degrees of demyelination [3,4]. We will therefore only use male C57BL/6 mice for the validation (expression and localisation) of potential disease-specific targets in de- and remyelination.

Feeding cuprizone has been shown to induce selective oligodendrocyte cell death between 10-21 days, followed by demyelination which is maximal after 5 weeks [1,3]. After 5 weeks, mice will return to a normal diet resulting in remyelination by endogenous OPCs with almost complete remyelination 2 weeks after removal of cuprizone from the chow [1,3]. To elucidate the (timely) presence of a potential target or tool during de- and/or remyelination, we will sacrifice the animals upon 3 weeks ('early demyelination') and 5 weeks ('late demyelination') of cuprizone feeding, as well as upon 5 weeks cuprizone feeding, followed by 2 weeks normal feeding ('remyelination'). Demyelination and remyelination will be verified with myelin stains (LFB, Sudan black) and in situ hybridisation of the major myelin protein PLP.

Primary outcome parameters are:

- the expression and localisation of the mRNA of the factor of interest (in situ hybridisation and qPCR) in the corpus callosum and/or cortex
- the expression and localisation of the protein of the factor of interest (Western blot, immunohistochemistry) in the corpus callosum and/or cortex.

References:

[1].Gudi V, Gingele S, Skripuletz T, Stangel M (2014). Glial response during cuprizone-induced de- and remyelination in the CNS: lessons learned. *Front Cell Neurosci* 8:73

[2] Love S (1988). Cuprizone neurotoxicity in the rat: morphological observations. *J Neurol Sci* 84:223-37.

[3] Kipp M, Clarner T, Dang J, Copray S, Beyer C (2009). The cuprizone animal model: new insights into and old story. *Acta Neuropathol* 118: 723-36.

[4] Taylor LC, Gilmore W, Matsushima GK (2009). SJL mice exposed to cuprizone intoxication reveal strain and gender pattern differences in demyelination. *Brain Pathol*:19:467-479.

[5] [REDACTED]

[6] [REDACTED]

[7] [REDACTED]

[REDACTED]

[8] [REDACTED]

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

Male C57BL/6 mice (age 8-12 weeks) will be subjected to a 0.2% (w/w) cuprizone powder diet for 5 weeks. After 5 weeks the mice will return to the standard food for 2 weeks. Introduction of the cuprizone powder diet will be accompanied with mild weight loss during the first week, which will be followed by a gradual weight gain during the next weeks. Therefore, the first week of cuprizone diet will require daily weight measurement. Later on this can be reduced to once every 3 days. The weighing will also be conducted prior to the cuprizone diet to establish a base line. The (daily) behavioural monitoring will be focused on recognizing key signals indicating animal discomfort, i.e., excess weight loss, biting, curved back, concave abdomen, dehydration and deficient reflexes. Despite demyelination in the CNS, the animals do not face major behavioural deficits, likely because the direct damage to axons is minimal.

We will sacrifice animals at the indicated time points to be able to follow and localize the mRNA (in situ hybridisation and qPCR) and protein expression (Western blot, immunohistochemistry) of the factor of interest in the corpus callosum and cortex. For immunohistochemistry, the animals will be anesthetized with isoflurane followed by perfusion with the appropriate fixative. The chest cavity will be opened and a perfusion needle will be placed in the left ventricle. Physiological salt followed by the appropriate fixative will be pumped through the vascular system after cutting the liver. For immunohistochemistry on fresh frozen tissue, biochemical and qPCR analysis, the animals will be anesthetized (isoflurane) and sacrificed with an overdose of nembotal (IC injection), after which the cortex and corpus callosum will be collected and/or analyzed. IC injection is not essential but results in a quicker response compared to IP injection.

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

To obtain insight in the expression and localisation of the factor of interest over time upon demyelination and remyelination, 3 time points (early and late demyelination: 3 weeks and 5 weeks cuprizone, remyelination 2 weeks after 5 weeks cuprizone) and control mice are required. For a throughout analysis of the factors, expression profiles at the RNA (qPCR) and protein level (Western blotting) are essential, as well as details on their cellular localisation (in situ hybridisation and immunohistochemistry). These methods require different processing of the tissue, and can therefore not combined. It is anticipated that sufficient material will be obtained to analyse several factors. However, dependent on the number of factors identified, it can be not excluded that (part of) the experiment has to be performed twice. [REDACTED]

To determine the minimum number of animals that is required in this study in order to have sufficient statistical power to detect differences in the expression of the factor of interest at the indicated time points, a power analysis will be performed. Since demyelination and remyelination are very reproducible in the cuprizone model, particularly when applied in male mice, and based on previous research experience with the cuprizone model [REDACTED], we anticipate that 4-5 animals per experimental group will be sufficient to obtain statistical differences.

## **B. De dieren**

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

male C57BL/6 mice, 8-12 weeks of age, purchased from a recognized supplier in Europe

total estimated number: 160

calculation:  $2 \times (4 \text{ groups} \times 4 \text{ analysis methods} \times 5 \text{ animals per analysis method}) = 160$

4 groups (control, early (3 weeks) and late demyelination (5 weeks), remyelination) will be studied. The total estimated number per group is estimated on 20 (4x5). This is based on 4 different methods of analysis, which can not be performed on the same animal since the methods require different processing of the tissue, and 5 animals per analysis method. There is a chance - dependent on the number of targets and tools to be examined- that the amount of acquired material does not suffice, and that (part of) the experiment has to be performed twice (2x).

### C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

### D. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welke keuzes daarbij zijn gemaakt.

#### Replacement

Experimental findings ('disease target and tools') obtained with primary cell cultures models need to be validated in a more complex, but controlled, in vivo situation, i.e., upon demyelination and remyelination. Such a controlled study is not possible with post-mortem human material. Furthermore, in order to properly extrapolate the findings to humans, animal species with myelinated axons are required and rodents are the lowest relevant species we can use to study (re)myelination.

#### Reduction

The cuprizone model is highly reproducible particularly in male mice, and therefore a minimal number of animals will be required to have sufficient statistical power. With the current experimental set up grey and white matter areas can be analysed in the same animal. Sufficient material will be obtained to analyse multiple factors (disease targets and tools).

#### Refinement

In contrast to other toxin-induced demyelination animal models, the dietary cuprizone model leads to only limited discomfort (preservation of axons). ■■■■■ Key signs for animal discomfort (weight loss, piloerection, crooked back, dehydration, reduced reflexes) will immediately be followed by termination. The animals will be single housed.

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

beperken.

The animals will be single housed.

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

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

n.a. (fundamental research)

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.



Ja

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

1. Only male mice in one cage may lead to stress and they may kill each other.
2. There is a small change (<1%) that the cuprizone diet may result in paralysis symptoms.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

1. At this age there is risk that male mice become territorial.
2. Unforeseen damage to the demyelinated axons.

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

1. All male animals will be single housed.
2. Daily behavioural monitoring.

### **J. Humane eindpunten**

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

1. weight lost >15%
2. paralysis symptoms

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

<1%

### **K. Classificatie van ongerief**

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

The animal discomfort of the cuprizone diet for 5 weeks is mild. Introduction of the cuprizone-containing powdered chow will be accompanied with mild weight loss during the first week, which will be followed by a gradual recovery during the next weeks. In previous experiments no adverse effects on behaviour were observed.

Therefore, the total discomfort is classified as 'licht'.

## **Einde experiment**

### **L. Wijze van doden**

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

Nee > Ga verder met de ondertekening.

Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

Processing of tissue is required to answer the research questions.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



## Bijlage Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10500				
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Rijksuniversiteit Groningen				
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left;">Volgnummer</th> <th style="text-align: left;">Type dierproef</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="padding: 2px;">3</td> <td style="padding: 2px;">Transplantation model</td> </tr> </tbody> </table>	Volgnummer	Type dierproef	3	Transplantation model
Volgnummer	Type dierproef					
3	Transplantation model					

*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

[REDACTED]

To induce demyelination, we will make use of an established cuprizone-induced chronic demyelination model [1-4]. Feeding cuprizone for 12 weeks has been shown to induce selective oligodendrocyte death in grey and white matter areas, resulting in chronic demyelinated grey and white matter areas and reduced OPC numbers [1-4]. The chronic cuprizone model is preferred over the acute demyelination model (5 weeks cuprizone diet), since in the acute model remyelination by transplanted OPCs will proceed in a background of efficient remyelination by endogenous OPCs. Prolonged cuprizone exposure induces chronic demyelination and impairs the capacity of the brain to repair; endogenous OPCs are almost depleted, while direct damage to axons is minimal [2-4].

The cuprizone model is best characterized in the C57BL/6 mice strain, while rats are resistant to cuprizone-induced demyelination and therefore do not represent a suitable model to study remyelination events [2,5]. Female mice are more resistant to cuprizone-induced demyelination, which will result in variable degrees of demyelination [3, 6]. We will therefore only use male receiver C57BL/6 mice for the transplantation studies.

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

Primary outcome parameters are:

- demyelination and remyelination using myelin stains (LFB, sudan black) and in situ hybridisation of the major myelin protein PLP.
- proliferation (Ki67/Olig2 double labeling), differentiation (staining with stage-specific and lineage specific markers, including Olig2, Nkx2.2 for OPCs and CC1 for mature oligodendrocytes) and remyelination potential (electron microscopy (EM), g-ratio) of the transplanted OPCs.

All experimental procedures are running in the lab [REDACTED]

References:

- [1]. Mason JL, Toews A, Hostettler JD, Morell P, Suzuki K, Goldman J E, Matsushima GK (2004). Oligodendrocytes and progenitors become progressively depleted within chronically demyelinated lesions. *Am J Pathol* 164: 1673–82.
- [2]. Gudi V, Gingele S, Skripuletz T, Stangel M (2014). Glial response during cuprizone-induced de- and remyelination in the CNS: lessons learned. *Front Cell Neurosci* 8:73
- [3] Kipp M, Clarner T, Dang J, Copray S, Beyer C (2009). The cuprizone animal model: new insights into and old story. *Acta Neuropathol* 118: 723-36.
- [4] Skripuletz T, Lindner M, Kotsiari A, Garde N, Fokuhl J, Linsmeier F, Trebst C, Stangel M (2008). Cortical demyelination is prominent in the murine cuprizone model and is strain-dependent. *Am J Pathol* 172:1053-61.
- [5] Love S (1988). Cuprizone neurotoxicity in the rat: morphological observations. *J Neurol Sci* 84:223-37.

[6] Taylor LC, Gilmore W, Matsushima GK (2009). SJL mice exposed to cuprizone intoxication reveal strain and gender pattern differences in demyelination. Brain Pathol:19:467-479.

[7] [REDACTED]

[8] [REDACTED]

[9] [REDACTED]

[10] [REDACTED]

---

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

Male C57BL/6 mice (age 8-12 weeks, 'receivers') will be subjected to a 0.2% (w/w) cuprizone powder diet for 12 weeks. Introduction of the cuprizone powder diet will be accompanied with mild weight loss during the first week, which will be followed by a gradual weight gain during the next weeks. Therefore, the first week of cuprizone diet will require daily weight measurement. Later on this can be reduced to once every 3 days. The weighing will also be conducted prior to the cuprizone diet to establish a base line. The (daily) behavioural monitoring will be focused on recognizing key signals indicating animal discomfort, i.e., excess weight loss, biting, curved back, concave abdomen, dehydration and deficient reflexes. Despite demyelination in the CNS, the animals do not face major behavioural deficits, likely because the direct damage to axons is minimal.

[REDACTED]

After stereotatic injection of donor OPCs, all mice will return to a normal diet to allow assessment of the effect of the different transplanted OPCs on remyelination. To follow remyelination by the transplanted OPCs over time, we will sacrifice animals at 3 and 14 days post transplantation. To assess remyelination we will perform immunohistochemical (IHC) and EM analysis (see primary outcome parameters). The animals will be anesthetized with isoflurane. The chest cavity will be opened and a perfusion needle will be placed in the left ventricle. Physiological salt followed by the appropriate fixative for IHC or EM analysis will be pumped through the vascular system after cutting the liver.

[REDACTED]

---

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

To determine the optimal number of cells to be injected and to determine whether the transplanted cells can be traced in a demyelinated area, we will first

perform a pilot experiment with 3 different concentrations of [REDACTED] of 1 week-old neonates ('cell numbers') transplanted in a demyelinated [REDACTED] area ([REDACTED]) of cuprizone-fed receiver mice.

When the optimal number of cells to be injected is determined we will perform the experiment as described above. Animals [REDACTED] [REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]

The experiments will be performed [REDACTED]  
[REDACTED]

To determine the minimum number of animals that is required in this study in order to have sufficient statistical power to detect differences in OPC maturation upon transplantation, a power analysis will be performed. Since demyelination and remyelination are very reproducible in the cuprizone model, particular when applied in male mice, and based on previous research experience with the cuprizone model [REDACTED]  
[REDACTED], we anticipate that 4-5 animals per experimental group will be sufficient to obtain statistical differences.

**B. De dieren**

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

C57BL/6 mice, purchased from a recognized supplier in Europe.

[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]

Estimated number per experiment:

- 1. pilot experiment

receivers: max. 2 experiments; per experiment 4 different amounts of donor OPCs x 3 animals per group=2x(4x3)=24 receivers  
donors 2 experiments = 2 pregnant mice (8 neonates per litter)

4 different amounts of donor [REDACTED] OPCs (0 (saline injection), 1000, 10000 and 50000 obtained from 1 week-old neonates ) will be injected in the demyelinated corpus callosum of 12-weeks cuprizone fed mice ('receivers'). The transplanted OPCs will be traced and their differentiation analyzed at 14 days post transplantation (immunohistochemistry). In this pilot experiment 3 animals per group will be analyzed. There is a chance that the donor OPCs can not be traced, and that either the number of injected is insufficient or a different tracer maybe required. This will require a second pilot experiment.

2. [REDACTED]

[REDACTED]

**C. Hergebruik**

Is er hergebruik van dieren?

- Nee, ga door met vraag D.
- Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

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

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

**D. Vervanging, vermindering en verfijning**

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welke keuzes daarbij zijn gemaakt.

Replacement

[REDACTED], and therefore requires the use of brain tissue from new-born and adult mice. Such a study is not possible with post-mortem human material. Also cell lines (as donor cells) represent a very poor model for the questions being addressed here, as such cells do not face regional cues and the effect of (local) aging, and their remyelination potential is limited. [REDACTED]  
[REDACTED]  
regional demyelination. Furthermore, in order to properly extrapolate the findings to humans, animal species with myelinated axons are required and rodents





### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

1. Only male mice (receivers) in one cage may lead to stress and they may kill each other.
2. There is a small change (<1%) that the cuprizone diet may result in paralysis symptoms.
3. Pregnant animals can become uncomfortable and stressed when giving birth.
4. Pups can die from being trampled when the mothers are housed with other animals.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

1. At this age there is risk that male mice become territorial.
2. Unforeseen damage to the demyelinated axons.
3. Several (pregnant) animals in one cage
4. Overcrowded cages.

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

1. All male animals will be single housed.
2. Daily behavioural monitoring.

3+4. Pregnant animals will be single housed.

### J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

1. weight lost >15%
2. paralysis symptoms
3. If the pregnant mouse will notably suffer when she is giving birth, we will sacrifice the animal.

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

<1%

### K. Classificatie van ongerief

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

The animal discomfort of the cuprizone diet for 12 weeks is mild. Introduction of the cuprizone-containing powdered chow will be accompanied with mild weight loss during the first week, which will be followed by a gradual recovery during the next weeks. In previous experiments no adverse effects on behaviour were observed. The stereotactic injection of donor OPCs is classified as 'matig'. Previous experiments with stereotactic injections indicate that weight loss (~10%) can be expected during the first days, which is followed by rapid recovery. Given the injection of non-modulated OPCs at a local area no additional symptoms of the model are expected. [REDACTED] donor mice will have minimal pain since they will die before we isolate the OPCs (and without previous action, 'licht').

Therefore, the total discomfort is classified as 'matig'.

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

Nee > Ga verder met de ondertekening.

Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

Processing of tissue is required to answer the research question.  
The animals have to be sacrificed to isolate donor cells for transplantation.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

1 week-old neonates will be decapitated. Given the age of the animals this will give less discomfort.

Ja

---



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

#### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef   |
|------------|------------------|
| 4          | Treatment models |

*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*

#### 2 Beschrijving dierproeven

##### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Novel developed strategies for a regenerative therapy for multiple sclerosis (MS), i.e., tools that promote remyelination and/or overcome remyelination failure, need to be validated in an animal model prior to the 'first in human' studies.

To validate agents ('tools') that modulate remyelination, toxin-induced demyelination models are used. An example is the dietary cuprizone model. Feeding cuprizone causes reproducible demyelination in the corpus callosum and cortex with remarkable preservations of the axons, followed by robust remyelination upon cuprizone removal via a predictable time course. Thus, cuprizone induces selective oligodendrocyte cell death between 10-21 days, followed by

demyelination which is maximal after 5 weeks [1,2]. After 5 weeks, mice will return to a normal diet resulting in remyelination by endogenous OPCs with almost complete remyelination 2 weeks after removal of cuprizone from the chow [1,2]. Given that the cuprizone model captures several aspects of MS pathology, including neuroinflammation by resident microglia cells, its reproducibility, and sufficient time span of remyelination, the acute cuprizone model is chosen to validate agents that modulate remyelination.

The cuprizone model is best characterized in the C57BL/6 mice strain, while rats are resistant to cuprizone-induced demyelination and therefore do not represent a suitable model to study modulation of remyelination (failure) [1,3]. Female mice are more resistant to cuprizone-induced demyelination induced by cuprizone, which will result in variable degrees of demyelination [2,4]. We will therefore only use male mice.

In toxin-induced demyelination models, lesions are created with robust endogenous remyelination capacity. Potential effects of agents that modulate remyelination can be validated by assessing their effect on the speed and extent of remyelination. However, cuprizone-induced demyelinated areas do not properly mimic remyelination-inhibiting features of the MS lesion environment. Thus, to validate targets that overcome remyelination failure, a local MS lesion environment needs to be created first. In addition, when the tools are directed against a human receptor, humanized animals are required. Therefore, dependent on the strategy and target (modulation of remyelination per se or overcoming remyelination failure) and tools (e.g. human receptor agonists), the following three different treatment models will be applied.

[REDACTED]

[Redacted text block]

Primary outcome parameters are:

[Redacted text block]

Primary outcome parameters are:

[Redacted text block]

References:

- [1].Gudi V, Gingele S, Skripuletz T, Stangel M (2014). Glial response during cuprizone-induced de- and remyelination in the CNS: lessons learned. *Front Cell Neurosci* 8:73
- [2] Kipp M, Clarner T, Dang J, Copray S, Beyer C (2009). The cuprizone animal model: new insights into and old story. *Acta Neuropathol* 118: 723-36.
- [3] Love S (1988). Cuprizone neurotoxicity in the rat: morphological observations. *J Neurol Sci* 84:223-37.
- [4] Taylor LC, Gilmore W, Matsushima GK (2009). SJL mice exposed to cuprizone intoxication reveal strain and gender pattern differences in demyelination. *Brain Pathol*:19:467-479.
- [5] [REDACTED]
- [6] [REDACTED]
- [7] [REDACTED]
- [8] [REDACTED]
- [9] [REDACTED]
- [10] [REDACTED]
- [11] [REDACTED]

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

Treatment model 1: to overcome remyelination failure in an MS lesion environment

Male C57BL/6 mice (age 8-12 weeks) will be subjected to a 0.2% (w/w) cuprizone powder diet for 5 weeks. Introduction of the cuprizone powder diet will be accompanied with mild weight loss during the first week, which will be followed by a gradual weight gain during the next weeks. Therefore, the first week of cuprizone diet will require daily weight measurement. Later on this can be reduced to once every 3 days. The weighing will also be conducted prior to the cuprizone diet to establish a base line. The (daily) behavioural monitoring will be focused on recognizing key signals indicating animal discomfort, i.e., excess weight loss, biting, curved back, concave abdomen, dehydration and deficient reflexes. Despite demyelination in the CNS, the animals do not face major behavioural deficits, likely because the direct damage to axons is minimal.

[REDACTED]. The total volume (3 µL) will be injected over a period of 60 seconds followed by a 'diffusion' period of 2 minutes before needle extraction. During surgery (~15 minutes) the animals will be warmed, eye salve will be used and the wound will be kept moist with saline. After the stereotatic injection, mice will return to a normal diet. 1 day after [REDACTED] injection, animals will be treated with BBB passing protease-containing nanoparticles, which will be given either

orally or via IV injection. [REDACTED]

At the indicated time points the animals will be anesthetized with isoflurane followed by perfusion with the appropriate fixative. The chest cavity will be opened and a perfusion needle will be placed in the left ventricle. Physiological salt followed by the appropriate fixative will be pumped through the vascular system after cutting the liver. For fresh frozen tissue, the animals will be anesthetized (isoflurane) and sacrificed with an overdose of nembutal (IC injection). IC injection is not essential but results in a quicker response compared to IP injection.

Treatment model 2: to modulate (endogenous) remyelination

Mice (8-12 weeks) will be subjected to a 0.2% (w/w) cuprizone diet for 5 weeks as described for treatment model 1. After 5 weeks cuprizone feeding, [REDACTED] or vehicle control will be introduced by stereotactic injection in the ventricles (under isoflurane anaesthesia), according to the same procedure as described for treatment model 1. After the stereotactic injection, mice will return to a normal diet. The effect on OPC differentiation and remyelination will be assessed 7 and 14 days injection by immunohistochemistry and EM. The animals will be anesthetized with isoflurane followed by perfusion with the appropriate fixative for each method (see for procedure treatment model 1).

Treatment model [REDACTED]

Cuprizone model

Mice (8-12 weeks) will be subjected to a 0.2% (w/w) cuprizone diet for 5 weeks as described for treatment model 1. After 5 weeks cuprizone feeding, [REDACTED] will be introduced by stereotactic injection in the ventricles (under isoflurane anaesthesia), according to the same procedure as described for treatment model 1. After the stereotactic injection, mice will return to a normal diet. The effect on OPC differentiation, remyelination and microglia activation will be assessed 7 and 14 days injection by PET imaging (longitudinal on 14-days group), immunohistochemistry, and EM. Remyelination will be further verified with myelin stains (LFB, sudan black) and in situ hybridisation of the major myelin protein PLP. [REDACTED]

[REDACTED] At the indicated time points the animals will be anesthetized with isoflurane followed by perfusion with the appropriate fixative for each method (see for procedure treatment model 1).

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

The validation of the different strategies/tools, i.e., to modulate remyelination per se (extent and/or speed), to the overcome remyelination failure, or the



effect of agents specific for humans, require different treatment models. To assess the ability of the 'treatments' on remyelination, analysis at 2 different time points will be required, i.e., at an early and late stage in the remyelination process. In addition to assess the extent of OPC differentiation, microglia activation and remyelination, both immunohistochemical and EM analysis are required. These methods require different processing of the tissue, and can therefore not be combined. Myelin stains and in situ hybridisation can be performed on the same tissue as used for immunohistochemistry.

To determine the minimum number of animals that are required in this study in order to have sufficient statistical power to detect differences of the agents on remyelination, a power analysis will be performed. Since demyelination is very reproducible in the cuprizone model, particularly when applied in male mice, and based on previous research experience with the cuprizone model [REDACTED], we anticipate that 4-5 animals per experimental group will be sufficient to obtain statistical differences.

For the primary cell cultures (treatment model 3), we will use an isolation procedure which enables us to obtain purified OPC, oligodendrocyte and microglia cultures from the same neonate (P1-3). Prior to the experiments with the primary cell culture models, we will perform a power analysis to calculate the minimum number of independent experiments that are required to obtain sufficient statistical power to detect differences. Usually, dependent on the experimental set up, 3-5 independent experiments are required. Based on the power analysis, we will make a calculation of how many animals that are needed for the experiment based on how many cells we approx. generate from one animal and how many cells we need for a particular experiment and technique. Of note, we have on average a yield of 800,000 OPCs/oligodendrocytes and 300,000 microglia per P1-3 neonate, and 8 neonates per litter.

---

## **B. De dieren**

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

1. C57BL/6 mice: male 8-12 weeks of age, purchased from a recognized supplier in Europe: estimated number 120

Estimated number per treatment model:

Treatment model 1: to overcome remyelination failure in an MS lesion environment

calculation: 3 groups x 2 time points x 2 analysis methods x 5 animals per group= 60 C57BL/6 mice

3 groups ([REDACTED] and vehicle control) will be studied, at 2 different time points and with 2 different methods of analysis (IHC, DOC extraction), which can not be performed on the same animals since the methods require different processing of the tissue. Per method 5 animals per group are required.

Treatment model 2: to modulate (endogenous) remyelination

calculation: 3 groups x 2 time points x 2 analysis methods x 5 animals per group= 60 C57BL/6 mice

3 groups (antagonist 1, antagonist 2, and vehicle control) will be studied at 2 different time points and with 2 different methods of analysis (IHC, EM), which

can not be performed on the same animal since the methods require different processing of tissue. Per method 5 animal per group are required.

Treatment model [REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

### C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

### D. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welke keuzes daarbij zijn gemaakt.

Replacement

Experimental strategies ('tools') that modulate remyelination or overcome remyelination failure and which are developed in primary cell cultures models, need to be validated in a more complex, but controlled, in vivo situation, i.e., upon demyelination and remyelination. Such a study is not possible with post-

mortem human material. Furthermore, in order to properly extrapolate the findings to humans, animal species with myelinated axons are required and rodents are the lowest relevant species we can use to study (re)myelination. Whilst it might be possible to perform some of these experiments in cell lines (treatment model 3, primary cell cultures), such an approach would have significant disadvantages. The cell lines available represent very poor models for the questions being addressed here, i.e., oligodendrocyte cell lines do not terminal differentiate and proper myelin membrane formation is very limited, if at all present.

#### Reduction

The dietary cuprizone model is highly reproducible and therefore a minimal number of animals will be required to have sufficient statistical power. For the primary cell cultures we will use an isolation procedure which enables us to obtain purified OPCs, oligodendrocytes and microglia from the same neonate (P1-3). [REDACTED]

#### Refinement

In contrast to other toxin-induced demyelination animal models, the dietary cuprizone model leads to only limited discomfort (preservation of axons). [REDACTED] Prior to the stereotactical injection the mice will be anesthetized and local analgesia at the periost will be provided (lidocainehydrochloride-monohydrate). Immediately following the implantation the mice will receive systemic analgesia (carprofen s.c). This procedure will be repeated after 24 hours. [REDACTED] Key signs for animal discomfort (weight loss, piloerection, crooked back, dehydration, reduced reflexes) will immediately be followed by termination. The animals will be single housed. Pregnant females will be single housed up to one week before newborns are used. Two days before the due date, the pregnant animal will be monitored twice a day. If the pregnant animal will notably suffer when she is giving birth, we will sacrifice the animal.

---

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

Prior to the stereotactical interlesional injection the mice will be anesthetized and local analgesia at the periost will be provided (lidocainehydrochloride-monohydrate). Immediately following the injection the mice will receive systemic analgesia (carprofen s.c). this procedure will be repeated after 24 hours. Key signs for animal discomfort (weight loss, piloerection, crooked back, dehydration, reduced reflexes) will immediately be followed by termination. The animals will be single housed.

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

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

n.a. (fundamental research)

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

### **G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest**

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

Nee > Ga verder met vraag H.

Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

## **Ongeriefinschatting/humane eindpunten**

### **H. Pijn en pijnbestrijding**

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

1. Only male mice in one cage may lead to stress and they may kill each other.
2. There is a small change (<1%) that the cuprizone diet may result in paralysis symptoms.
3. Pregnant animals can become uncomfortable and stressed when giving birth.
4. Pups can die from being trampled when the mothers are housed with other animals.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

1. At this age there is risk that male mice become territorial.
2. Unforeseen damage to the demyelinated axons.
3. Several (pregnant) animals in one cage

4. Overcrowded cages.

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

1. All male animals will be single housed.
2. Daily behavioural monitoring.
- 3+4. Pregnant animals will be single housed.

#### **J. Humane eindpunten**

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

1. weight loss >15%,
2. paralysis symptoms or
3. alteration of their behaviour after stereotactic injection.
4. If the pregnant mice will notably suffer when she is giving birth, we will sacrifice the animal.

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

<1%

#### **K. Classificatie van ongerief**

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

The animal discomfort of the cuprizon diet is mild. Introduction of the cuprizon-containing powdered chow will be accompanied with mild weight loss during the first week, which will be followed by a gradual recovery during the next weeks. Previous experiments with stereotactic injections indicates that weight loss (~10%) can be expected during the first days, followed by rapid recovery. No other adverse effects on behaviour were observed. The longitudinal double PET-scan procedure may lead to discomfort. Taken into account the 1 week recovery time between scans, and that they are again on normal chow in this phase of the experiment, we estimate that the total discomfort for these animals is 'matig'. Neonates (P1-3) will have minimal pain since they will die before we isolate the OPCs and microglia of fast decapitation (and without previous action, 'licht').

Therefore, the total level of discomfort for all three treatment models is 'matig'.

### **Einde experiment**

#### **L. Wijze van doden**

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

Nee > Ga verder met de ondertekening.

Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

Processing of tissue is required to answer the research question.  
The animals have to be sacrificed to perform the in vitro experiments on isolated cells.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Newborn mice (P1-3) will be decapitated. Given the age of the animals this will give less discomfort.

Ja

# Format DEC-advies

---

*Maak bij de toepassing van dit format gebruik van de bijbehorende toelichting, waarin elke stap in het beoordelingsproces wordt toegelicht*

## A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer
2. Titel van het project: **Development of strategies for a regenerative therapy for multiple sclerosis**
3. Titel van de NTS: **Ontwikkelen van therapeutische strategieën voor een remyelinisatie therapie voor multiple sclerose**
4. Type aanvraag:
  - nieuwe aanvraag projectvergunning**
5. Contactgegevens DEC:
  - naam DEC: **DEC-RUG**
  - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
  - mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
  - ontvangen door DEC: **03-12-2015**
  - aanvraag compleet: **03-12-2015**
  - in vergadering besproken: **10-12-2015**
  - anderszins behandeld: **10-03-2016, 25-03-2016**
  - termijnonderbreking(en) van / tot: **11-12-2015 tot 01-03-2016, 10-03-2016 tot 25-03-2016**
  - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen **n.v.t.**
  - aanpassing aanvraag: **01-03-2016, 25-03-2016**
  - advies aan CCD: **01-04-2016**
7. Eventueel horen van aanvrager. **n.v.t.**
  - Datum
  - Plaats
  - Aantal aanwezige DEC-leden
  - Aanwezige (namens) aanvrager
  - Strekking van de vraag / vragen
  - Strekking van het (de) antwoord(en)

- Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag

## 8. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: **11-12-2015, 10-03-2016**

- Strekking van de vraag / vragen:

- **Algemene vragen/opmerkingen** waren over herhalingen in de tekst, navolgbaarheid van berekeningen en benoemen van go/no go momenten en onduidelijkheden omtrent verfijning. Meer specifieke vragen waren:
  - **Opmerkingen t.a.v. de projectaanvraag:**
    - Er zit redelijk wat redundantie in het projectvoorstel tussen de beschrijvingen van de achtergrond en het doel. Met name deel 3.2, "Doel" is erg gedetailleerd, er wordt gevraagd om een algemene doelstelling.
    - Figuur 1 illustreert de strategie en niet het doel. Deze figuur wordt ook vooral in 3.4.1. aangehaald, zou daar ook beter passen.
  - **Opmerkingen t.a.v. de bijlagen:**
    - Er staat geen enkele wetenschappelijke referentie in de bijlagen
  - **Opmerkingen t.a.v. bijlage 1:**
    - Deze bijlage is zonder Figuur 1 uit het projectvoorstel niet te begrijpen, daar wordt veel naar verwezen. Navolgbaarheid is daardoor lastig.
    - Overwegingen en statistische methoden: hier staat een lijst getallen van aantallen cellen die verkregen kunnen worden. De vraag 'welke overwegingen en statische methoden gebruikt worden', wordt niet beantwoord.
    - Bij **B dieren, de geschatte aantallen** staat een gedetailleerde beschrijving van de experimentele aanpak, dat hoort onder **A**. Is deels een herhaling.
  - **Opmerkingen t.a.v. bijlage 2:**
    - Is er literatuur onderbouwing dat voor cuprizone mannelijke dieren het best geschikt zijn?
  - **Opmerkingen t.a.v. bijlage 3:**
    - Lange zinnen, zoals de eerste zin onder A (2,5 regel), maken de inhoud moeilijk te volgen.
    - Onder **B, dieren** zouden de berekeningen duidelijker kunnen, bijvoorbeeld wat betekent  $2 \times 2 \times 2 \times 2 \times 5 = 80$ ?
    - Onderdeel **I aantasting welzijn**, is verwarrend. Eerst wordt onder **D. Maatregelen om angst etc. te beperken** gezegd dat zwangere muizen individueel gehuisvest worden, vervolgens wordt gezegd bij **I aantasting welzijn** dat pups vertrapt kunnen worden en dan wordt als **genomen maatregel** gesteld bij dat dieren individueel gehuisvest worden. Is een wat verwarrende redenering.
    - Zouden transgene muizen (bv GFP/RFP transgeen) als OPC donor gebruikt kunnen worden als tracer i.p.v. of als aanvulling op PHK26?
    - Bij overwegingen en statische methoden wordt niet echt duidelijk welke overwegingen /methoden gebruikt zijn. Aanvrager heeft ruime ervaring met dit werk, waarom geen citaties eigen werk, of toepassen/voorstellen van power analyses indien mogelijk?
  - **Opmerkingen t.a.v. bijlage 4:**
    - Onder **A. experimentele aanpak** staan achtereenvolgens 1a, 1b en 1d. Waar is 1c?
    - Ook staat hier 'Described methods have been succesfully applied in previous work' Hier zouden dan referenties bij moeten staan
    - De weergegeven beoogde behandeling zou veel beknopter kunnen, zeker als het al eerder is gedaan en gepubliceerd.
    - Bij **overwegingen en statische methoden:** als eerdere gegevens inzicht in benodigde aantallen dieren geven, dan zou u citaties kunnen toevoegen of een power analyse met gegevens van eerder bepaalde parameters kunnen toepassen.
    - Onder B. De Dieren: de berekeningen zijn weer lastig te volgen.
    - Onderdeel **I aantasting welzijn**, is verwarrend, eerst wordt onder **D. Maatregelen om angst etc. te beperken** gezegd dat zwangere muizen individueel gehuisvest worden, vervolgens wordt gezegd bij **I**



10 december 2014

**aantasting welzijn** dat pups vertrappt kunnen worden en dan wordt als **genomen maatregel** gesteld bij dat dieren individueel gehuisvest worden. Is een wat verwarrende redenering.

- **Vervolg vragen waren:**
  - **Bijlage 1:**
  - Worden beide geslachten gebruikt, zo ja: aangeven, zo nee: waarom niet?
  - Bij 'B de dieren', is het aantal opgevoerde dieren moeilijk navolgbaar. Kunt u dit meer concretiseren, net als in de andere bijlagen
    - Datum antwoord: **01-03-2016, 25-03-2016**
    - Strekking van het (de) antwoord(en): **De gevraagde verduidelijkingen zijn verwerkt in het projectvoorstel en de bijlages. De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.**
9. 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
  - Expert advies

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

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet). **Ja**
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag
3. De DEC is competent om hierover te adviseren. **Ja.**
4. Vanwege betrokkenheid bij het betreffende project is een aantal DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken bij de advisering. **n.v.t.**

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

1. Het project is:
  - **uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord**

2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) is / zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling(en)
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Het wordt ingeschat als een substantieel belang.
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. **De aanvraag gaat om 4 onderzoeksvragen die als samenhangend doel hebben beter te begrijpen hoe het proces van myelinisatie en demyelinisatie van zenuwuitlopers door oligodendrocyten (de myeline-vormende cellen) gereguleerd wordt, met als uiteindelijke doel nieuwe therapeutische aanknopingspunten voor de ziekte multipale sclerose te ontwikkelen. Er is sprake van een gefaseerde aanpak met duidelijk go/no-go momenten en gegevens verkregen uit de ene onderzoeksvraag vormen de basis voor een gerichte set experimenten voor een andere onderzoeksvraag.**
5. Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. De keuze hiervoor is voldoende wetenschappelijk onderbouwd **n.v.t.**
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. **Ja, die is realistisch ingeschat.**
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen. Ja, waar mogelijk voert de onderzoeker in vitro experimenten uit, een deel van het werk kan alleen in levende organismen worden uitgevoerd**
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat. De aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om, bij wettelijk vereist onderzoek, te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt. **Ja, het aantal dieren is beperkt tot wat wetenschappelijk kan worden verantwoord. Het onderzoek wordt gefaseerd uitgevoerd. Veelbelovende middelen worden eerst in cellen getest voordat er dierproeven mee worden uitgevoerd. Daarnaast worden zeer goed beschreven en reproduceerbare diermodellen gebruikt zodat het aantal dieren per experiment zoveel mogelijk beperkt kan blijven.**
9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van

10 december 2014

dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten. **Ja, experimenten worden zodanig gedaan dat ongerief tot een minimum wordt beperkt. Om het onderzoek te kunnen vertalen naar de mens is het noodzakelijk om een diersoort te gebruiken waarin de zenuwuitlopers voorzien zijn van myeline. De best beschreven en best gekarakteriseerde proefdieren om de- en remyelinisatie te bestuderen zijn de rat en de muis. Bovendien is (deels) gekozen voor een (de)myelinisatie model met het minste ongerief.**

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

## **D. Ethische afweging**

Onderzoek naar de systemen die myelinisatie reguleren en definiëren is nodig om de basale biologie van het intact en functioneel houden van zenuwuitlopers beter te begrijpen. Het belang voor de mens is dat in de toekomst mogelijk betere therapieën of methoden voor de behandeling van multipale sclerose ontwikkeld kunnen worden, een ziekte waar nu nog geen langdurig effectieve behandeling voor bestaat. Dergelijk onderzoek is deels alleen uit te voeren bij dieren waarin de- remyelinisatie een goed beschreven fenomeen is, zoals de muis en rat. Het gebruik van de diersoort zoals hier benoemd is daarom te rechtvaardigen. Hoewel de dieren worden geschaad in hun belangen omdat ze ongerief ervaren door de experimentele handelingen, is dit door de onderzoekers zo veel mogelijk beperkt. Ook is serieus zorg besteed aan optimale vervanging, vermindering en verfijning. Daarom concludeert de DEC dat het belang van het onderzoek opweegt tegen het veroorzaakte ongerief.

## **E. Advies**

1. Advies aan de CCD

- De DEC adviseert de vergunning te verlenen**

10 december 2014

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

A. Deusinglaan 1,

9713 AV GRONINGEN



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD105002016504

**Bijlagen**

2

Datum 1 april 2016

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 1 april 2016.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD105002016504. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

**Wacht met de uitvoering van uw project**

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

**Factuur**

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

**Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

### **Gegevens aanvrager**

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10500  
Naam instelling of organisatie: Rijksuniversiteit Groningen  
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: [REDACTED]  
KvK-nummer: 1179037  
Straat en huisnummer: A. Deusinglaan 1, [REDACTED]  
Postcode en plaats: 9713 AV GRONINGEN  
IBAN: NL80ABNA0446049352  
Tenaamstelling van het rekeningnummer: Rijksuniversiteit Groningen

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

**Over uw aanvraag**

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

**Over uw project**

Geplande startdatum: 1 juni 2016  
Geplande einddatum: 31 mei 2021  
Titel project: Development of therapeutic strategies for a regenerative therapy for multiple sclerosis  
Titel niet-technische samenvatting: Ontwikkelen van therapeutische strategieën voor een remyelinisatie therapie in MS  
Naam DEC: DEC-RUG  
Postadres DEC: A. Deusinglaan 1, [REDACTED]  
E-mailadres DEC: secrdec.umcg@umcg.nl

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 1.584,-  
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

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

**Ondertekening**

Naam: [REDACTED]  
Functie: [REDACTED]  
Plaats: Groningen





> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

A. Deusinglaan 1, [REDACTED]

9713 AV GRONINGEN



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD105002016504

**Bijlagen**

2

Datum 1 april 2016

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 1 april 2016

Vervaldatum: 1 mei 2016

Factuurnummer: 16700504

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD105002016504	€ 1.584,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL41RBOS 056.999.6317 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93144, 2509 AC te 's Gravenhage.

[REDACTED]

---

**Van:** Info-zbo  
**Verzonden:** dinsdag 10 mei 2016 14:52  
**Aan:** [REDACTED]  
**CC:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** AVD105002016504: aanvullende informatie

Geachte [REDACTED]

Wij hebben een aanvraag van u in behandeling getiteld 'Development of strategies for a regenerative therapy for multiple sclerosis' met aanvraagnummer AVD105002016504.

Wij hebben nog een aantal vragen over deze aanvraag.

U geeft in uw aanvraag aan in bijlage 3.4.4.4. nanoparticles nodig te hebben die de blood-brain barrier kunnen passeren. Deze nanoparticles worden op dit moment nog ontwikkeld. Hierdoor is het onduidelijk of dit deel van het project wel uitgevoerd kan worden en de doelstellingen behaald kunnen worden.

-U wordt verzocht, vanuit het oogpunt van haalbaarheid, aan te geven of en zo ja op welke wijze dit deel van het project uitgevoerd zal worden indien de nanoparticles niet beschikbaar komen/niet functioneel blijken te zijn.

-U wordt, vanuit het oogpunt van vermindering, verzocht aan te geven op basis van welke criteria u zult besluiten het onderzoek in deze bijlage te starten.

U geeft in uw aanvraag aan een dodingsmethode te willen gebruiken (decapitatie) die alleen gebruikt mag worden als andere methodes niet gebruikt kunnen worden. U wordt verzocht toe te lichten of daar hier sprake van is.

#### **Opsturen informatie**

U heeft 14 dagen de tijd om te antwoorden. De CCD wil uw aanvraag echter graag in haar eerstvolgende vergadering bespreken. Wij zouden daarom de antwoorden graag uiterlijk donderdag 12 mei 2016 ontvangen.

#### **Wanneer een beslissing**

De beslistermijn op uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat bovengenoemde informatie is ontvangen. Na ontvangst van uw reactie/de ontbrekende informatie nemen wij uw aanvraag verder in behandeling. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

**Centrale Commissie Dierproeven** [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

**T: 0900 280028**

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

**Van:** Info-zbo  
**Verzonden:** dinsdag 10 mei 2016 16:58  
**Aan:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** AVD105002016504: Aanvullende informatie

Geachte DEC,

Wij hebben een aanvraag van u in behandeling waarover u ons van advies heeft voorzien. Het gaat om het project "getiteld 'Development of strategies for a regenerative therapy for multiple sclerosis' met aanvraagnummer AVD105002016504.

Wij hebben nog een vraag voor u over deze aanvraag.

U geeft in uw advies aan dat er geen sprake is van bijzondere categorieën. De aanvrager wil echter gebruik maken van een dodingsmethode uit Bijlage IV die alleen gebruikt mag worden indien andere methodes niet gebruikt kunnen worden. Dit dient beoordeeld te worden. De aanvrager geeft daarnaast aan dat alle mannelijke dieren gedurende de proef individueel gehuisvest worden. Dit is niet in overeenstemming met bijlage III. Kunt u aangeven of de aanvrager in beide situaties voldoet aan de vereisten in de Wet?

Wij hebben de aanvrager vandaag de volgende vragen gesteld:

U geeft in uw aanvraag aan in bijlage 3.4.4.4. nanoparticles nodig te hebben die de blood-brain barrier kunnen passeren. Deze nanoparticles worden op dit moment nog ontwikkeld. Hierdoor is het onduidelijk of dit deel van het project wel uitgevoerd kan worden en de doelstellingen behaald kunnen worden.

-U wordt verzocht, vanuit het oogpunt van haalbaarheid, aan te geven of en zo ja op welke wijze dit deel van het project uitgevoerd zal worden indien de nanoparticles niet beschikbaar komen/niet functioneel blijken te zijn.

-U wordt, vanuit het oogpunt van vermindering, verzocht aan te geven op basis van welke criteria u zult besluiten het onderzoek in deze bijlage te starten.

U geeft in uw aanvraag aan een dodingsmethode te willen gebruiken (decapitatie) die alleen gebruikt mag worden als andere methodes niet gebruikt kunnen worden. U wordt verzocht toe te lichten of daar hier sprake van is..

Aangezien de CCD deze aanvraag graag in de volgende vergadering wil bespreken, zouden wij graag uiterlijk donderdag 12 mei uw aanvullend advies willen ontvangen.

Met vriendelijke groet,

**Centrale Commissie Dierproeven** [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

**T: 0900 2800028**

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

De Rijksdienst voor Ondernemend Nederland ([RVO.nl](http://RVO.nl)) stimuleert Duurzaam, Agrarisch, Innovatief en Internationaal ondernemen. [RVO.nl](http://RVO.nl) is per 2014 ontstaan uit de fusie van Agentschap NL en Dienst Regelingen.

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.

---

De inhoud van dit bericht is vertrouwelijk en alleen bestemd voor de geadresseerde(n). Anderen dan de geadresseerde(n) mogen geen gebruik maken van dit bericht, het niet openbaar maken of op enige wijze verspreiden of vermenigvuldigen. Het UMCG kan niet aansprakelijk gesteld worden voor een incomplete aankomst of vertraging van dit verzonden bericht.

The contents of this message are confidential and only intended for the eyes of the addressee(s). Others than the addressee(s) are not allowed to use this message, to make it public or to distribute or multiply this message in any way. The UMCG cannot be held responsible for incomplete reception or delay of this transferred message.

---

De inhoud van dit bericht is vertrouwelijk en alleen bestemd voor de geadresseerde(n). Anderen dan de geadresseerde(n) mogen geen gebruik maken van dit bericht, het niet openbaar maken of op enige wijze verspreiden of vermenigvuldigen. Het UMCG kan niet aansprakelijk gesteld worden voor een incomplete aankomst of vertraging van dit verzonden bericht.

The contents of this message are confidential and only intended for the eyes of the addressee(s). Others than the addressee(s) are not allowed to use this message, to make it public or to distribute or multiply this message in any way. The UMCG cannot be held responsible for incomplete reception or delay of this transferred message.

**Puntsgewijze reactie op vragen betreffende aanvraag 'Development of strategies for a regenerative therapy for multiple sclerosis' (aanvraagnummer AVD105002016504).**

Vraag 1

U geeft in uw aanvraag aan in bijlage 3.4.4.4. nanoparticles nodig te hebben die de blood-brain barrier kunnen passeren. Deze nanoparticles worden op dit moment nog ontwikkeld. Hierdoor is het onduidelijk of dit deel van het project wel uitgevoerd kan worden en de doelstellingen behaald kunnen worden.

-U wordt verzocht, vanuit het oogpunt van haalbaarheid, aan te geven of en zo ja op welke wijze dit deel van het project uitgevoerd zal worden indien de nanoparticles niet beschikbaar komen/niet functioneel blijken te zijn.

Respons

Het deel van het project waarop de vraag doelt is het treatment model 1 ('to overcome remyelination failure in an MS lesion environment') uit bijlage 3.4.4.4. [REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED] Voorkeur gaat echter uit naar het gebruik van nanopartikels, mede gezien de beoogde translatie naar de klinische setting en vanuit het oogpunt van vermindering van het aantal dieren.

-U wordt, vanuit het oogpunt van vermindering, verzocht aan te geven op basis van welke criteria u zult besluiten het onderzoek in deze bijlage te starten.

Respons

In deze bijlage worden 3 'treatment models' beschreven. De 3 'treatment models' hebben als doel om methodes die mogelijke het falen van remyelinisatie in MS op heffen, te valideren (zie figuur 1 in onderdeel 3.4.1 van het projectvoorstel dierproeven). Deze validatie wordt pas uitgevoerd als de 'in vitro' bevindingen van de ontwikkelde methode ('tools') positief zijn (stap 3 uit figuur 1 in onderdeel 3.4.1 van het projectvoorstel dierproeven). Treatment model 1 wordt gestart op de criteria zoals hierboven beschreven. Treatment model 2 ('to modulate (endogenous) remyelination) en 3 [REDACTED]') kunnen onafhankelijk van de ontwikkeling van de nanopartikels worden uitgevoerd.

## Vraag 2

U geeft in uw aanvraag aan een dodingsmethode te willen gebruiken (decapitatie) die alleen gebruikt mag worden als andere methodes niet gebruikt kunnen worden. U wordt verzocht toe te lichten of daar hier sprake van is.

## Respons

In de aanvraag wordt decapitatie als dodingsmethode voor de neonaten beschreven. De neonaten (P1-3) ondervinden meer angst als de dodingsmethode zoals beschreven voor de volwassen dieren -overdosis van nembutal middels IC injectie onder isofluoraan anesthesie- wordt gebruikt. De decapitatie kan ook plaatsvinden na een overdosis isofluoraan anesthesie.

**Van:** [REDACTED]  
**Verzonden:** donderdag 12 mei 2016 15:55  
**Aan:** Info-zbo  
**Onderwerp:** RE: AVD105002016504: Aanvullende informatie

**Categorieën:** Dossier: [REDACTED]

Beste [REDACTED],

Naar mening van de DEC voldoet de aanvrager aan de vereisten in de wet:

T.a.v. de dodingsmethode: andere methodes kunnen niet gebruikt worden, dit omdat het muizen en ratten neonaten (p1-3, 1 week) zijn. Cervicale dislocatie en CO2 methodes kunnen dan niet gebruikt worden en/of zijn minder effectief. Ook van belang in deze discussie is het onderzoeksdoel, zijnde onderzoek naar functie van hersencellen t.a.v. (de)myelinisatie processen, waar beïnvloeding van deze cellen door gebruik van eventuele anesthetica ongewenst is. Decapitatie is dan de enige bruikbare methode in dit type onderzoek.

T.a.v. individuele huisvesting van mannelijke dieren: het optreden van agressie tussen - gezamenlijk gehuisveste mannelijke muizen onderling is een veelvoorkomende gebeurtenis. Dit zal van invloed zijn op de uitkomsten van het experiment. Om dit te voorkomen is individuele huisvesting nodig.

Vr. gr.

---

**From:** Info-zbo [mailto:info@zbo-ccd.nl]  
**Sent:** dinsdag 10 mei 2016 16:58  
**To:** [REDACTED]  
**Subject:** AVD105002016504: Aanvullende informatie

Geachte DEC,

Wij hebben een aanvraag van u in behandeling waarover u ons van advies heeft voorzien. Het gaat om het project "getiteld 'Development of strategies for a regenerative therapy for multiple sclerosis' met aanvraagnummer AVD105002016504.

Wij hebben nog een vraag voor u over deze aanvraag.

U geeft in uw advies aan dat er geen sprake is van bijzondere categorieën. De aanvrager wil echter gebruik maken van een dodingsmethode uit Bijlage IV die alleen gebruikt mag worden indien andere methodes niet gebruikt kunnen worden. Dit dient beoordeeld te worden. De aanvrager geeft daarnaast aan dat alle mannelijke dieren gedurende de proef individueel gehuisvest worden. Dit is niet in overeenstemming met bijlage III. Kunt u aangeven of de aanvrager in beide situaties voldoet aan de vereisten in de Wet?

Wij hebben de aanvrager vandaag de volgende vragen gesteld:

U geeft in uw aanvraag aan in bijlage 3.4.4.4. nanoparticles nodig te hebben die de blood-brain barrier kunnen passeren. Deze nanoparticles worden op dit moment nog ontwikkeld. Hierdoor is het onduidelijk of dit deel van het project wel uitgevoerd kan worden en de doelstellingen behaald kunnen worden.

-U wordt verzocht, vanuit het oogpunt van haalbaarheid, aan te geven of en zo ja op welke wijze dit deel van het project uitgevoerd zal worden indien de nanoparticles niet beschikbaar komen/niet functioneel blijken te zijn.  
-U wordt, vanuit het oogpunt van vermindering, verzocht aan te geven op basis van welke criteria u zult besluiten het onderzoek in deze bijlage te starten.

U geeft in uw aanvraag aan een dodingsmethode te willen gebruiken (decapitatie) die alleen gebruikt mag worden als andere methodes niet gebruikt kunnen worden. U wordt verzocht toe te lichten of daar hier sprake van is..

Aangezien de CCD deze aanvraag graag in de volgende vergadering wil bespreken, zouden wij graag uiterlijk donderdag 12 mei uw aanvullend advies willen ontvangen.

Met vriendelijke groet,

**Centrale Commissie Dierproeven** [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

**T: 0900 280028**

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

De Rijksdienst voor Ondernemend Nederland ([RVO.nl](http://RVO.nl)) stimuleert Duurzaam, Agrarisch, Innovatief en Internationaal ondernemen. [RVO.nl](http://RVO.nl) is per 2014 ontstaan uit de fusie van Agentschap NL en Dienst Regelingen.

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.

---

De inhoud van dit bericht is vertrouwelijk en alleen bestemd voor de geadresseerde(n). Anderen dan de geadresseerde(n) mogen geen gebruik maken van dit bericht, het niet openbaar maken of op enige wijze verspreiden of vermenigvuldigen. Het UMCG kan niet aansprakelijk gesteld worden voor een incomplete aankomst of vertraging van dit verzonden bericht.

The contents of this message are confidential and only intended for the eyes of the addressee(s). Others than the addressee(s) are not allowed to use this message, to make it public or to distribute or multiply this message in any way. The UMCG cannot be held responsible for incomplete reception or delay of this transferred message.

---

De inhoud van dit bericht is vertrouwelijk en alleen bestemd voor de geadresseerde(n). Anderen dan de geadresseerde(n) mogen geen gebruik maken van dit bericht, het niet openbaar maken of op enige wijze verspreiden of vermenigvuldigen. Het UMCG kan niet aansprakelijk gesteld worden voor een incomplete aankomst of vertraging van dit verzonden bericht.



The contents of this message are confidential and only intended for the eyes of the addressee(s). Others than the addressee(s) are not allowed to use this message, to make it public or to distribute or multiply this message in any way. The UMCG cannot be held responsible for incomplete reception or delay of this transferred message.

---

De inhoud van dit bericht is vertrouwelijk en alleen bestemd voor de geadresseerde(n). Anderen dan de geadresseerde(n) mogen geen gebruik maken van dit bericht, het niet openbaar maken of op enige wijze verspreiden of vermenigvuldigen. Het UMCG kan niet aansprakelijk gesteld worden voor een incomplete aankomst of vertraging van dit verzonden bericht.

The contents of this message are confidential and only intended for the eyes of the addressee(s). Others than the addressee(s) are not allowed to use this message, to make it public or to distribute or multiply this message in any way. The UMCG cannot be held responsible for incomplete reception or delay of this transferred message.



## Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

A. Deusinglaan 1,  
9713 AV Groningen

### Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
www.centralecommissiedierproeven.nl

T 0900-28 000 28 (10 ct /min)

Info@zbo-ccd.nl

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD105002016504

**Uw referentie**

### Bijlagen

1

Datum 02 juni 2016

Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte

Op 1 april 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'Development of strategies for a regenerative therapy for multiple sclerosis' met aanvraagnummer AVD105002016504. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

### Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). U kunt met uw project 'Development of strategies for a regenerative therapy for multiple sclerosis' starten. De vergunning wordt afgegeven van 02 juni 2016 tot en met 31 mei 2021.

### Voorwaarden

Aan deze vergunning zijn de voorwaarden verbonden zoals genoemd in de vergunning en hieronder toegelicht.

1) Hoewel u in uw aanvraag wel keuzemomenten beschreven heeft, zijn wij van mening dat de criteria op basis waarvan u zult besluiten target genen te selecteren voor vervolgonderzoek niet in voldoende mate zijn beschreven. Om deze reden hebben wij een voorwaarde opgenomen in de vergunning waarbij de criteria op basis waarvan kandidaat genen geselecteerd worden voor aanvang van het project afgestemd dienen te worden met de IvD. Deze voorwaarde is toegevoegd om te voorkomen dat dieren onnodig ongerief ondergaan.

2) In Art. 10a2, lid 2 sub d wordt vereist dat wij een analyse maken van de schade en de baten die het project oplevert, waarbij wordt nagegaan of de schade in de vorm van pijn, lijden, angst of blijvende schade bij de dieren wordt gerechtvaardigd door het te verwachte resultaat met inachtneming van de ethische overwegingen, en op termijn voordelen kan opleveren voor mens, dier of milieu. Wij zijn niet overtuigd van de haalbaarheid van die doelstellingen in uw project waarvoor gebruik gemaakt gaat worden van treatment model 1. De haalbaarheid van dit model is namelijk afhankelijk van nanopartikels die momenteel nog in ontwikkeling zijn. Om die reden hebben wij een voorwaarde toegevoegd waarbij u voor aanvang van treatment model 1 dient aan te tonen dat de te gebruiken nanopartikels bewezen effectief zijn en de bloed-hersenbarrière kunnen passeren. Deze onderbouwing dient ter goedkeuring aan ons te worden voorgelegd. Het betreft hier een opschortende voorwaarde. Dit betekent dat u pas met treatment model 1 in bijlage 3.4.4.4 mag starten zodra u van de CCD goedkeuring heeft gekregen.

### Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-RUG gevoegd. Dit advies is ontvangen op 1 april 2016. Bij de beoordeling van uw aanvraag is het advies betrokken

**Datum**

02 juni 2016

**Onze referentie**Aanvraagnummer  
AVD105002016504

overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet. Op 12 mei 2016 heeft de DEC ons van aanvullend advies voorzien over de te gebruiken dodingsmethoden en het individueel huisvesten van de dieren. Wij kunnen ons vinden in het aanvullend advies van de DEC. Bij de beoordeling van uw aanvraag is zowel het advies als het aanvullend advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet. Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit. Wij nemen het advies van de Dierexperimentencommissie grotendeels over met uitzondering van bovenstaande afwijkingen. Met het oog op artikel 10a, lid 1 van de wet wordt een algemene voorwaarde toegevoegd.

Wij hebben u op 10 mei 2016 om aanvullende informatie gevraagd over de haalbaarheid van het project i.v.m. het gebruik van nanopartikels die momenteel nog in ontwikkeling zijn en het gebruik van een in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU (Art. 13c, lid 1) beschreven dodingsmethode waarvoor aanvullende voorwaarde gelden. Op 12 mei 2016 heeft u digitaal gereageerd op onze vragen. Zoals hierboven uiteengezet kunnen wij ons slechts deels vinden in de nadere verduidelijking van uw aanvraag wat betreft het gebruik van de nanopartikels en hebben daarom een opschortende voorwaarde opgenomen in de vergunning.

**Bezwaar**

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen. Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

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

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

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

**Meer informatie**

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

De Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:



ir. G. de Peuter  
Algemeen Secretaris

Dit besluit is genomen met inachtneming van het Besluit mandaat, volmacht en machtiging van de Centrale Commissie Dierproeven CCD 2014 zoals de Centrale Commissie Dierproeven heeft

**Datum**

02 juni 2016

**Onze referentie**

Aanvraagnummer

AVD105002016504

vastgesteld op 19 december 2014, ref 2014-04 en is gepubliceerd in de Staatscourant van 2 januari 2015, Nr. 163

**Bijlagen****- Vergunning**

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

**Datum**

02 juni 2016

**Onze referentie**

Aanvraagnummer

AVD105002016504



## Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan  
Naam: Rijksuniversiteit Groningen  
Adres: A. Deusinglaan 1 [REDACTED]  
Postcode en woonplaats: 9713 AV Groningen  
Deelnemersnummer: 10500

deze projectvergunning voor het tijdvak 02 juni 2016 tot en met 31 mei 2021, voor het project 'Development of strategies for a regenerative therapy for multiple sclerosis' met aanvraagnummer AVD105002016504, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-RUG.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 1 april 2016;
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 1 april 2016;
  - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 1 april 2016;
  - c. Advies van Dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 1 april 2016;
  - d. De aanvullingen op uw aanvraag, zoals ontvangen op 12 mei 2016;
  - e. Aanvullend advies van Dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 12 mei 2016.

### Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1. Primary cell culture models	Ratten	3280	Licht	Embryo's E15-E17: 200 Neonaten (P1-3): 2000 Neonaten (1 week): 600 Zwangere vrouwtjes: 280 9 maanden: 100 20 maanden: 100
3.4.4.2. Cuprizone model	Muizen	160	Licht	
3.4.4.3. Transplantation model	Muizen	474	Licht: 44% Matig: 56%	Ontvangers: 264 Donoren, zwangere vrouwtjes: 10 Donoren, neonaten: 80 Donoren, 4 maanden: 60 Donoren, 16 maanden: 60
3.4.4.4. Treatment models	Muizen	450	Licht: 53% Matig: 47%	C57BL/6 8-12 weken: 120 [REDACTED]

### Voorwaarden

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

- 1) De criteria op basis waarvan besloten zal worden kandidaat genen te selecteren voor vervolproeven dienen voor aanvang van het project afgestemd te worden met de IvD.

**Datum**

02 juni 2016

**Onze referentie**Aanvraagnummer  
AVD105002016504

2) Voor aanvang van treatment model 1 dient u aan te tonen dat de te gebruiken nanopartikels bewezen effectief zijn en de bloed-hersenbarrière kunnen passeren. Deze onderbouwing dient ter goedkeuring aan de CCD te worden voorgelegd. De CCD zal op basis van de aanvullende informatie beoordelen of treatment model 1 al dan niet uitgevoerd mag worden. Het betreft hier een opschortende voorwaarde. U mag pas met treatment model 1 in bijlage 3.4.4.4 starten zodra u van de CCD goedkeuring heeft gekregen.

**Algemene voorwaarde**

1) In artikel 10, lid 1a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning.

Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

## Weergave wet- en regelgeving

### Dit project en wijzigingen

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

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

### Verzorging

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

In artikel 9 staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn.

In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.

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

### Pijnbestrijding en verdoving

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdoving wordt uitgevoerd tenzij dat niet mogelijk is, dan wel bij het verrichten van een dierproef worden pijnstillers toegediend of andere goede methoden gebruikt die de pijn, het lijden, de angst of de blijvende schade bij het dier tot een minimum beperken. Een dierproef die bij het dier gepaard gaat met zwaar letsel dat hevige pijn kan veroorzaken, wordt niet zonder verdoving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdoving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdoving onvermijdelijk is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

### Einde van een dierproef

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

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



**Datum**

02 juni 2016

**Onze referentie**

Aanvraagnummer

AVD105002016504

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

Inventaris Wob-verzoek W16-19S									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	<b>NTS2016506</b>								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel				x	x		x	
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage beschrijving dierproeven				x	x		x	
5	DEC-advies				x	x	x	x	
6	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
7	Mails vraag antwoord 17-5-2016				x	x	x	x	
8	Reactie op vraag				x	x	x	x	
9	Advies CCD		x						x
10	Beschikking en vergunning				x		x	x	



# Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

## 1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 32600 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie PD ALT / Intravacc Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde [Redacted] KvK-nummer
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 Antonie van Leeuwenhoeklaan 9 Postbus 450 Postcode en plaats 3720AL Bilthoven IBAN NL69RBOS0569999014 Tenaamstelling van het rekeningnummer Ministerie van VWS
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters [Redacted] <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw. Functie Onderzoeksmedewerker Afdeling [Redacted] Telefoonnummer [Redacted] E-mailadres [Redacted]
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters [Redacted] <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw. Functie Afdeling Telefoonnummer E-mailadres

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

## 2 Over uw aanvraag

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

## 3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 2 5 \_ 0 4 \_ 2 0 1 6
- Einddatum 2 5 \_ 0 4 \_ 2 0 2 1
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Bepalen van immuniserend vermogen van BCG vaccin d.m.v. Delayed Type of tuberculin
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Bepalen van immuniserend vermogen van de nieuwe Working Seed Lot t.b.v. BCG vaccin
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC DEC ALT
- Postadres Postbus 450, 3720 MA Bilthoven
- E-mailadres

## 4 Betaalgegevens

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

## 5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
- Verplicht
- Projectvoorstel
- Niet-technische samenvatting
- Overige bijlagen, indien van toepassing
- Melding Machtiging
- 1 x bijlage "beschrijving dierproeven"

## 6 Ondertekening

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

Centrale Commissie  
 Dierproeven  
 Postbus 20401  
 2500 EK Den Haag

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

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

Naam [REDACTED]

Functie [REDACTED]

Plaats Bilthoven

Datum 31 - 03 - 2016

Handtekening [REDACTED]





## Format Projectvoorstel dierproeven

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

### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in. 32600
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in. Intravacc
- 1.3 Vul de titel van het project in. Bepalen van immuniserend vermogen van BCG vaccin d.m.v. Delayed Type of tuberculin Hyper reactivity (DTH) test.

### 2 Categorie van het project

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

### 3 Algemene projectbeschrijving

#### 3.1 Achtergrond

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

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

produceert het Bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccin. Dit vaccin is verkregen door de tuberculose-veroorzakende bacterie *Mycobacterium bovis* veelvuldig te "passeren" in een laboratorium omgeving. Het passeren is het overzetten van levend celmateriaal van een nutriënt arme omgeving naar een nutriënt rijke omgeving zodat deze cellen in leven gehouden kunnen worden en kunnen blijven groeien. Tijdens het passeren van de *Mycobacterium bovis* stam zijn er mutaties opgetreden die hebben geleid tot een afname van de virulentie van deze bacterie, waardoor BCG bruikbaar is voor het vaccineren van mensen ter voorkoming van Tuberculose. Naast deze specifieke toepassing van BCG, is al decennia bekend dat BCG een sterke aspecifieke stimulator is voor het immuunsysteem (Freund's adjuvant). Van deze eigenschap wordt voornamelijk gebruikt gemaakt bij de behandeling van zogenaamde niet-invasieve blaastumoren. Na het chirurgisch verwijderen van deze tumoren kan blaasspoeling met het BCG vaccin er voor zorgen dat het immuunsysteem in de blaas zodanig gestimuleerd wordt, dat de kans op terugkeer van tumorontwikkeling sterk verkleind wordt. Het is vereist om het immuno-stimulerend vermogen van een nieuwe BCG Working Seed Lot aan te tonen conform de Europese Farmacopee (Ph.Eur.) middels een Delayed Type of tuberculin Hyper (DTH) reactivity test. De BCG Working Seed Lot is het bacteriële materiaal waarmee de kweek gestart wordt voor het produceren van het betreffende BCG vaccin. De DTH test hoeft niet op iedere reguliere partij plaats te vinden, maar uitsluitend op de eerste batch welke geproduceerd vanuit een nieuwe Working Seed Lot (Ph.Eur 01/2009:1929). Middels dit project wordt een vergelijk gemaakt tussen de eerste nieuwe batch afkomstig van de nieuwe Working Seed Lot met een controle BCG vaccin afkomstig van de oude/bestaande Working Seed Lot.

Omdat cavia's gevoelig zijn voor mycobacteriën vereist de Ph.Eur. de DTH test, om te controleren of de nieuwe Seed Lot van BCG niet significant verschillend is van de voorgaande Seed Lot. Deze test wordt uitgevoerd door cavia's subcutaan in te spuiten met 1 ml van het BCG vaccin, afkomstig uit zowel de oude als de nieuwe Seed Lot. Na een periode van 6 weken worden de dieren intracutaan (injectie in de huid) geïnjecteerd met Tuberculin PPD. Na deze injectie zal er een ontstekingsreactie zichtbaar worden, in de vorm van een erythema op de plaats van injectie. Na 48 uur wordt de diameter gemeten van dit erythema. De gemeten waarden van de eerste batch BCG vaccin geproduceerd uit de nieuwe Working Seed moeten vergelijkbaar zijn met waarden van het controle BCG vaccin afkomstig van de oude/bestaande Working Seed Lot.

### 3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

Het uiteindelijke doel van het project is het bepalen van het immuniserend vermogen van de nieuwe BCG Working Seed Lot conform wet- en regelgeving t.b.v. van de vrijgifte van deze Seed Lot.

### 3.3 Belang

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

Per jaar worden er wereldwijd meer dan 300.000 nieuwe gevallen van blaaskanker geconstateerd. In Nederland zijn dit ongeveer 10.000 mensen, waarbij 4000 gevallen de zogenaamde niet-invasieve vorm van blaaskanker hebben. Patiënten die deze niet-invasieve vorm van blaaskanker hebben, kunnen baat hebben bij een behandeling bestaande uit een blaasspoeling met het BCG vaccin (de zogenaamde blaasinstillatie). Deze behandeling wordt toegepast na operatieve verwijdering van een niet-invasieve tumor en kan het risico op een recidief aanzienlijk verlagen.

Om te controleren of de werkzaamheid van het BCG vaccin waarmee de blaasinstillatie wordt toegepast vergelijkbaar blijft tussen de verschillende Working Seed Lots van BCG, wordt iedere eerste batch, gemaakt uit een nieuwe Seed Lot vergeleken op werkzaamheid met een voorgaande batch uit een bewezen werkzame Seed Lot. Deze werkzaamheid wordt getest middels de in dit projectvoorstel omschreven DTH-test. Door deze test uit te voeren, kan gegarandeerd worden dat mensen met de niet-invasieve vorm van blaaskanker behandeling ondergaan met een bewezen werkzaam BCG vaccin.



### 3.4 Onderzoeksstrategie

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

Dit project omschrijft de uitvoering van de DTH-test. Voor het uitvoeren van één DTH test worden █ cavia's gebruikt. Per test zal één geslacht worden gebruikt. Dit om verschillen veroorzaakt door een verschil in geslacht uit te kunnen sluiten.

Op dag 0 worden alle cavia's geïmmuniseerd. █ cavia's met fysiologisch zout (negatieve controle), █ cavia's met BCG A (controle sample) en █ cavia's met BCG B (het te testen sample). Na 6 weken (dag 42) worden de flanken van alle dieren geschoren en intracutaan geïnjecteerd met 0,1 ml Tuberculin PPD. Na 48 uur (dag 44) worden de gevormde erythema's opgemeten in 2 richtingen die haaks op elkaar staan. Deze metingen worden bij elkaar opgeteld en gemiddeld. De gevonden data van het te testen BCG vaccin sample (BCG B) moeten gelijkwaardig zijn aan het controle sample (BCG A) zoals beschreven in de Ph.Eur. Van de waardes van het controle sample wordt een 70-130% gebied berekend. De gevonden waardes van het te testen sample moeten hier binnen liggen. Als dit niet het geval is dan wordt de nieuwe Working Seed Lot niet worden vrijgegeven voor productie van nieuwe batches BCG vaccin. De dieren die geïmmuniseerd zijn met fysiologisch zout zullen geen erythema's ontwikkelen. Als deze dieren wel erythema's ontwikkelen dan is er sprake van een vals positieve reactie. In dit geval wordt test invalide verklaard.

De uitslag van de DTH-test wordt afgelezen aan de hand van de gevormde huidreactie. Hierdoor is het van groot belang dat de gevormde huidreactie goed afleesbaar is na 6 weken (+2 dagen). Hoewel er in dit projectvoorstel geen eis wordt gesteld aan het geslacht van de dieren, is het risico op bijvoorbeeld vechten bij de mannelijke dieren, in combinatie met de gewenste langdurige gezamenlijke huisvesting, groter. Om deze reden werden in het verleden uitsluitend vrouwelijke dieren gebruikt. Wanneer blijkt dat gezamenlijke huisvesting van de mannelijke dieren in de praktijk een probleem oplevert waardoor er invalide testen ontstaan en dus herhaling nodig is, dan zal het project op een passende manier gewijzigd worden.

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

█ produceert BCG vaccins vanuit Working Seed Lots. Elke nieuwe Working Seed Lot moet worden vrijgegeven op basis van immuno-stimulerend vermogen volgens wet & regelgeving van de Ph.Eur (zie 01/2009:1929)

Dit projectvoorstel heeft uiteindelijk 1 hoofdlijn:

Het testen van het BCG vaccin, dat geproduceerd is van uit de nieuwe Working Seed Lot, zodat bij positief resultaat het vaccin goedgekeurd kan worden en daarmee de nieuwe BCG Working Seed Lot kan worden vrijgegeven voor BCG vaccin productie.

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

█ is een BCG vaccin fabrikant die de markt wil bedienen met zijn geproduceerde en vrijgegeven BCG vaccins. Om dit BCG vaccin te mogen produceren moet de Working Seed Lot vrijgegeven worden op immuno-stimulerend vermogen conform wet & regelgeving. █ voert deze analyse routinematig uit volgens een goedgekeurd en diermodel.

Wanneer het immuno-stimulerend vermogen van de Working Seed Lot voldoet aan de gestelde eisen, wordt deze vrijgegeven voor de productie van BCG vaccins. Bij onvoldoende immuno-stimulerend vermogen zal de Working Seed Lot afgekeurd worden en mag deze niet gebruikt worden voor de productie van BCG vaccin.

Op deze manier zorgt █ ervoor, dat de vaccins, die op de markt komen voldoen aan de gestelde eisen, zodat goede immuno-stimulerende BCG vaccins beschikbaar zijn voor de betreffende doelgroep (blaaskankerpatiënten).

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Bepaling van immuno-stimulerend vermogen van de eerste batch BCG vaccin voor blaasinstillatie, geproduceerd vanuit een nieuwe Working Seed Lot d.m.v. Delayed Type of tuberculin Hyper (DTH) reactivity test.
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	32600	
1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Intravacc	
1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
<i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>	1	Bepaling van immuno-stimulerend vermogen van de eerste batch BCG vaccin voor blaasinstillatie, geproduceerd vanuit een nieuwe Working Seed Lot d.m.v. Delayed Type of tuberculin Hyper (DTH) reactivity test.

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Om het immuno-stimulerend vermogen van de nieuwe Bacillus Calmette-Guérin (BCG) Working Seed Lot te bepalen, wordt de eerste batch BCG vaccin welke geproduceerd wordt vanuit deze nieuwe Working Seed Lot, geanalyseerd d.m.v. de Delayed Type of tuberculin Hyper (DTH) reactivity test. Deze DTH test wordt voorgeschreven door de Europese Farmacopee (Ph.Eur.), monograaf 01/2009:1929, en is verplicht voor het vrijgeven van de nieuwe Working Seed Lot. Met de vrijgave van de nieuwe Working Seed Lot, kan deze Seed Lot in gebruik genomen worden voor productie van het BCG vaccin.

In deze test wordt gecontroleerd of de eerste batch BCG vaccin, geproduceerd vanuit de nieuwe Working Seed Lot, een vergelijkbare immuunreactie induceert als het BCG controle (referentie) vaccin uit een bestaande Working Seed Lot.

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

Deze DTH test bestaat uit  cavia's. Op dag 0 worden alle cavia's subcutaan geïmmuniseerd.  cavia's met fysiologisch zout (negatieve controle),  cavia's met BCG A (controle/referentie vaccin) en  cavia's BCG B (te testen sample). Na een immunisatie periode van 6 weken (dag 42) worden de flanken van alle dieren geschoren en intracutaan geïnjecteerd met 0,1 ml Tuberculin PPD. Na 48 uur (Dag 44) worden gevormde erythema's (immunologische ontstekingsreactie) opgemeten in 2 richtingen die haaks op elkaar staan. Deze metingen worden bij elkaar opgeteld en gemiddeld. De dieren die geïmmuniseerd zijn met fysiologisch zout zullen geen erythema's ontwikkelen. Als deze dieren wel erythema's ontwikkelen dan is er sprake van een vals positieve reactie. In dit geval wordt test invalide verklaard.

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

■ Een statistische analyse c.q. power analyse is niet mogelijk.

## B. De dieren

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

Voor het uitvoeren van een DTH-test wordt 1 geslacht gehanteerd (geen voorkeur voor mannelijke of vrouwelijke dieren) om eventuele verschillen in uitkomst, veroorzaakt door geslacht, uit te kunnen sluiten. De dieren wegen voor aanvang van de test 250 en de 350 gram en zullen gezamenlijk gehuisvest worden.

## C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

## D. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welk keuzes daarbij zijn gemaakt.

Het aantonen van het immuno-stimulerend vermogen van BCG vaccins middels een *in vivo* experiment (DTH test) wordt voorgeschreven door de Ph.Eur 01/2009:1929. Er is nog geen gevalideerd en geaccepteerd *in vitro* alternatief voorhanden. Zodra een alternatieve test beschikbaar komt waar geen proefdieren voor nodig zijn, zal onze organisatie deze test zo snel mogelijk implementeren.

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

Om het immuno-stimulerend vermogen van iedere eerste batch BCG vaccin vanuit een nieuwe Working Seed Lot te testen, zal deze test ongeveer ■ maal worden uitgevoerd gedurende de looptijd van dit project (5 jaar). Het aantal te testen Seed Lots hangt samen met het aantal batches welke vanuit een Working Seed Lot geproduceerd kunnen worden. Op dit moment wordt de maximaal haalbare grote per batch gehanteerd, een vergroting van de batches (wat zou leiden tot een vermindering in het aantal te testen Seed Lots) is niet mogelijk. Een vermindering van het aantal testen is verder niet mogelijk aangezien op iedere nieuw geproduceerde Working Seed Lot een DTH-test uitgevoerd moet worden.

Het verlagen van het aantal dieren per te testen vaccin is ook niet mogelijk, het minimaal aantal dieren per groep ■ wordt al aangehouden.

Op het gebied van verfijning zal het volgende worden toegepast: Voor de huisvesting zal er kooiverrijking aanwezig zijn gedurende de hele dierproef (6 weken). Het subcutaan injecteren (immunisatie), het intracutaan injecteren (tuberculin PPD) en het euthanaseren (ketamine + xylazine gevolgd door pentobarbital) van de dieren zijn handelingen die fysiek ongerief kunnen veroorzaken bij de dieren. Dit injecteren en euthanaseren zal door getraind en bekwaam personeel worden uitgevoerd. Ook dit verlaagt het ongerief en verhoogt de verfijning van deze dierproef.

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

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

Het is wettelijk verplicht om de eerste batch BCG vaccin, geproduceerd vanuit een Nieuwe Working Seedlot, te controleren op het immuno-stimulerend vermogen middels een dierproef (DTH-test). Een goedgekeurd en vrijgegeven vaccin hoeft niet opnieuw getest te worden.

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Er worden geen andere vormen van welzijnsaantasting verwacht.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

n.v.t.

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

n.v.t.

### J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

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

### K. Classificatie van ongerief

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

De ongerief classificatie voor de hele dierproef is 'licht'. Het subcutaan immuniseren en het intradermaal injecteren (tuberculin) veroorzaakt ongerief bij de dieren. De euthanasie methode wordt uitgevoerd onder anesthesie (ketamine + xylazine gevolgd door pentobarbital).

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

Nee

Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

Na immunisatie (injectie) met een BCG vaccin plus de intradermale injecties (injecties in de huid) met Tuberculin PPD, zijn de dieren niet meer geschikt voor andere doeleinden. De aanwezige antistoffen opgewekt door het BCG vaccin (immunisatie) en de huidreacties, veroorzaakt door Tuberculin PPD, zullen de resultaten van andere diertesten kunnen verstoren. Aan het einde van de dierproef worden om deze reden alle dieren geëuthanaseerd.

Hergebruik van de dieren middels bijvoorbeeld adoptie (of ander hergebruik) van de dieren is niet wenselijk aangezien de dieren geïmmuniseerd zijn met levend BCG, behorende tot de Biosafety Level 2 (BSL-2) organismen.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja

# Format DEC-advies

---

Maak bij de toepassing van dit format gebruik van de bijbehorende toelichting, waarin elke stap in het beoordelingsproces wordt toegelicht

## A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer
2. Titel van het project: **Bepalen van immuniserend vermogen van BCG vaccin d.m.v. Delayed Type of tuberculin Hyper reactivity (DTH) test.**
3. Titel van de NTS: **Bepalen van immuniserend vermogen van de nieuwe Working Seed Lot t.b.v. BCG vaccin productie**
4. Type aanvraag:
  - nieuwe aanvraag projectvergunning**
5. Contactgegevens DEC:
  - naam DEC: **DEC Alt**
  - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
  - mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
  - ontvangen door DEC: **21-12-2015**
  - aanvraag compleet
  - in vergadering besproken: **07-01-2016**
  - anderszins behandeld
  - termijnonderbreking(en) van / tot: **07-01-2016 tot 15-01-2016**
  - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
  - aanpassing aanvraag
  - advies aan CCD: 10-03-2016
7. Eventueel horen van aanvrager
  - Datum: **07-01-2016**
  - Plaats: **Bilthoven**
  - Aantal aanwezige DEC-leden: **7**
  - Aanwezige (namens) aanvrager: **verantwoordelijk onderzoeker**

- Strekking van de vraag / vragen:
- Strekking van het (de) antwoord(en):
- Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag:

8. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: **07-01-2016**

Strekking van de vraag / vragen:

- **Het belang van de test is onderbelicht t.o.v. het belang van het vaccin.**
- **De motivatie voor de sekse is onvoldoende.**
- **Waarom is er elk jaar een nieuwe Working Seed Lot nodig?**
- **Waarom zijn de dieren niet geschikt voor adoptie?**
- **Voorstel om in de NTS de tekst onder "projectvoorstel" te vereenvoudigen en om uit te leggen wat een Working Seed Lot is.**
- **Enkele tekstuele wijzigingen**

- Datum antwoord: **18-01-2016**

- Strekking van het (de) antwoord(en):

- **Het belang van de test is verduidelijkt (tekst is herschreven).**
- **In het kader van de motivatie voor het geslacht heeft de onderzoeker aangegeven dat ze in principe geen bezwaar hebben tegen het alternerend gebruik van beide seksen. Echter de uitslag van de DTH-test is afhankelijk van het correct kunnen aflezen van de gevormde huidreactie. Daarom is het van groot belang dat deze huidreactie nog goed afleesbaar is na 6 weken (+2 dagen). Wanneer in de praktijk blijkt dat bij gezamenlijke huisvesting de dieren gaan vechten en de huid hierdoor beschadigd raakt, zal het project hierop aangepast moeten worden (dan zal op dat moment besloten moeten worden wat de best passende oplossing is; of overstappen op alleen gebruik van vrouwelijke dieren of individuele huisvesting bij gebruik mannelijke dieren).**
- **Vanuit één Working Seed Lot kan een bepaald aantal vaccin batches geproduceerd worden. Het aantal Working Seed Lots dat gemaakt en getest moet worden is afhankelijk van de grootte van de vaccin batch. Op dit moment wordt de maximaal haalbare grootte per batch gehanteerd. Dit antwoord is in de tekst opgenomen.**



- **De dieren worden geïmmuniseerd met levend BCG hetgeen behoort tot de Biosafety Level 2 (BSL-2) organismen. Om deze reden is adoptie niet wenselijk.**

- **In de NTS is de tekst onder projectvoorstel aangepast.**

9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC)

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

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

1. Het project is **vergunningplichtig**.
2. Het project betreft een **nieuwe aanvraag**.
3. De DEC ALT heeft de competenties en de ervaring om te adviseren over dit project.
4. De DEC leden zijn niet betrokken bij het project en onafhankelijkheid en onpartijdigheid is gegarandeerd.

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

1. Het project is wettelijk vereist.
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie "wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie" is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.
3. De DEC ALT onderschrijft het belang van het testen BCG Working Seed Lots op werkzaamheid voorafgaand aan de productie van BCG vaccin. Dit is een vaccin dat toegepast wordt bij de nabehandeling van blaaskanker. De dierproeven die in dit project beschreven staan, worden uitgevoerd volgens gestandaardiseerde protocollen die beschreven staan in de richtlijnen van de Europese Pharmacopae (EP). Het is van essentieel belang om de werkzaamheid te bepalen voordat dit vaccin toegepast kan worden in een klinische setting.

4. De DEC ALt verwacht dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling van het project.
5. Er is geen sprake van "bijzonderheden op het gebied van de categorieën, omstandigheden of de behandeling van de dieren".
6. De DEC ALt acht de mate van ongerief - licht - realistisch ingeschat. Verwacht wordt dat de dieren ongerief zullen ondervinden van het subcutaan injecteren van het vaccin (licht ongerief) en het intradermaal injecteren van tuberculin (licht ongerief) en de daarop volgende huidreacties (licht ongerief).
7. Er zijn geen methoden die deze dierproeven geheel of gedeeltelijk kunnen vervangen. Het gaat om wettelijk vereiste testen waarvoor in de wet en regelgeving geen alternatief beschreven wordt. De onderzoekers hebben aangegeven proefdiervrije methoden zo snel mogelijk te implementeren, als deze beschikbaar komen.
8. Het gaat in dit project om wettelijk vereist onderzoek waarvoor het aantal dieren vastgelegd is in de daarvoor bestemde wet- en regelgeving. Het totaal aantal dierexperimenten is gebaseerd op een schatting van de BCG productie in de komende vijf jaar en het maximale volume van één Working Seed Lot. De aanvragers vroegen aanvankelijk om uitsluitend vrouwelijke cavia's te mogen gebruiken. Dit is in het verleden altijd zo gedaan. Het project bestaat uit [REDACTED] experiment). De richtlijn voor deze test (Ph.Eur 01/2009:1929) schrijft niet voor dat er dieren van één bepaald geslacht dienen te worden gebruikt. De commissie kan zich echter voorstellen dat de aanvragers per experiment slechts één geslacht willen gebruiken. Het gebruiken van dieren van beide geslachten in een experiment met drie groepen en een groepsgrootte van [REDACTED] lijkt de commissie niet alleen logistiek ingewikkeld, maar ook wetenschappelijk riskant. De aanvragers hebben zich echter wel bereid verklaard om de experimenten afwisselend met uitsluitend mannelijke en met uitsluitend vrouwelijke dieren uit te voeren. Zij zullen de leverancier vragen of deze mannelijke dieren kan leveren en zullen zich verdiepen in de vraag hoe mannelijke dieren met een zo groot mogelijke kans op succes sociaal gehuisvest kunnen worden. Hoewel de aanvragers geen ervaring hebben met het gebruik van mannelijke dieren in deze experimenten, nemen zij aan dat de kans groot is dat sociaal gehuisveste mannelijke dieren gaan vechten. Dit kan tot ernstige verwondingen leiden, wat niet alleen tot extra ongerief leidt,

maar ook kan interfereren met de uitleesparameter van de proef (de omvang van rode vlekken op de huid). Als blijkt dat de dieren elkaar verwondingen toebrengen, dient naar de mening van de DEC direct te worden ingegrepen door de dieren solitair te huisvesten. Het langdurig – de proef duurt zes weken – solitair huisvesten van de dieren leidt tot matig ongerief. Het solitair huisvesten van mannetjes in een proef waarin ook vrouwtjes worden gebruikt, roept bovendien de vraag op of de resultaten bij de vrouwen in groepshuisvesting (als dat logistiek al mogelijk zou zijn) wel zonder meer vergeleken kunnen worden met die bij de mannen. De DEC stelt daarom voor de onderzoekers vergunning te verlenen onder de voorwaarde dat zij voor de experimenten afwisselend uitsluitend mannelijke of vrouwelijke dieren gebruiken. Na de eerste proef met mannelijke dieren zouden zij moeten evalueren of de proef met mannelijk dieren haalbaar is. Als zou blijken dat mannen elkaar inderdaad verwondingen toebrengen, dan verdient het in de ogen van de DEC de voorkeur om voortaan deze experimenten uitsluitend met vrouwelijke dieren uit te voeren. Het belang van het voorkomen van een mogelijk fokoverschot van mannelijk dieren weegt in dat geval niet op tegen het extra ongerief voor de dieren en het risico dat de proef moet worden herhaald. Naar de mening van de DEC dient dan de vergunning te worden herzien (toestaan dat uitsluitend vrouwelijke dieren worden gebruikt).

9. Het project is in overeenstemming met de vereisten van de verfijning van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. In het project zal kooiverrijking worden toegepast. Er is geen sprake van substantiële negatieve milieu-effecten.
10. De DEC ALt heeft een kleine tekstuele wijzigingen voorgesteld, maar is in het algemeen van mening dat de NTS begrijpelijk geformuleerd is en een evenwichtige samenvatting is van het project.

## **D. Ethische afweging**

Op grond van de overwegingen in deel C van dit advies komt de DEC ALt tot de volgende ethische afweging.

Het project heeft als doelstelling het bepalen van de werkzaamheid van BCG Working Seed Lots. Dit gebeurt door middel van een wettelijk vereiste dierproef. Er zijn geen alternatieven voorhanden die het dierexperiment zoals beschreven

in het projectvoorstel kunnen vervangen. De DEC ALT acht het van essentieel belang dat de werkzaamheid van dit product gewaarborgd wordt met als doel blaaskankerpatiënten zo optimaal mogelijk te kunnen behandelen.

Tegenover dit grote belang staat dat de dieren licht ongerief zullen ondervinden van de injectie, de te injecteren vloeistof en immunologische reacties. Reacties die tot meer dan licht ongerief leiden, zijn nog nooit waargenomen bij deze producent.

De DEC ALT is van mening dat het belang van het bepalen van de werkzaamheid van BCG Working Seed Lots als uitgangsmateriaal voor de nabehandeling van blaaskanker opweegt tegen het ongerief dat de dieren zullen ondervinden als gevolg van de handelingen zoals beschreven in het projectvoorstel.


## **E. Advies**

1. Advies aan de CCD
  - **De DEC adviseert de vergunning te verlenen**
2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

PD ALt / Intravacc

Postbus 450  
3720 BILTHOVEN  


**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD326002016506

**Bijlagen**

2

Datum 4 april 2016

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 4 april 2016.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD326002016506. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

**Wacht met de uitvoering van uw project**

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

**Factuur**

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

**Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur



Gegevens gemachtigde

BSN: [REDACTED]  
Naam: [REDACTED]  
Postbus: 450  
Postcode en plaats: 3720 BILTHOVEN  
Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Ja

**Over uw aanvraag**

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

**Over uw project**

Geplande startdatum: 25 april 2016  
Geplande einddatum: 25 april 2021  
Titel project: Bepalen van immuniserend vermogen van BCG vaccin d.m.v. Delayed Type of tuberculin  
Titel niet-technische samenvatting: Bepalen van immuniserend vermogen van de nieuwe Working Seed Lot t.bv. BCG vaccin  
Naam DEC: DEC ALT  
Postadres DEC: Postbus 450, 3720 MA Bilthoven [REDACTED]  
E-mailadres DEC: [REDACTED]

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 468,-  
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

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



**Ondertekening**

Naam:

[REDACTED]

Functie:

[REDACTED]

Plaats:

Bilthoven

Datum:


31 maart 2016



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

PD Alt / Intravacc



Postbus 450  
3720 BILTHOVEN  


**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD326002016506

**Bijlagen**

2

Datum 4 april 2016  
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 4 april 2016  
Vervaldatum: 4 mei 2016  
Factuurnummer: 16700506

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD326002016506	€ 468,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL41RBOS 056.999.6317 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93144, 2509 AC te 's Gravenhage.

**Van:** [REDACTED]  
**Verzonden:** dinsdag 17 mei 2016 11:18  
**Aan:** 'Info-zbo'  
**CC:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** RE: vraag bij aanvraag AVD326002016506  
**Bijlagen:** CCD - AVD326002016506.pdf

Geachte [REDACTED]

In de bijlage het antwoord op uw vraag betreffende het niet valide verklaren van een DTH diertest en herhaling .  
Mijn excuses voor de vertraging.

Met vriendelijke groet \ With kind regards,

[REDACTED]

[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED] | [REDACTED]  
[REDACTED]

[REDACTED]




---

**From:** Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]  
**Sent:** woensdag 11 mei 2016 14:22  
**To:** [REDACTED]  
**Cc:** [REDACTED]  
**Subject:** FW: vraag bij aanvraag AVD326002016506

Geachte [REDACTED]

Op onderstaande vraag hebben wij nog geen antwoord ontvangen. Uw antwoord is van belang om het juiste aantal dieren in de beschikking op te kunnen nemen wanneer de CCD een besluit heeft genomen.

Met vriendelijke groet [REDACTED]

**Centrale Commissie Dierproeven**  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

T: 0900 2800028  
 E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl) (let op: nieuw emailadres!)

---

**Van:** Info-zbo  
**Verzonden:** dinsdag 26 april 2016 9:32  
**Aan:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** vraag bij aanvraag AVD326002016506

Geachte [REDACTED]

U heeft een aanvraag tot projectvergunning gedaan, het betreft uw project "bepalen van immuniserend vermogen van BCG vaccin dmv Delayed Type of tuberculin" met aanvraag nummer AVD326002016506.

Bij de behandeling hebben wij nog een vraag. In de bijlage dierproeven beschrijft u de mogelijkheid dat een test invalide wordt verklaard. Wordt de batch vaccin dan ongeldig verklaard of herhaald u de test dan?

Heeft u bij het aanvragen van [REDACTED] rekening gehouden met een mogelijke noodzaak tot herhaling?

Met vriendelijke groet, [REDACTED]

**Centrale Commissie Dierproeven**

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

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

T: 0900 2800028

E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl) (let op: nieuw emailadres!)

---

[REDACTED]

# Memo

behandeld door

functie | afdeling

e-mail

doorkiesnummer

aan

– Centrale Commissie Dierproeven

**onderwerp**

Vraag bij projectvoorstel AVD3260020  
16506

**datum**

13-mei-2016

**blad**

1/1

Geachte ,

Via deze weg zou ik graag een toelichting willen geven op de vraag welke gesteld is door de CCD.

In de bijlage van projectvoorstel AVD326002016506 staat inderdaad omschreven dat een test tot een invalide resultaat zou kunnen leiden indien er een vals positieve reactie zichtbaar is. Een andere mogelijkheid welke zou kunnen leiden tot een niet-valide test is dat de gevormde meetbare reactie van batch A uit een nieuwe Working Seed Lot niet vergelijkbaar is met de referentie- batch.

In beide gevallen zal eerst overleg gepleegd worden met een Qualified Person (QP) van het bedrijf. Op basis hiervan kan het volgende worden besloten:

- Een herhaling van het dierexperiment (dit is het meest waarschijnlijke in het geval van een vals positieve uitslag) of
- Het afkeuren van de geproduceerde batch BCG, waarna een nieuwe batch wordt geproduceerd. In dit geval zal ook de diertest herhaald moeten worden.
- Het afkeuren van de Working Seed Lot. In dit geval zal de diertest op de betreffende batch niet herhaald worden, maar zal pas een nieuwe test ingezet worden wanneer er een nieuwe Working Seed Lot is gemaakt.

Bovenstaande gevallen zijn echter nog niet voorgekomen binnen de historie van dit product. De kans hierop is erg klein, maar niet volledig uit te sluiten. Mocht een dierexperiment toch herhaald moeten worden doordat er een invalide test is ontstaan, dan hebben we voldoende aan de aangevraagde DTH-testen binnen dit project.

Hopende hiermee voldoende toelichting te hebben kunnen geven.

Met vriendelijke groet,

**Centrale Commissie Dierproeven**

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

PD ALT/ Intravacc

Postbus 450  
3720 AL Bilthoven

**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD326002016506

**Uw referentie**

**Bijlagen**  
1

Datum 18 mei 2016  
Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 4 april 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Bepalen van immuniserend vermogen van BCG vaccin d.m.v. Delayed Type of tuberculin" met aanvraagnummer AVD326002016506. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 26 april 2016 hebben wij u om aanvullingen gevraagd: de vraag betrof het aantal tests dat u heeft aangevraagd en de mogelijkheid dat een test invalide wordt verklaard en herhaald moet worden. U heeft niet gereageerd op onze vraag. Op 11 mei 2016 hebben wij u nogmaals in de gelegenheid gesteld deze vraag te beantwoorden. Op 17 mei heeft u de vragen beantwoord.

**Beslissing**

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning. De algemene voorwaarde betreffende artikel 10, lid 1a van de wet wordt gesteld bij vergunningen met een langere looptijd. Dit om te voldoen aan datgene wat volgt uit dit artikel. U kunt met uw project "Bepalen van immuniserend vermogen van BCG vaccin d.m.v. Delayed Type of tuberculin" starten.

De vergunning wordt afgegeven van 18 mei 2016 tot en met 25 april 2021. De startdatum wijkt af van uw aanvraag omdat deze in het verleden ligt.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

**Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Alt gevoegd. Dit advies is opgesteld op 10 maart 2016. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie, nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Voor dit project moeten beide geslachten dieren gebruikt worden, per experiment wordt 1 geslacht gebruikt. Dit is vastgelegd in een specifieke voorwaarde. Deze voorwaarde

wordt niet expliciet gesteld in het advies aan de CCD maar het voorstel wordt wel beschreven in de beoordeling van de DEC. Daarom is het stellen van deze voorwaarde niet afwijkend van het DEC advies.

Daarnaast wordt de algemene voorwaarde over het beschikbaar komen van alternatieven gesteld. Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

### **Bezwaar**

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

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

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

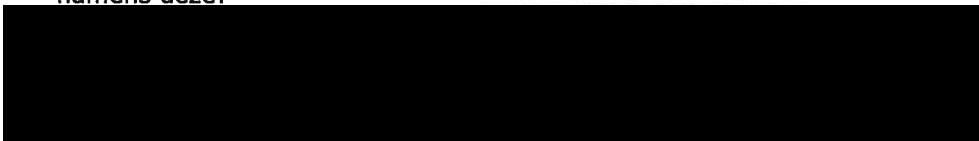
Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige voorziening vragen bij de Voorzieningenrechter van de rechtbank in de woonplaats van de aanvrager. U moet dan wel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

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

### **Meer informatie**

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

De Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:

  
Ir. G. de Peuter  
Algemeen Secretaris

Dit besluit is genomen met inachtneming van het Besluit mandaat, volmacht en machtiging van de Centrale Commissie Dierproeven CCD 2014 zoals de Centrale Commissie Dierproeven heeft vastgesteld op 19 december 2014, ref 2014-04 en is gepubliceerd in de Staatscourant van 2 januari 2015, Nr. 163

Bijlagen

- Vergunning

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



## Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: PD ALT/ Intravacc  
Adres: Postbus 450  
Postcode en woonplaats: 3720 AL Bilthoven  
Deelnemersnummer: 32600

deze projectvergunning voor het tijdvak 18 mei 2016 tot en met 25 april 2021, voor het project "Bepalen van immuniserend vermogen van BCG vaccin d.m.v. Delayed Type of tuberculin" met aanvraagnummer AVD326002016506, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC ALT. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Onderzoeksmedewerker.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 4 april 2016
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 4 april 2016;
  - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 4 april 2016;
  - c. Advies van Dierexperimentencommissie dd 10 maart 2016, ontvangen op 4 april 2016;
  - d. De aanvullingen op uw aanvraag zoals ontvangen op 17 mei 2016.

### Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst
Bepaling van immunostimulerend vermogen van de eerste batch BCG vaccin voor blaasinstillatie, geproduceerd vanuit een nieuwe Working Seed lot dmv Delayed type of tuberculin Hyper (DTH) reactivity test.	Cavia's (Cavia porcellus) / bij aanvang van de test wegen de cavia's tussen de 250 en 350 gram	30	Licht

### Voorwaarden

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

Per individueel experiment worden dieren van 1 geslacht ingezet. De onderzoeker verdiept zich in de mogelijkheden tot het sociaal huisvesten van mannelijke cavia's. Wanneer bij het eerste experiment met mannelijke dieren blijkt dat de dieren elkaar beschadigen waardoor de huidreactie niet goed meer af te lezen is worden de dieren vanaf dat moment individueel gehuisvest. Wanneer dit zich voordoet volgt een terugkoppeling naar de CCD om voor vervolg experimenten mogelijk alleen vrouwelijke dieren in te zetten.

In artikel 10, lid 1a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is.



**Datum**

18 mei 2016

**Onze referentie**Aanvraagnummer  
AVD326002016506

Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning.

Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

**Datum**

18 mei 2016

**Onze referentie**Aanvraagnummer  
AVD326002016506

## **Weergave wet- en regelgeving**

### **Dit project en wijzigingen**

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

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

### **Verzorging**

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

In artikel 9 staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn.

In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.

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

### **Pijnbestrijding en verdoving**

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdoving wordt uitgevoerd tenzij dat niet mogelijk is, dan wel bij het verrichten van een dierproef worden pijnstillers toegediend of andere goede methoden gebruikt die de pijn, het lijden, de angst of de blijvende schade bij het dier tot een minimum beperken. Een dierproef die bij het dier gepaard gaat met zwaar letsel dat hevige pijn kan veroorzaken, wordt niet zonder verdoving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdoving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdoving onverenigbaar is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

### **Einde van een dierproef**

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

zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.

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

Uit artikel 13c 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 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.