

	Inventaris Wob-verzoek W15-08								
		wordt verstrekt			weigeringsgronden				
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTSAVD2015111, De rol van groeifactoren in botregeneratie implantaten								
1	aanvraagformulier				x		x		
2	aanvullende informatie				x		x		
3	acceptatiebrief				x		x		
4	acceptatiebrief aangepast				x		x		
5	antwoord op vragen CCD				x	x	x	x	
6	beschikking				x		x	x	
7	Bijlage beschrijving dierproeven 1				x	x			
8	Bijlage beschrijving dierproeven 2				x	x			
9	Bijlage beschrijving dierproeven 3				x	x		x	
10	bijlage flowchart			x					
11	brief correspondentiegegevens				x		x	x	
12	DEC advies				x		x	x	
13	factuur				x		x		
14	NTS	x							
15	ontvangstbevestiging				x		x		
16	projectvoorstel				x	x		x	
17	vergunning				x		x		
18	mailwisseling factuurgegevens dd 6-5-2015				x		x		
19	mail aanvullende informatie dd 2-6-2015				x		x		
20	mail acceptatiebrief dd 7-5-2015				x		x		
21	interne mail over dubbele betaling		x						x
22	dubbele betaling melding naar aanvrager dd 9-6-'15				x		x		
23	mail factuur dd 6-5-2015				x		x		
24	mail factuur dd 6-5-2015				x		x		
25	mail betreft vragen 2 dd 7-5-2015				x		x		
26	mail betreft vragen 1 dd 7-5-2015				x		x		
27	mail betreft vragen 3 dd 6-5-2015				x		x		
28	Mail terugkoppeling beslissing aan DEC dd 12-6-'15				x		x		
29	advies secretariaat aan CCD		x						x



1

Aanvraag

Projectvergunning Dierproeven

Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- | | | | | |
|-----|--|-------------|---|---|
| 3.1 | Wat is de geplande start- en einddatum van het project? | Startdatum | - | - |
| | | Einddatum | - | - |
| 3.2 | Wat is de titel van het project? | | | |
| 3.3 | Wat is de titel van de niet-technische samenvatting? | | | |
| 3.4 | Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt? | Naam DEC | | |
| | | Postadres | | |
| | | E-mailadres | | |

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.	☐ 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

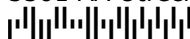
5.1	Welke bijlagen stuurt u mee?	Verplicht
		☐ Projectvoorstel
		☐ Niet-technische samenvatting
		Overige bijlagen, indien van toepassing
		☐ Melding Machtiging
		☐

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:	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.										
	Centrale Commissie Dierproeven Postbus 20401 2500 EK Den Haag	<table> <tr> <td>Naam</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Plaats</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Datum</td> <td>- -</td> </tr> <tr> <td>Handtekening</td> <td></td> </tr> </table>	Naam		Functie		Plaats		Datum	- -	Handtekening	
Naam												
Functie												
Plaats												
Datum	- -											
Handtekening												



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht
Prof. dr. F. Miedema
t.a.v. Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht
Postbus 12007
3501 AA Utrecht


**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.zbo-ccd.nl

T 0900-28 000 28 (10 ct /min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD115002015111

Datum 2 juni 2015
Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

Bijlagen
1

Geachte ,

Op 30 april 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'The role of osteogenic growth factors in bone replacement constructs' met aanvraagnummer AVD115002015111. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

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

Onduidelijkheden

In uw aanvraag geeft u aan gebruik te maken van zowel konijnen als ratten. Voor konijnen gaat u zowel mannelijke als vrouwelijk dieren gebruiken, terwijl voor ratten alleen mannelijke dieren gebruikt gaan worden. De onderbouwing voor de keuze om alleen mannelijke ratten te gebruiken ontbreekt. De commissie zou graag een goed onderbouwde motivering voor uw keuze willen ontvangen.

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

Opsturen binnen veertien dagen

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via NetFTP. Stuurt u het per post op, gebruik dan het formulier dat u bij deze brief krijgt.

Wanneer een beslissing

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

Meer informatie

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

Datum

2 juni 2015

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD115002015111

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlage:

- formulier Melding Bijlagen via de post



Melding

Bijlagen via de post

- U wilt één of meerdere bijlagen naar ons versturen? Voeg *altijd* deze Melding Bijlagen toe. Wij weten dan welke documenten van u zijn en hoeveel documenten u opstuurt.
- Meer informatie vindt u op www.zbo-ccd.nl
- Of bel met ons: 0900 28 000 28 (10 ct/min).

1 Uw gegevens

- 1.1 Vul de gegevens in.
- | | | | |
|----------------|--|------------|--|
| Naam aanvrager | | | |
| Postcode | | Huisnummer | |
- 1.2 Bij welke aanvraag hoort de bijlage?
Het aanvraagnummer staat in de brief of de ontvangstbevestiging.
- | | | | |
|----------------|--|--|--|
| Aanvraagnummer | | | |
|----------------|--|--|--|

2 Bijlagen

- 2.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
- | | |
|--------------------------|--|
| ☐ | |
| ☐ | |
| ☐ | |
- Vul de naam of omschrijving van de bijlage in.*

3 Ondertekening

- 3.1 Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:
- | | | | |
|--------------|---|---|----|
| Naam | | | |
| Datum | - | - | 20 |
| Handtekening | | | |
- Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht



Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

www.zbo-ccd.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD115002015111

Datum

Betreft Vervolg Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw 

Op 30 april 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project The role of osteogenic growth factors in bone replacement constructs. met aanvraagnummer AVD115002015111. Uw aanvraag wordt in behandeling genomen. In deze brief leest u wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Wanneer een beslissing

Wij nemen uiterlijk 25 juni 2015 een beslissing. Als wij nog informatie nodig hebben, kan dit later worden. Voor een complexe aanvraag staat een langere termijn. In beide gevallen ontvangt u daarover bericht. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.zbo-ccd.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.

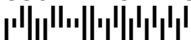
Bijlagen:

- Machtigingsformulier



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht

t.a.v. IvD Utrecht
Postbus 12007
3501 AA UTRECHT


**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD115002015111

Datum 7 mei 2015
Betreft Vervolg Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 

Op 30 april 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project The role of osteogenic growth factors in bone replacement constructs. met aanvraagnummer AVD115002015111. Uw aanvraag wordt in behandeling genomen. In deze brief leest u wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Wanneer een beslissing

Wij nemen uiterlijk 25 juni 2015 een beslissing. Als wij nog informatie nodig hebben, kan dit later worden. Voor een complexe aanvraag staat een langere termijn. In beide gevallen ontvangt u daarover bericht. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.zbo-ccd.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.



Melding

Bijlagen via de post

- U wilt één of meerdere bijlagen naar ons versturen? Voeg *altijd* deze Melding Bijlagen toe. Wij weten dan welke documenten van u zijn en hoeveel documenten u opstuurt.
- Meer informatie vindt u op www.zbo-ccd.nl
- Of bel met ons: 0900 28 000 28 (10 ct/min).

1 Uw gegevens

1.1 Vul de gegevens in.

Naam aanvrager

Postcode

3501 AA

Huisnummer

50

1.2 Bij welke aanvraag hoort de bijlage?

Het aanvraagnummer staat in de brief of de ontvangstbevestiging.

Aanvraagnummer

AVD 115002015 III

2 Bijlagen

2.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Vul de naam of omschrijving van de bijlage in.



Antwoord gestelde vraag "CCD uitleg"

3 Ondertekening

3.1 Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:

Naam

Datum

Handtekening

09-06-2015

Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

CCD uitleg aanvraag 04-06-2015

Ratten algemeen

Om het aantal gebruikte dieren zo laag mogelijk te houden is een model gewenst waarbij de variatie van botvorming tussen de dieren zo laag mogelijk is. De oestrogeen spiegel in vrouwelijke ratten kan sterk fluctueren onder invloed van stress en leeftijd.(1) Van oestrogeen is aangetoond dat het de bot vorming kan beïnvloeden en zelfs de potentie heeft om botregeneratie te bevorderen.(2, 3) Om deze potentiële oncontroleerbare invloeden te vermijden worden mannelijke ratten geprefereerd in de voorgestelde studies.

Bovendien is aangetoond dat er een verschil is in de hoeveelheid botvorming tussen mannelijke en vrouwelijke dieren. Als deze samen in een studie worden gebruikt, zal de verwachte variatie in botvorming sterk toenemen (4,5)

Mannelijke ratten kunnen daarnaast met meerdere dieren in een kooi gehuisvest worden.

Onderstaand volgt aanvullende uitleg per model.

12 week old – male Harlan Sprague Dawley rats

Dit mannelijke rattenmodel is gevalideerd in voorgaande experimenten voor het onderzoeken van BMP-2 farmacokinetiek. (6,7) Ook hebben wij verschillende BMP-2 afgifte profielen van [REDACTED] aangetoond in mannelijke Sprague Dawley ratten. (nog niet gepubliceerde data) Het voorgestelde onderzoek gebruikt deze gegevens om de correlatie tussen BMP-2 afgifte profielen en bot formatie aan te tonen tijdens nieuwe tijdstippen en omstandigheden. Voor onderzoek naar BMP-2 farmacokinetiek in andere (vrouwelijke of gecombineerde) modellen zal opnieuw validatie nodig zijn.

Voorgaand onderzoek heeft aangetoond dat BMP-2 farmacokinetiek van subcutane implantaten vergelijkbaar is met orthotopische implantaten.(7) Dit biedt de unieke mogelijkheid om BMP-2 farmacokinetiek te correleren met botformatie in een botdefect model. Hiervoor is het gebruik van mannelijke Sprague Dawley ratten, waarin de farmacokinetiek van BMP-2 is bewezen, evident. [REDACTED]

12 week old – Fischer 344 Inbred Rat

Mannelijke Fisher 344 ratten zijn een van de meest gebruikte modellen voor studies naar botregeneraties (1985-nu). Er is derhalve veel kennis over botvorming in mannelijke dieren. (8-10)

In voorgaand werk (niet gepubliceerd) hebben we een pilot studie met mannelijke Fisher 344 ratten gedaan als voorbereiding op deze studie. Om variatie in uitleesparameter te reduceren (zoals hierboven beargumenteerd) en de verschillen tussen voorgaande studies en deze studie te minimaliseren hebben we ervoor gekozen exact het zelfde diermodel te gebruiken. De Fischer 344 ratten zijn, in tegenstelling tot de Sprague Dawley ratten, inteelt ratten en wat syngene transplantatie van cellen mogelijk maakt. Het is gebleken dat bij het gebruik van allogene MSCs van inteelt ratten, in vivo botvorming niet plaats vindt (11).

1. Arakawa K, Arakawa H, Hueston CM, Deak T. Effects of the estrous cycle and ovarian hormones on central expression of interleukin-1 evoked by stress in female rats. *Neuroendocrinology*. 2014;100(2-3):162-77. PubMed PMID: 25300872.

2. Hong L, Sultana H, Paulius K, Zhang G. Steroid regulation of proliferation and Biochem Mol Biol. 2009 Apr;114(3-5):180-5. PubMed PMID: 19429449. Pubmed Central PMCID: 2682591.
3. Calis M, Demirtas TT, Atilla P, Tatar I, Ersoy O, Irmak G, et al. Estrogen as a novel agent for induction of adipose-derived mesenchymal stem cells for osteogenic differentiation: in vivo bone tissue-engineering study. Plastic and reconstructive surgery. 2014 Apr;133(4):499e-510e. PubMed PMID: 24675202.
4. Sample SJ, Racette MA, Hao Z, Thomas CF, Behan M, Muir P. Functional adaptation in female rats: the role of estrogen signaling. PloS one. 2012;7(9):e43215. PubMed PMID: 22984413. Pubmed Central PMCID: 3439425.
5. Strube P, Mehta M, Baerenwaldt A, Trippens J, Wilson CJ, Ode A, Perka C, Duda GN, Kasper G. Sex-specific compromised bone healing in female rats might be associated with a decrease in mesenchymal stem cell quantity. Bone. 2009 Dec;45(6):1065-72
6. Kempen DH, Lu L, Hefferan TE, Creemers LB, Maran A, Classic KL, et al. Retention of in vitro and in vivo BMP-2 bioactivities in sustained delivery vehicles for bone tissue engineering. Biomaterials. 2008 Aug;29(22):3245-52. PubMed PMID: 18472153. Pubmed Central PMCID: 2577841. Epub 2008/05/13.
7. Kempen DH, Yaszemski MJ, Heijink A, Hefferan TE, Creemers LB, Britson J, et al. Non-invasive monitoring of BMP-2 retention and bone formation in composites for bone tissue engineering using SPECT/CT and scintillation probes. Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society. 2009 Mar 19;134(3):169-76. PubMed PMID: 19105972. Epub 2008/12/25.
8. D'Mello S, Elangovan S, Hong L, Ross RD, Sumner DR, Salem AK. Incorporation of copper into chitosan scaffolds promotes bone regeneration in rat calvarial defects. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2014 Sep 17. PubMed PMID: 25230382. Pubmed Central PMCID: 4363304.
9. Durbin SM, Jackson JR, Ryan MJ, Gigliotti JC, Alway SE, Tou JC. Resveratrol supplementation influences bone properties in the tibia of hindlimb-suspended mature Fisher 344 x Brown Norway male rats. Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme. 2012 Dec;37(6):1179-88. PubMed PMID: 23050779.
10. Nishimoto SK, Chang CH, Gendler E, Stryker WF, Nimni ME. The effect of aging on bone formation in rats: biochemical and histological evidence for decreased bone formation capacity. Calcified tissue international. 1985 Dec;37(6):617-24. PubMed PMID: 3937585.
11. Sempuku T, Ohgushi H, Okumura M, Tamai S. Osteogenic potential of allogeneic rat marrow cells in porous hydroxyapatite ceramics: a histological study. J Orthop Res. 1996 Nov;14(6):907-13.

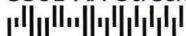
**Centrale Commissie Dierproeven**

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht

Postbus 12007

3501 AA Utrecht

**Centrale Commissie Dierproeven**

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl

T 0900-2800028 (10 ct /min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD115002015111

Datum 12 juni 2015
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning dierproeven

Bijlagen
1

Geachte [REDACTED]

Op 30 april 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'The role of osteogenic growth factors in bone replacement constructs' met aanvraagnummer AVD115002015111. 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 'The role of osteogenic growth factors in bone replacement constructs' starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 juli 2015 tot en met 30 juni 2017.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de dierexperimentencommissie DEC Utrecht gevoegd. 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. Wij nemen dit advies van de commissie over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet 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.zbo-ccd.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

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 deeluitmakend: - DEC-advies
 - Weergave wet en regelgeving



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.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11500	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	UMC Utrecht	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		1	subcutaneous ratmodel

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.

Specific aim 1: Correlate BMP-2 release profiles with early and late tissue formation

- Describe early responses for the designed constructs and correlate the differences to the various release profiles.
- Integrate early tissue response information (enhancement factors) in new bone construct design.
- Select most effective BMP-2 pharmacokinetic profile for in vivo bone formation.

Aim 2: Translate BMP gene therapy to rat ectopic bone formation

- a. Assess effectivity of BMP gene delivery at ectopic site
- b. Define optimal conditions with respect to construct composition

Aim 1

A pharmacokinetic study already confirmed that the BMP-2 incorporation/absorption in the different hydrogel/scaffold components results in different in vivo release profiles in a subcutaneous rat model. The subcutaneous rat model will also be used to compare the effect of different in vivo BMP-2 release profiles on the early tissue response. The scaffolds will be implanted bilateral subcutaneously in the thoracolumbar area up to two weeks. The early phase tissue response is very important for understanding the mechanism of BMP-2 on bone formation and isolating BMP-2 enhancement or inhibition factors. Therefore two early time points are selected for this study. Rats will receive multiple subcutaneous implants which will be analysed at within the first two weeks. Since the scaffolds are small (cylinders with an estimated length of 6 mm and a diameter of 3 mm), duplicates are implanted to allow investigation of both the cellular response by histology and the gene expression profiles of the recruited cells. The effect of BMP-2 is very local and will not affect other study conditions in the rat. Negative control conditions used to confirm this. Implantation of all study conditions in the same animal allows for paired measurements of the outcome parameters. With a randomised block design (also known as a "within-subject" design) the animal effect can be excluded as a variable in the statistical analysis, which leads to a reduction in the animals needed.

Overview of ectopic study conditions early tissue response (samples are implanted in a randomized manner)

- 1. Burst release group: [REDACTED] with empty microspheres and BMP-2 absorbed into the hydrogel
- 2. 50% burst release and 50% sustained release group: [REDACTED]
- 3. Sustained release group: [REDACTED] in microspheres
- 4. Control groups:
 - a. collagen sponge with BMP-2 absorbed into the sponge (this is the clinical BMP-2 product and will be the positive control)
 - b. non-loaded [REDACTED] (negative control)

Outcome parameters:

In vivo tissue response and bioactivity is determined by histology, immunohistochemistry, molecular biology techniques for gene expression such as polymerase chain reaction (PCR) and μ CT (bone volume).

Aim 2

The aim is investigated by comparing different cell sources as a target cell for BMP-2 gene therapy. We want to compare MSCs with other potential target cell types in their ability to induce bone formation in vivo. Furthermore, to improve BMP-2 gene therapy, a combination can be made with other genes, such as BMP-4, BMP-6, BMP-7 (OP-1) and BMP-9. These are genes that are upregulated during fracture healing, and have shown in our in vitro work to improve osteogenic differentiation of MSCs.

In this screening study, several conditions will be tested:

Three different target cell types.

BMP-2 gene, and BMP-2 gene in combination with other potential genes.

This will result in ten different conditions.

A small animal screening model is mostly suited for this. A subcutaneous rat model with multiple implantations per animal (10 subcutaneous implants per rat) is the most effective, as it allows for paired measurements (in a randomized block design), resulting in a reduction of the animals needed, as explained above. From previous work we know that the groups will not affect each other, as BMPs are degraded quickly in the bloodstream. Positive and negative controls are included.

Outcome parameters:

Fluorochrome labels will be administered after 3 and 6 weeks of implantation. The implants will be removed after 9 weeks of implantation to evaluate the bone formation by histology.

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.

Animal procedures

The rats are allowed to acclimatize for 1 week before the start of the experiment.

Anesthesia protocols

All operations will be performed under general anesthesia. For induction, isoflurane will be used. During the surgical procedures, isoflurane is used for adequate anesthesia. Analgesia is provided by subcutaneous injection of pain medication (usually buprenorphine) minimum of 2h before surgery.

Pain management

Pre operative and post-operative analgesia is provided by subcutaneous injections of analgetics (usually buprenorphine) minimum of 2h before surgery and twice a day for 72 hrs post-operatively.

Antiseptic techniques

All operations will be performed aseptically conditions. The surgeon will wear scrubs, sterile gloves and sterile gown. After shaving, the skin will be disinfected with Iodine and surgical site will be draped. To reduce perioperative infection risk, all rats receive antibiotic prophylaxis.

Surgical technique subcutaneous implants in rats (1,2) (estimated duration: 0,5h)

The rats will undergo the surgical procedure once. After shaving, disinfecting and sterile draping, small skin incisions are made in the thoracolumbar area. At each site, a subcutaneous pocket is created and filled with one implant. The skin is sutured using resorbable sutures.

Postoperative care

The animals are postoperatively treated with the analgesic as previously described and housed together at the animal facilities of the Central Laboratory Animal Institute at the University of Utrecht. The animals will be placed under heat lamps post operatively. The rats will be returned to social housing after they have recovered from anesthesia and maintained on rodent chow and water ad libitum.

Euthanasia protocols

The rats will be euthanized according to one of the methods listed in Appendix IV of directive 2010/63/EU (usually by an overdose of CO2 inhalation), after which the implants are retrieved. The analysis of the outcome parameters will be done post-mortem.

1. DHR Kempen, L.Lu, TE Hefferan, L Creemers, A Maran, KL Classic, WJA Dhert and MJ Yaszemski, "Retention of in vitro and in vivo BMP-2 bioactivity in sustained delivery vehicles for bone tissue engineering," Biomaterials 2008:29:3245-52

2. DHR Kempen, L.Lu, KL Classic, TE Hefferan, L Creemers, A Maran, WJA Dhert and MJ Yaszemski, "Non-invasive screening method for simultaneous evaluation of in vivo growth factor release profiles from multiple ectopic bone tissue engineering implants," Journal of Controlled Release 2008:130:15-21

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

Male Harlan Sprague Dawly rats

Aim 1. Describe early responses for the designed constructs and correlate the differences to the various release profiles.

To show a relevant difference in bone volume (primary outcome) a minimum number (n) of 10 is estimated based on a power analysis and previous research. Furthermore multiple conditions are implanted in one animal to reduce the amount of animals needed.

Taken together, we estimate that 20 rats are needed.

Male Fischer 344 (IcoCrI)

Aim 2. Assess effectivity of BMP gene delivery at ectopic sites

To show a relevant difference in bone volume (primary outcome) a minimum number (n) of 15 is estimated. Based on previous work in the F344 model with BMP-2, the expected difference in means between conditions is lower than aim 1, furthermore more comparisons are made, therefore the alpha is adjusted.

Therefore based on a power analysis a higher n is calculated. As stated before multiple conditions are implanted in one animal to reduce the amount of animals needed.

Taken together, we estimate that 15 rats are needed

B. De dieren

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

Species, origin, estimated numbers, life stages

Aim 1: 12 week old - Male Harlan Sprague Dawly rats will be used (outbred strain). This rat model has proven to be very good and efficient screening model for evaluation of BMP-2 pharmacokinetics (1,2).

20 Rats are needed

Aim 2: 12 week old - Male Fischer 344 (IcoCrI), 6-12 weeks will be used (inbred strain). The Fischer 344 rats have been chosen as an animal model as they are inbred, and have allowed for the syngeneic transplantation of bone marrow derived stem cells between different rats without rejection (3). As explained in the 'coherence' part of the project proposal: BMP induced osteogenesis is comparable between subjects.

15 Rats are needed

Number total

35, See justification statistical method

Species, origin, life stages explanation

Release parameters of the OPF BMP2 construct investigated by our group were proven for this animal species, gender and stock. Identical conditions are needed to further investigate the BMP-2 pharmacokinetics.

1. DHR Kempen, L.Lu, TE Hefferan, L Creemers, A Maran, KL Classic, WJA Dhert and MJ Yaszemski, "Retention of in vitro and in vivo BMP-2 bioactivity in sustained delivery vehicles for bone tissue engineering," Biomaterials 2008:29:3245-52
2. DHR Kempen, L.Lu, KL Classic, TE Hefferan, L Creemers, A Maran, WJA Dhert and MJ Yaszemski, "Non-invasive screening method for simultaneous evaluation of in vivo growth factor release profiles from multiple ectopic bone tissue engineering implants," Journal of Controlled Release 2008:130:15-21
3. Chatterjea et al. Suppression of the immune system as a critical step for bone formation from allogeneic osteoprogenitors implanted in rats. Cell Mol Med. 2014.

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

There are in this stage no relevant in vitro options available to study bone formation in a biomaterial for bone regeneration and preclinical studies are required to develop safe regenerative medicine strategies for human applications.

Reduction

By combining the rat femoral defect study with additional subcutaneous implants, the animals are used to make an efficient comparison of various

parameters. See statistics for the justification.

Refinement

- Animals will be given 1 week to acclimatize to their new environment.
- Eye ointment will be used to prevent dry eyes during surgery.
- During and after surgery the animals will be placed on heat mats.
- The rats will receive adequate anesthetics to prevent harm during surgery.
- Analgesia medication will be administered till 3 days after surgery to prevent harm post-operatively.
- Resorbable sutures will be used to minimize irritation post operatively
- In vivo bone formation analysis will be done under adequate anesthesia and this narcosis will also be used for administration of the fluorochrome markers in the same session.
- Follow up will be daily for one week after surgery, after that a minimum of one time weekly.

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 rats will have 1 week to acclimatize a to the new environment before surgery. We will observe respiration continuously during surgery. The animals will be placed under heat lamps post operatively. The rats will be returned to routine housing after they have recovered from anesthesia and maintained on rodent chow and water ad libitum. Unrestricted weight bearing and activity will be allowed post-op. For specific information see refinement.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

Niet van toepassing

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

☒ Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

☒ 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?

The rats will be housed conform the standards of the animal lab. They will be housed in groups of two. If the acclimatization period points out non-desired circumstances like aggression the rats will be housed separately. Food and water will be given ad libitum.

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. Pre-operative: Light stress during pain medication and induction of anaesthesia.
2. Light stress postoperatively after subcutaneous implantation with adequate pain medication.
3. Light stress during CO2 intoxication.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

All described measurements are needed to create the least harm for the animals and most secure outcomes for this project.

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

1. 1 week to acclimatize to new environment before surgery. Adequate use of isoflurane.
2. Adequate pain medication.
3. Follow protocol for CO2 intoxication euthanasia

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.

Rats will be closely monitored on general well being. If abnormalities are observed, the veterinarian will be consulted, and based on the severity of discomfort the animal will be euthanised.

Seldomly, after implantation, a local infection of the implant occurs. This is considered a human endpoint, as animal well being is negatively affected and outcome measurements are not trustworthy anymore.

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

The probability is very low. (<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 procedure is classified as mild (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.

The rats need to be euthanized to harvest the scaffolds for immunohistochemistry, histology and gene expression of the recruited cells (endpoints project).

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.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11500	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	UMC Utrecht	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		2	Subcutaneous + orthotopic rat 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.

In this part two animal experiments are described in which the same procedure will be used. In total 125 rats (two strains) are needed for this part: Every animal will receive the same procedure:

1. A six millimeter femoral defect (orthotopic defect), in which bone graft substitute material is investigated.
2. To make optimal use of the animals, without significantly more harm, six subcutaneous pockets are created in each animal in which different conditions will be compared. These samples will be implanted in a randomized manner.

The following aims will be investigated in the model described above:

Aim 1

Correlate BMP-2 release profiles with early tissue responses and late bone formation.

- a. Select most effective BMP-2 pharmacokinetic profile for in vivo bone formation.
- b. Describe early responses for the constructs with various release profiles.
- c. Integrate the knowledge from the first s.c. rat study on early tissue response information by several enhancement factors in new bone construct design.

Orthotopic defect:

Since osteoconduction and periosteal bone formation are important factors that influence bone formation, several BMP-2 release profiles will be compared in an orthotopic site in 80 rats. To determine the efficiency of the different release profiles to heal the critical sized defect, 2 dosages will be tested for each implant.

Ectopic defect:

To compare the bone formation at an orthotopic and ectopic location, one subcutaneous site will receive a construct with identical composition as implanted in the femoral defect. The other 5 locations will be used to further improve our understanding of in vivo BMP-2 induced bone regeneration in the OPF constructs. These samples will be studied using a randomized design. Since we calculated that a sample size of $n=10$ will be sufficient to determine differences between the groups, a total of 8 enhancement/inhibitory factors can be investigated in the 80 rats needed for the orthotopic study.

Outcome:

In vivo bone formation will be measured by microCT analysis at 3 time-points after implantation. Fluorochrome labels will be administered at 2 time-points after implantation to evaluate the onset of bone formation. The implants will be removed within 10 weeks after implantation to quantify bone formation by histology and μ CT.

Overview of orthotopic study (femoral defect) conditions, late tissue response

Overview of subcutaneous (ectopic) study conditions, late tissue response. These constructs will be implanted in a randomized manner.

1. Study condition implanted in the rat femoral defect
2. OPF + BMP-2 alone
3. OPF + BMP-2 + Enhancement/inhibition factor (type of enhancement or inhibition factor is based on the results of early tissue response study)

4. [REDACTED]
[REDACTED]

6. collagen sponge with BMP-2 absorbed (this is the clinical BMP-2 product and will be the positive control)

Aim 2

Based on the results of the first experiment (subcutaneous screenings model), conditions will be chosen (see flowchart; Aim 2). The primary outcome measurement will be orthotopic bone formation as a result of non-viral gene therapy in optimized conditions. We estimate that based on the previous study, we will have at least three candidates for further testing in the orthotopic environment. With the proper positive control and negative control this makes 5 study conditions. Estimated number of animals for 5 study conditions is a total of 45 rats.

To further develop the non-viral gene delivery technology, bone replacement constructs will be optimized in subcutaneous locations. Variables are concentration of construct components, such as type and concentration of hydrogel used. These components are expected to influence the process of bone formation and therefore cannot be properly tested in vitro. To reduce the number of animals needed, multiple implant locations per animal will be used. Apart from the femoral defect, each rat will receive 6 subcutaneous implants in the thoracolumbar area.

Outcome:

In vivo bone formation will be measured by microCT analysis at 3 time-points after implantation. Fluorochrome labels will be administered at 2 timepoints after implantation to establish the onset of bone formation. The implants will be removed within 10 weeks after implantation to evaluate the bone formation by histology and μ CT.

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.

Animal procedures

The rats are allowed to acclimatize before the start of the experiment.

Anesthesia protocol

All operations will be performed under general anesthesia. For induction, isoflurane will be used. During the surgical procedures, isoflurane is used for adequate anesthesia. Analgesia is provided by a subcutaneous injection of pain medication (usually buprenorphine), minimum of 2h before surgery.

Pain management

Pre operative and post-operative analgesia is provided by subcutaneous injections of analgetics (usually buprenorphine) minimum of 2h before surgery and twice a day for 72 hrs post-operatively.

Antiseptic techniques

All operations will be performed aseptically conditions. The surgeon will wear scrubs, sterile gloves and sterile gown. After shaving, the skin will be disinfected with Iodine and surgical site will be draped. To reduce perioperative infection risk, all rats receive antibiotic prophylaxis.

Surgical technique femoral defect & subcutaneous implants (1-3)

The surgical procedure is describe in detail previously (see reference 1). In short: the femur is exposed through a lateral incision of the skin and division of the underlying fascia. A plate is fixed to the anterolateral side of the femur. Screws are used to fix a plate on the femur, subsequently a 6 mm long bone segment is removed, and the bone substitute is placed press-fit into the defect site. After insertion of the implant into the defect, the fascia and skin are sutured in layers using resorbable sutures.

Furthermore small skin incisions are made in the thoracolumbar area to create subcutaneous pockets in which the s.c. implants are placed. This is the same procedure as in animal form 1.

Postoperative care

The animals are postoperatively treated with the analgesic as previously described and housed together at the animal facilities of the Central Laboratory Animal Institute at the University of Utrecht. The animals will be placed under heat lamps postoperatively. The rats will be returned to social housing after they have recovered from anaesthesia and maintained on rodent chow and water ad libitum. Unrestricted weight bearing and activity will be allowed post-op.

Bone regeneration measurements.

For the in vivo bone formation analysis by microCT, the rats are sedated using isoflurane. The rats will be scanned twice after implantation. Post mortem, the final scan will be made. Furthermore, the rats will receive fluorochrome markers at 2 timepoints postoperatively.

Euthanasia protocols

The rats will be euthanized according one of the methods listed in appendix IV of directive 2010/63/EU (usually an overdose of CO₂ inhalation) after which the implants are retrieved

1. DHR Kempen, L.Lu, TE Hefferan, L Creemers, A Maran, KL Classic, WJA Dhert and MJ Yaszemski, "Retention of in vitro and in vivo BMP-2 bioactivity in sustained delivery vehicles for bone tissue engineering," Biomaterials 2008:29:3245-52
2. DHR Kempen, L.Lu, KL Classic, TE Hefferan, L Creemers, A Maran, WJA Dhert and MJ Yaszemski, "Non-invasive screening method for simultaneous evaluation of in vivo growth factor release profiles from multiple ectopic bone tissue engineering implants," Journal of Controlled Release 2008:130:15-21
3. J. van der Stok, M.K.E. Koolen, H. Jahr, N. Kops, J.H. Waarsing, H. Weinans and O.P. van der Jagt, "chondrogenically differentiated mesenchymal stromal cell pellets stimulate endochondral bone regeneration in critical-sized bone defects", european cells and materials (2014), 27, 137-148

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

A power analysis is performed; furthermore the amount of animals is calculated for the orthotopic defects, as the subcutaneous implants are less. To show a relevant difference in histology scoring, immunochemistry scoring and bone volume (μ CT) a minimum number (n) of 10 is estimated.

Aim 1. To determine the effect of BMP-2 release and dosage on bone regeneration in a critical sized rat segmental bone defect

Orthotopic implants: 8 study conditions * 10 (n) = 80 implants

Calculation: 80 implants / 1 implant site per rat = 80 rats in total.

Aim 2. To determine the effect of non-viral BMP-2 gene therapy on bone formation in a critical sized rat segmental bone defect.

Orthotopic implants: 5 study conditions * 10 (n) = 50 implants

Calculation: 50 implants / 1 implant site per rat = 50 rats in total.

Total animal number

Since the rats will receive 1 femoral defect implant and 6 subcutaneous implants, a total of (80 + 50) rats are needed.

Previous research has shown a 10% drop out rate using the described methods. Therefore a total number of $88 + 55 = 143$ (aim 1 + aim 2) is asked.

B. De dieren

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

Species, origin, estimated numbers, life stages

Aim 1: 12 week old - Male Harlan Sprague Dawley rats will be used (outbred strain). This rat model has proven to be very reliable and efficient screening model for evaluation of BMP-2 pharmacokinetics (1,2).

88 Rats are needed

Aim 2: 12 week old - Male Fischer 344 (IcoCrI), 6-12 weeks will be used (inbred strain). The Fischer 344 rats have been chosen as an animal model as they are inbred, and have allowed for the syngeneic transplantation of bone marrow derived stem cells between different rats without rejection (3). As explained in the 'coherence' part of the project proposal: BMP induced osteogenesis is comparable between subjects.

55 Rats are needed

Number total

143, See justification statistical method

1. DHR Kempen, L.Lu, TE Hefferan, L Creemers, A Maran, KL Classic, WJA Dhert and MJ Yaszemski, "Retention of in vitro and in vivo BMP-2 bioactivity in sustained delivery vehicles for bone tissue engineering," Biomaterials 2008:29:3245-52

2. DHR Kempen, L.Lu, KL Classic, TE Hefferan, L Creemers, A Maran, WJA Dhert and MJ Yaszemski, "Non-invasive screening method for simultaneous evaluation of in vivo growth factor release profiles from multiple ectopic bone tissue engineering implants," Journal of Controlled Release 2008:130:15-21

3. Chatterjea et al. Suppression of the immune system as a critical step for bone formation from allogeneic osteoprogenitors implanted in rats. Cell Mol Med. 2014.

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

There are in this stage no relevant in vitro options available to study bone formation in a biomaterial for bone regeneration and preclinical studies are required to develop safe regenerative medicine strategies for human applications.

Reduction

By combining the rat femoral defect study with additional subcutaneous implants, the animals are used to make an efficient comparison of various parameters. See statistics for the justification.

Refinement

- Animals will be given 1 week to acclimatize to their new environment.
- Eye ointment will be used to prevent dry eyes during surgery.
- During and after surgery the animals will be placed on heat mats.
- The rats will receive adequate anesthetics to prevent harm during surgery.
- Analgesia medication will be administered till 3 days after surgery to prevent harm post-operatively.
- Resorbable sutures will be used to minimize irritation post operatively
- In vivo bone formation analysis will be done under adequate anesthesia and this narcosis will also be used for administration of the fluorochrome markers in the same session.
- Follow up will be daily for one week after surgery, after that a minimum of one time weekly.

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 rats will have 1 week to acclimatize to the new environment before surgery. We will observe respiration continuously during surgery. The animals will be placed under heat lamps post operatively. The rats will be returned to routine housing after they have recovered from anesthesia and maintained on rodent chow and water ad libitum. Unrestricted weight bearing and activity will be allowed post-op. For specific information see refinement.

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.v.t.

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?

The rats will be housed conform the standards of the animal lab. They will be housed in groups of two. If the acclimatization period points out non-desired circumstances like aggression the rats will be housed separately. Food and water will be given ad libitum.

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. Pre-operative: Light stress during SC injection and light stress during anesthetic induction with isoflurane. – mild
2. Light stress postoperatively after subcutaneous and orthotopic implantation with adequate pain medication. – mild
3. Light stress during uCT and fluorochrome markers injection under isoflurane – mild

4. Light stress during CO2 intoxication – non recovery

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

All described measurements are needed to create the least harm for the animals and most secure outcomes for this project.

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

1. 1 week to acclimatize to new environment before surgery. Adequate use of isoflurane
- 1,3. Adequate depth of narcosis, observe respiration, tail pinch test
2. Adequate observation of vital signs of the animals post-operatively
4. Follow protocol for CO2 intoxication euthanasia

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.

Rats will be closely monitored on general well being. If abnormalities are observed, the veterinarian will be consulted, and based on the severity of discomfort the animal will be euthanised.

Seldomly, after implantation, the femoral fixation plate will loosen and the animals will lose the ability to adequately walk.

OR

A local infection occurs.

These complications are considered a humane endpoint, as animal well being is severely affected and outcome measurements are not trustworthy anymore.

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

Very unlikely.

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 procedure is classified as moderate (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.

The rats need to be euthanized to harvest the scaffolds for histology (endpoints project).

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.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11500	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	UMC Utrecht	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		3	Intramuscular pockets in rats and rabbits, combined with orthotopic model in rabbits

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.

In the in vivo situation, bone stimulating factors such as BMP-2, act in concert with inflammatory mediators to induce repair after bone damage. In line with this, we observed a synergistic effect of BMP-2 with a number of inflammatory mediators in vitro (e.g. TNF-alpha, IL-17 and LPS) on the differentiation of mesenchymal stem cells into bone cells.

To test the hypothesis that these factors can be used for bone regeneration, their effects will be studied in previously established rat and rabbit models of bone formation. If synergistic effects indeed occur in vivo, the combined use of BMP-2 with inflammatory factors can possibly result in a lower dose of BMP-2 required in the human clinic.

Ectopic sites in rats and in rabbits:

Based on ongoing studies, best performers of inflammatory mediators with respect to bone formation are selected and studied for their synergism with BMP-2. Primary outcome is bone formation, measured by histomorphometry. Experimental groups will contain at least (8 conditions): empty ceramic scaffolds, BMP-2 alone at 2 concentrations (high conc is the positive control), inflammatory mediator(s) of choice used with various delivery strategies (different hydrogels), combinations of BMP-2 (conc 1 and 2) with the inflammatory mediators.

Orthotopic tibia study in rabbits: primary outcome is bone volume compared with the contralateral limb. Four experimental groups are planned:

- Sham control,
- BMP-2 alone,
- BMP-2+inflammatory mediator combination,
- Inflammatory mediator alone

ref tibia model:

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.

Ectopic model: using a single incision, PMMA bone cement discs are implanted intramuscularly and subcutaneously in the dorsum. We have previously used up to 14 samples in rats and 18 samples in rabbits. After 6 weeks, all PMMA bone cement discs are removed from their surrounding membranes, and replaced by porous biphasic calcium phosphate (BCP) scaffolds containing the BMP-2/factors of interest. The implantation of the loaded constructs is always performed in a randomized manner. The implantation of the BCP scaffolds within the developed membranes ('biomembrane'), ensures only local effects of the studied factors. The membranes act as a physical barrier, preventing initial leakage of BMPs and other factors.

This model has been used by our group in the past successfully, without loss of animals. These surgeries are estimated to take 1-2 hours. The animals are estimated to experience mild stress (cumulative).

Orthotopic model (tibia model): This model has also been previously by our group (unpublished results). After disinfection of the skin, the stifle joint is opened with an incision through the skin and the patellar tendon. A hole is drilled into the tibia through the cartilage layer with a hand drill with small diameter (0.5-1 mm). The studied compound is injected into the tibia cavity in a volume of 50-100 ul. The patellar tendon and skin are closed with resorbable sutures. The surgeries are estimated to take 0.5 hour. The animals are estimated to experience mild stress (cumulative).

Anesthesia protocol

Rats: Start with isoflurane/oxygen 4%, and maintained with isoflurane/oxygen 1-2%.

Rabbits: Combination of injection analgetics/anesthetics (in previous experiments, medetomidine subcutaneously, and ketamine and Glycopyrrolate intramuscularly were given during surgery). Anesthesia can be given once more if the surgery takes more than 2 hours (not expected). After that, the rabbits should be intubated.

Pain management

All animals receive injection analgetics (usually buprenorphine), with a 12 hours interval, starting before the surgery. This will be continued for a total of 2 days after the operations. If any signs of pain continue (observed during daily scoring of the animals), pain medication will be continued.

Antiseptic techniques

All operations will be performed aseptically conditions. The surgeon will wear scrubs, sterile gloves and sterile gown. The surgeon will wear an OR mask and cap. Only autoclaved instruments will be used. After shaving, the skin will be disinfected. All materials introduced into the animals are autoclaved or filtered to ensure sterility. The rabbits will receive prophylactic antibiotics as part of the surgery as they have a higher chance of wound infections.

Surgical technique femoral defect & subcutaneous implants

Postoperative care

The animals will receive proper post-operative care. The animals will be housed per two (female rabbits) or three (rats) if possible.

The animals will be scored daily for well-being in the first week and regularly thereafter. The animals will receive pain medication for two days at minimum, and longer if necessary.

Bone regeneration measurements.

In vivo and post-mortem micro-CT imaging at different time points to measure the bone volume (max. 5 times in total). The rats are sedated using isoflurane (1-3.5%). The rabbits are sedated with the same anesthetics as used for the implantations (minimal required doses). Animals will receive fluorochrome markers subcutaneously at three time points to determine the onset and localization of new bone formation by fluorescence microscopy post-mortem. Bone formation will be quantified on histological samples post-mortem (bone area % in porous BCP).

Euthanasia protocols

Euthanasia is performed according to one of the methods listed in appendix IV of directive 2010/63/EU.

The rats will be euthanized within 10 weeks after the start of the experiment (usually with an overdose of CO₂ inhalation). The rabbits will be euthanized within 20 weeks after the start of the experiment (usually with an overdose of Pentobarbital i.v.). In the case of rabbits, this will be performed under general anesthesia and pain medication, similar to the surgery procedure.

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

A power analysis will be performed; the number of animals needed is calculated based on studies performed previously.

For the ectopic studies, the bone volume (area %) in intramuscularly implanted BCP samples after the endpoint is the primary outcome parameter. Although 8 intramuscular samples (1 control and 7 experimental conditions) can be studied, we usually only compare the effect of 3 different experiment groups to the negative control (e.g. the optimal concentration when different concentrations of BMP-2/inflammatory factor is tested). This should be considered when estimating the value of 'alpha' when performing Bonferroni post-hoc correction. The expected effect size and standard deviation is based on previous rodent

studies where inflammatory mediators were used orthotopically without BMP-2. Therefore, we estimate that 12 rats and 12 rabbits are needed for the ectopic studies.

The orthotopic tibia study has bone volume as primary outcome parameter, comparing the treated limb to the contralateral limb. Effect size and standard deviation are based on a previous study where bacteria were introduced in this tibia model (Croes et al.). With the use of 4 experimental groups needed for the entire study design (i.e. Sham control, BMP-2 only, BMP-2+inflammatory combination, inflammatory factor only), we estimate to use 50 animals.

Total animal number
12 rats and 62 rabbits

B. De dieren

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

Ectopic Models:

- Rats, male Fischer 344 (IcoCrI), age 6-12 weeks.
- Rabbits, male New Zealand White, age 12-16 weeks.

These ectopic pocket models have already been validated and used successfully by our group (unpublished results). The Fischer 344 rats have been chosen as an animal model as they are inbred, and have allowed for the syngeneic transplantation of bone marrow derived stem cells between different rats without rejection (Chatterjea et al. 2014). Although this is not part of the initial plan, the choice of this animal model provides the freedom to combine inflammatory factors/BMP-2 with mesenchymal stem cells in the future. Furthermore, data can be compared to other previous and future BMP-2 experiments in these rats.

Orthotopic model:

- Rabbits, female New Zealand White, age 12-16 weeks.

This orthotopic model has been used before by our group (unpublished results). Identical conditions are needed to further investigate the interaction of BMP-2 with inflammatory factors.

Male rabbits are used for ectopic bone formation studies, as the bone formation induced by BCP ectopically is more strongly induced than in female rabbits. As an example, bone formation can be observed intramuscularly in male rabbits using calcium phosphate materials alone (Yuan, 2006), while this is not the case in female rabbits. This is the most clinically relevant model for our research. For the orthotopic study, female rabbits can be used, which allows for grouped housing. To our knowledge, there is no difference in the orthotopic model between male and female rabbits. Fischer rats are used, as these inbred rats have been used for autologous transplantation of stem cells in previous studies. We therefore already have data on the bone formation in control and BMP-2 groups using BCP. Therefore, no further pilot experiments are necessary.

For orthotopic studies, rabbits are used as their immune system is more comparable to humans than rodents. More specifically, adolescent rabbits are used, as the periosteal bone formation is larger in these animals compared to mature rabbits. This process of periosteal bone formation in rabbits is similar to the clinical situation in man (Vogely 2000).

For rat and rabbit ectopic studies, the age is chosen such to allow sufficient samples in the dorsal region of the animals with minimal cross-over effects of

BMPs and inflammatory mediators.

References :

Cell Mol Med. 2014. Suppression of the immune system as a critical step for bone formation from allogeneic osteoprogenitors implanted in rats. Chatterjea et al.

Tissue Eng. 2006. Cross-species comparison of ectopic bone formation in biphasic calcium phosphate (BCP) and hydroxyapatite (HA) scaffolds. Yuan et al.

J Orthop Res. 2000. Effects of hydroxyapatite coating on Ti-6Al-4V implant-site infection in a rabbit tibial model. Vogely et al.

Number

See justification statistical method

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

Several in vitro studies have already demonstrated the bone stimulating properties of inflammatory mediators on the differentiation of stem cells into bone cells. The complexity of the bone environment and the interaction between immune and bone cells are difficult to mimic in vitro. Furthermore, an interplay between BMPs and inflammatory mediators is required for optimal bone healing in the in vivo situation. To allow sufficient translation into the clinic, suitable in vivo models should be used. The ectopic and orthotopic models have been validated in pilot studies by our group. With these model, we allow for optimal local delivery of BMP-2 in combination with inflammatory factors. The rat model is the smallest screening model suitable for our research, allowing more samples to be implanted per animal than mice. After the screening phase, rabbits are the best animal model as, in comparison to rodents, their immune system is more comparable to humans. Furthermore, larger BCP samples can be used, allowing better translation to the clinical situation. Finally, the results obtained in the rabbit ectopic model can directly be validated in a rabbit orthotopic model, which represents the most relevant situation clinically.

Reduction

The ectopic screening model allows a large number implants to be studied per animal. We have previously used up to 14 samples in rats and 18 samples in rabbits. In these study, there was no loss of any of the animals, nor any unexpected harm. Furthermore, the subcutaneous and intramuscular locations can be easily studied in parallel. As all animals receive all different experimental conditions, the inter-animal variation is reduced allowing for a smaller number of animals for statistical significance. Power analyses are always performed to ensure the use of a minimum number of animals. The most optimal conditions are subsequently tested in the orthotopic model.

Refinement

- Skin wounds will be sutured intracutaneously, using resorbable sutures (Monocryl).
- Animals are housed together as much as possible. Only in the case of male rabbits, this will not be possible.
- Animals will have the standard cage enrichment at the [REDACTED]
- The rabbits will receive prophylactic antibiotics to minimize the chance of infection.
- Animals are weighed weekly to monitor health
- Animals will be given 1 week to acclimatize to their new environment
- Eye ointment will be used to prevent dry eyes during surgery.
- During and after surgery the animals will be placed on heat mats.
- Animals will receive adequate anaesthetics to prevent harm during surgery.
- Analgesia medication will be administered till 2 days after surgery to prevent harm post-operatively.
- In vivo bone formation analysis will be done under adequate anaesthesia and this narcosis will also be used for administration of the fluorochrome markers in the same session.
- Surgery method minimized discomfort: for ectopic implantation, a single midline incision will be used. For orthotopic model, the patellar tendon is opened and sutured after the procedure. All other structures of the stifle joint are unaffected allowing optimal recovery.
- Daily scoring of the animals after the operations. Pain medication will be continued if necessary. For rabbits, this is a standard procedure at the GDL Utrecht. For rats, the extra handling for scoring will be requested in the working protocol.

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 have at least 1 week to acclimatize to the new environment before surgery. We will observe respiration of the rats continuously during surgery. The rabbits will be monitored for the respiratory and heart function by the biotechnicus at the GDL. The animals will be placed on heat mats postoperatively. The animals will be returned to routine housing after they have recovered from anesthesia. The rats will be maintained on rodent chow. Unrestricted weight bearing and activity will be allowed post-op. For specific information see refinement. The animals will be scored daily by the animal caretakers after the operations. Possible harmful effects of inflammatory mediators will be listed in the working protocol in the animal laboratory so that animal caretakers can take adequate precautions.

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.v.t.

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?

The rats and rabbits will be housed conform the standards of the animal lab. They will be housed in groups of two if possible (this have been done for the male Fischer 344 rats and female New Zealand White rabbits in the past without problems). If the acclimatization period points out non-desired circumstances like aggression the rats will be housed separately. Food and water will be given ad libitum.

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?

Cumulative mild (matig) stress is estimated based on the following procedures:

-Operations: mild stress. Due to anesthetics and ectopic implantation of samples. Animals may experience pain in the dorsum after the operation. Animals will have reduced food intake and have weight loss due to the operations. After the orthotopic procedure in rabbits, rabbits will experience pain in affected stifle joint. In the past however, the animals were walking soon after the operation and loading the affected limb.

-Daily scoring of animals after the operation: light stress, due to handling.

-Injection of pain medication subcutaneously: light stress. Due to handling and injection.

-Injection of fluorochrome markers subcutaneously: light stress. Caused by handling. Furthermore, local irritation and colouring of faeces, urine and skin is possible.

In vivo micro-CT scans: light to mild stress. Due to handling, and anesthetic induction (isoflurane in rats, injection of anesthetics in rabbits)

Euthanasia: Light stress, due to handling.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

All described measurements are needed to create the least harm for the animals and most secure outcomes for this project.

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

1. at least 1 week to acclimatize to new environment before surgery. Adequate use of analgetics and isoflurane (rats) and injection anesthetics (rabbits) during ORs.
3. Rats: adequate depth of narcosis, observe respiration, tail pinch test. Rabbits: monitoring of respiratory and heart function by the biotechnician assisting with the anesthetics at the animal laboratory. The depth of narcosis (twitching/movement) can also be observed by the researcher performing the operation.
2. Adequate observation of vital signs of the animals post-operatively. Scoring of the animals daily after operations by the animal caretakers.
4. Follow protocol for euthanasia, one of the methods listed in Appendix IV of directive 2010/63/EU.
5. Pain medication, starting before the operation, and continued for two days as standard. If there is an indication, pain medication will be extended.

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.

- The rats will be euthanized in case one or more of the following humane endpoints are observed:
 - Weight loss. When weight loss is suspected (reduced food intake), the animals will be weighed daily to monitor welfare.
 - Severe lethargy
 - Severe tachycardia
 - Severe tremor
 - Loss of the animals' ability to walk and feed themselves
 - Local persistent infection of the implants. The rats will first receive antibiotics in an attempt to treat the infection).
- The rabbits will be euthanized in case one or more of the following humane endpoints are observed:

- Weight loss. When weight loss is suspected (reduced food intake), the animals will be weighed daily to monitor welfare (ectopic and orthotopic models)
- Severe lethargy (ectopic and orthotopic models)
- Severe tachycardia (ectopic and orthotopic models)
- Severe tremor (ectopic and orthotopic models)
- Loss of the animals' ability to walk and feed themselves
- Local persistent infection of the implants. The rabbits will first receive antibiotics in an attempt to treat the infection (ectopic model)
- Joint infection with severe pus formation (orthotopic model).

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

Very unlikely.

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 procedure is classified as moderate (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.

The animals need to be euthanized to harvest the scaffolds (ectopic model) and limbs (orthotopic model) for micro-CT and histology.

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

FLOWCHART AIM 1**Experiment 1****SUBCUTANEOUS**

Early tissue response

Identify inhibition/
Enhancement
factors**ORTHOTOPIC**Release profiles BMP-2
on bone formation**SUBCUTANEOUS**Effect
inhibition/enhancement
factors on bone
formation**FLOWCHART AIM 2/3****Experiment 1****SUBCUTANEOUS**Optimize construct
componentsGo/No go based on bone
volume (> 20 % increase)

YES

ORTHOTOPICOptimized construct in
clinical relevant model**SUBCUTANEOUS**Test other conditions
for further
improvement

NO

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer : **2015.II.115.002**
2. Titel van het project : **The role of osteogenic (growth) factors in bone replacement constructs**
3. Titel van de NTS : **De rol van groeifactoren in botvorming**

4. Type aanvraag:

- ☒ nieuwe aanvraag projectvergunning
- ☐ wijziging van vergunning met nummer :

5. Contactgegevens DEC

Naam DEC : DEC Utrecht

Telefoonnummer contactpersoon : XXXXXXXXXX

Emailadres contactpersoon : dec-utrecht@umcutrecht.nl

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

- ☒ ontvangen door DEC: **13-03-2015**
- ☒ aanvraag compleet: **13-03-2015**
- ☒ in vergadering besproken: **18-03-2015**
- ☒ anderszins behandeld: **08-04-2015 (e-mailronde)**
- ☒ termijnonderbreking(en) van / tot : **24-03-2015 tot 08-04-2015**
- ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
- ☐ aanpassing aanvraag:
- ☐ advies aan CCD: **28-04-2015**

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: **24-03-2015**
- Strekking van de vraag / vragen: **De DEC heeft m.b.t. de NTS de volgende vragen gesteld:**

- 3.1: De DEC adviseert u het doel uitgebreider weer te geven en meer toe te schrijven naar de doelstelling, door het kader weer te geven waarin het onderzoek plaatsvindt (context). Graag aanpassen.
- 4.1: De eerste zin graag anders formuleren door deze concreter te maken en de term 'in vitro' vervangen door een voor de leek meer begrijpelijke term.
- 4.1: U spreekt over geldige en juiste modellen. Graag toelichten wat u hier precies mee bedoelt. Bovendien is het niet duidelijk waarom er eerst genoemd wordt dat voorafgaand onderzoek slechte resultaten gaf en dat er vervolgens verder wordt gewerkt met dezelfde modellen als zijnde het juiste model. Graag helderder weergeven.
- 4.3: De keuze voor de diersoort is niet verklaard. Graag alsnog aangeven waarom u gekozen heeft voor de rat en het konijn en hoe dit bijdraagt aan verfijning van het experiment, temeer daar u stelt dat de resultaten verkregen m.b.v. experimenten in konijnen volgens u beter vertaalbaar zijn naar de mens?

M.b.t. het projectvoorstel heeft de DEC het volgende gevraagd:

- 3.1, achtergrond: De DEC verzoekt u te verduidelijken waarom het diermodel dat positieve resultaten heeft opgeleverd, niet transleerbaar bleek naar de kliniek. Het is de DEC niet duidelijk waarom u denkt dat deze studie wel transleerbaar zal zijn. Graag toelichten, waarbij u specificeert wat u in dit model aanpast om de translatiepotentie te verhogen en waarom. Ook graag noemen in punt 3.3, belang.
- 3.1, achtergrond: DE DEC mist informatie over de scaffolds, waarbij u aangeeft of de scaffolds de effectiviteit van BMP-2 al dan niet kan beïnvloeden. Graag aangeven in het projectvoorstel, inclusief eventuele referentie.
- 3.3, belang: De DEC vraagt zich af hoe het samenwerkingsverband met de kliniek is geregeld. Graag toelichten in de projectaanvraag.
- 3.3, belang: De DEC verzoekt u hier tevens aan te geven waarom het relevant is dat met name BMP-2 getest wordt.

Bijlage 1:

- A, Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Bij aim 2 spreekt u over 'several genes', terwijl in de rest van de aanvraag steeds alleen wordt gesproken over BMP-2. Graag verhelderen en/of aanpassen in de aanvraag.
- A, Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Voor de berekening van het aantal benodigde dieren gebruikt u voor de Sprague Dawley ratten een N=10 en voor de F344 ratten een N=15. Het is de DEC niet duidelijk wat hier de ratio van is. Graag verhelderen en indien nodig aanpassen.
- A, Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: U gebruikt als experimentele eenheid de scaffold en niet het proefdier. De DEC vraagt zich af of in ieder dier passende controles worden meegenomen om in between animals effecten uit te sluiten. Graag verhelderen.

Bijlagen, algemeen:

De DEC heeft de onderzoeker geadviseerd de bijlagen nog eens goed door te nemen met de IvD, omdat deze zeer gedetailleerd zijn weergegeven, hetgeen niet nodig is. Ook is de onderzoeker gevraagd om extra aandacht te besteden aan de humane eindpunten en deze vermelden per model en diersoort.

- Datum antwoord: **08-04-2015**
- Strekking van het (de) antwoord(en): **N.a.v. de opmerkingen en vragen van de DEC is in de NTS nu duidelijk het doel geformuleerd, zijn lastige termen vereenvoudigd, en zijn gebruikte termen verduidelijkt. Ook is uitgelegd dat voorgaand onderzoek niet tot slechte resultaten leidde, maar dat het laboratorium werk niet voorspellend is voor de situatie in een levend dier, omdat het weefsel zoveel ingewikkelder is. De keuze voor de diersoort is verklaard. Alle antwoorden zijn ook verwerkt in de NTS.**

Met betrekking tot het projectvoorstel is de strekking van de antwoorden als volgt:

- **De onderzoeker heeft aangegeven dat de term niet transleerbaar eerder is gebruikt met zeer strenge criteria voor de werking van groeifactor BMP-2, nl. in vergelijking met autoloog bot, de huidige standaard in de orthopedie. Dit is feitelijk onjuist, en de werking van BMP-2 in proefdieren (m.n. de rat) in vergelijking met niets doen is wel degelijk voorspelbaar voor de werking in de mens en dus transleerbaar naar de kliniek. In de tekst is nu aangegeven dat BMPs wel degelijk effectief zijn voor botvorming, met name voor spinale fusies, maar dat het succes betwijfeld wordt omdat er in bepaalde gevallen ernstige bijwerkingen gevonden worden. Door aanpassingen in de toedieningsvorm (dosis en duur) zullen de bijwerkingen naar verwachting verminderen/verdwijnen. Informatie over de keuze van de scaffolds en hoe deze een onderdeel vormen van het ontwerp, is toegevoegd. Met alle genoemde scaffolds heeft de onderzoeksgroep ruime ervaring en referenties zijn vermeld.**
- **De afdeling [REDACTED] is een zeer gericht op translatie van onderzoeksresultaten naar de kliniek, blijkend uit de voortdurende intensieve interacties tussen onderzoekers en klinici, de ontwikkeling van nieuwe therapieën die daadwerkelijk naar de kliniek worden gebracht en de vele klinische trials die gedaan worden. Daarnaast heeft de onderzoeker uitgelegd waarom juist BMP-2 relevant is in botonderzoek. Als een van de potentste groeifactoren voor botvorming heeft deze factor vooral te kampen gehad met een negatief imago door een aantal gesignaleerde bijwerkingen die het gevolg bleken van de extreem hoge doses aanwezig in de twee FDA goedgekeurde producten (een met BMP-2, en een met BMP-7). Het is een breed gedragen mening, dat het toedienen van een veel lagere dosis (geschat wordt 100-1000 keer lager) met daaraan gekoppeld een juiste timing, zal leiden tot een veel veiliger product. Door de ervaring van de onderzoeksgroep met BMP-2 biologie, expressie en readout essays, en de beschikbaarheid van geschikte afgifte systemen, is gekozen voor BMP-2 als initiële groeifactor, mogelijk uit te breiden met andere groeifactoren (waaronder BMP-7).**
- **Onder aim 2 zijn de genen gespecificeerd die gebruikt zullen worden om synergie met BMP-2 te bestuderen. Deze genproducten zijn al tijdens in vitro experimenten**

effectief bevonden voor botregeneratie. Van een enkele, nl. BMP-7, is aangetoond in de literatuur dat de heterodimeer van BMP-2 en BMP-7 een 10-keer hogere affiniteit heeft met BMP receptoren.

- Het verschil in aantal dieren is gebaseerd op berekeningen van de power op grond van eerdere spreidingen in de data gevonden voor de verschillende ratten stammen. Dit is nu aangegeven in de tekst.

- In samenspraak met de IVD zijn de details globaler gemaakt waar dat kon, en is meer precies omschreven hoe de humane eindpunten gehanteerd zullen worden.

- 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(ën) zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling(en).

3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Het wordt ingeschat als een substantieel belang. **Het belang wordt ingeschat als substantieel. Bij gecompliceerde breuken, pathologische defecten of bij het grote botdefecten kunnen er problemen zijn met het bothelingsproces. Hierdoor ontstaat de noodzaak tot bottransplantaties of botvervangingsproducten. Jaarlijks worden wereldwijd meer dan 2,2 miljoen bottransplantaties uitgevoerd. Bot transplantaties zijn het meest succesvol met autoloog bot, maar dit heeft ook nadelen, zoals beperkte beschikbaarheid en donorpijn. Het**

verbeteren van bot vervangende materialen kan bijdragen aan het veiliger en efficiënter gebruik van bot vervangende materialen voor de humane geneeskunde.

4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. **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 DEC acht deze aanpak zeer degelijk omdat er een analyse wordt gedaan van hetgeen nodig is in de verschillende stadia van het proces van botvorming. Relatief nieuw is daarbij onderzoek naar de rol van ontstekingscellen en hun producten.**
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)
- De keuze hiervoor is voldoende wetenschappelijk onderbouwd.
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. **Het ongerief is door de onderzoeker ingeschat als mild tot matig. De dieren ondergaan een operatie t.b.v. implantatie, waarbij adequate pre- en post-operatieve pijnstilling wordt gegeven en adequate humane eindpunten worden toegepast. Bij een deel van de experimenten zullen de dieren meerdere malen een onder narcose een CT-scan ondergaan, wat licht ongerief geeft. Na afloop van het experiment zullen de dieren worden geëuthanaseerd om de implantaten uit te nemen en te kunnen analyseren. Gezien deze handelingen is de DEC van mening dat het genoemde ongerief een realistische inschatting is.**
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen vervangen. **Voor het bestuderen van botvorming is geen goed in vitro model beschikbaar. Ook in vitro onderzoek met botvormende cellen toonde aan dat de resultaten daarvan een slechte overeenkomst vertonen met de werkelijke botvorming. Voor een veilige humane toepassing van nieuwe medicijnen zijn voorafgaande dierstudies wettelijk vereist. Directe toepassing in de mens is daarom niet mogelijk en zijn proefdieren nodig.**

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. **De DEC is van mening dat het maximale aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en proportioneel is ten opzichte van de gekozen strategie en looptijd. Door twee benaderingen (onderhuids/intra musculair implantaat en botdefect) in één dier te onderzoeken wordt het aantal dieren beperkt. Daarnaast worden door middel van pockets verschillende testruimtes gemaakt in één dier, zodat tegelijkertijd meerdere stoffen en condities kunnen worden onderzocht. Ook maakt deze benadering het mogelijk dat statistisch significante verschillen gevonden worden terwijl minder dieren worden ingezet.**
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 DEC is van mening dat het project in overeenstemming is met de vereisten ten aanzien van de verfijning van dierproeven. Bij de opzet is rekening gehouden met dierenwelzijn. Zo krijgen de dieren een week om zich aan te passen aan hun nieuwe omgeving voordat de operatie zal worden gestart. De operaties zullen onder narcose worden uitgevoerd door ervaren chirurgen, er wordt adequate pre- en post-operatieve pijnstilling toegepast, er wordt gebruik gemaakt van resorbeerbare hechtingen en de dieren worden per twee gehuisvest. Tevens wordt na de operatie dagelijks de gezondheid en het gewicht van de dieren bewaakt en zijn heldere humane eindpunten geformuleerd. Ook de MRI metingen vinden plaats onder narcose.**
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 is de DEC unaniem van mening dat het belang van de doelstelling, namelijk onderzoeken welke combinatie van groeistimulerende medicijnen, toedieningsmethoden en botweefselconstructie de beste resultaten geeft, substantieel is en opweegt tegen het milde tot matige ongerief dat de dieren in dit onderzoek zullen ondervinden.

Door het onder narcose aanbrengen van de, subcutane dan wel intra musculaire, implantaten en het maken van MRI-scans treedt weliswaar mild tot matig ongerief op, maar naar het oordeel van de DEC is gekozen voor de juiste onderzoeksstrategie en zijn deze handelingen noodzakelijk voor het bereiken van het gewenste doel. Het is niet mogelijk om dit onderzoek bij mensen uit te voeren en er zijn evenmin in vitro alternatieven beschikbaar. De DEC acht vertaling van de resultaten naar de mens mogelijk. Dit alles brengt de DEC tot het oordeel dat het gebruik van de dieren in dit project gerechtvaardigd is.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

- ☐ De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
- De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is.
 - De volgende doorslaggevende ethische bezwaren.
 - De volgende tekortkomingen in de aanvraag.
- ☐ De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
- Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.
 - Voor de uitvoering van dit project is tevens een ministeriële ontheffing vereist.
 - Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden.
- ☒ De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK s-GRAVENHAGE

[bezoekadres](#)
Bolognalaan 50
3584 CJ Utrecht

[postadres](#)
Postbus 12007
3501 AA Utrecht

T (030) 253 15 69
info@ivd-utrecht.nl
www.ivd-utrecht.nl

[uw kenmerk](#)
[ons kenmerk](#)

[datum](#) 30 april 2015
[onderwerp](#) Factuur t.b.v. leges

Mijne Dames en Heren,

Bijgaand zend ik u een projectvergunningaanvraag.

Correspondentieadres

Ik verzoek u vriendelijk de correspondentie aan portefeuillehouder te verzenden aan de Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht. Daarvoor kan in de adressering direct onder de naam van de portefeuillehouder worden vermeld: t.a.v. de Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht, Postbus 12007, 3501AA, Utrecht.

Facturering

De vergunninghouder zal de leges voor de bijgaande aanvraag voldoen aan de CCD na ontvangst van de factuur. U kunt op de factuur het onderstaande factuuradres gebruiken en daarbij het vetgedrukte grootboeknummer vermelden.

Factuuradres

UU -ASC
postbus 80.011
3508 TA Utrecht
o.v.v. **CB.841910.3.01.011**

Ik verzoek u vriendelijk de factuur digitaal in te dienen. Via die route kunnen de leges het snelst worden voldaan. Hiervoor kunt u gebruik maken van het volgende email adres:
info.ascf@uu.nl.

Het ondertekende aanvraagformulier zal u per separate post worden toegezonden.

Met vriendelijke groet




A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer : **2015.II.115.002**
2. Titel van het project : **The role of osteogenic (growth) factors in bone replacement constructs**
3. Titel van de NTS : **De rol van groeifactoren in botvorming**

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: **13-03-2015**
- ☒ aanvraag compleet: **13-03-2015**
- ☒ in vergadering besproken: **18-03-2015**
- ☒ anderszins behandeld: **08-04-2015 (e-mailronde)**
- ☒ termijnonderbreking(en) van / tot : **24-03-2015 tot 08-04-2015**
- ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
- ☐ aanpassing aanvraag:
- ☐ advies aan CCD: **28-04-2015**

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: **24-03-2015**
- Strekking van de vraag / vragen: **De DEC heeft m.b.t. de NTS de volgende vragen gesteld:**

- 3.1: De DEC adviseert u het doel uitgebreider weer te geven en meer toe te schrijven naar de doelstelling, door het kader weer te geven waarin het onderzoek plaatsvindt (context). Graag aanpassen.
- 4.1: De eerste zin graag anders formuleren door deze concreter te maken en de term 'in vitro' vervangen door een voor de leek meer begrijpelijke term.
- 4.1: U spreekt over geldige en juiste modellen. Graag toelichten wat u hier precies mee bedoelt. Bovendien is het niet duidelijk waarom er eerst genoemd wordt dat voorafgaand onderzoek slechte resultaten gaf en dat er vervolgens verder wordt gewerkt met dezelfde modellen als zijnde het juiste model. Graag helderder weergeven.
- 4.3: De keuze voor de diersoort is niet verklaard. Graag alsnog aangeven waarom u gekozen heeft voor de rat en het konijn en hoe dit bijdraagt aan verfijning van het experiment, temeer daar u stelt dat de resultaten verkregen m.b.v. experimenten in konijnen volgens u beter vertaalbaar zijn naar de mens?

M.b.t. het projectvoorstel heeft de DEC het volgende gevraagd:

- 3.1, achtergrond: De DEC verzoekt u te verduidelijken waarom het diermodel dat positieve resultaten heeft opgeleverd, niet transleerbaar bleek naar de kliniek. Het is de DEC niet duidelijk waarom u denkt dat deze studie wel transleerbaar zal zijn. Graag toelichten, waarbij u specificeert wat u in dit model aanpast om de translatiepotentie te verhogen en waarom. Ook graag noemen in punt 3.3, belang.
- 3.1, achtergrond: DE DEC mist informatie over de scaffolds, waarbij u aangeeft of de scaffolds de effectiviteit van BMP-2 al dan niet kan beïnvloeden. Graag aangeven in het projectvoorstel, inclusief eventuele referentie.
- 3.3, belang: De DEC vraagt zich af hoe het samenwerkingsverband met de kliniek is geregeld. Graag toelichten in de projectaanvraag.
- 3.3, belang: De DEC verzoekt u hier tevens aan te geven waarom het relevant is dat met name BMP-2 getest wordt.

Bijlage 1:

- A, Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Bij aim 2 spreekt u over 'several genes', terwijl in de rest van de aanvraag steeds alleen wordt gesproken over BMP-2. Graag verhelderen en/of aanpassen in de aanvraag.
- A, Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Voor de berekening van het aantal benodigde dieren gebruikt u voor de Sprague Dawley ratten een N=10 en voor de F344 ratten een N=15. Het is de DEC niet duidelijk wat hier de ratio van is. Graag verhelderen en indien nodig aanpassen.
- A, Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: U gebruikt als experimentele eenheid de scaffold en niet het proefdier. De DEC vraagt zich af of in ieder dier passende controles worden meegenomen om in between animals effecten uit te sluiten. Graag verhelderen.

Bijlagen, algemeen:

De DEC heeft de onderzoeker geadviseerd de bijlagen nog eens goed door te nemen met de IvD, omdat deze zeer gedetailleerd zijn weergegeven, hetgeen niet nodig is. Ook is de onderzoeker gevraagd om extra aandacht te besteden aan de humane eindpunten en deze vermelden per model en diersoort.

- Datum antwoord: **08-04-2015**
- Strekking van het (de) antwoord(en): **N.a.v. de opmerkingen en vragen van de DEC is in de NTS nu duidelijk het doel geformuleerd, zijn lastige termen vereenvoudigd, en zijn gebruikte termen verduidelijkt. Ook is uitgelegd dat voorgaand onderzoek niet tot slechte resultaten leidde, maar dat het laboratorium werk niet voorspellend is voor de situatie in een levend dier, omdat het weefsel zoveel ingewikkelder is. De keuze voor de diersoort is verklaard. Alle antwoorden zijn ook verwerkt in de NTS.**

Met betrekking tot het projectvoorstel is de strekking van de antwoorden als volgt:

- **De onderzoeker heeft aangegeven dat de term niet transleerbaar eerder is gebruikt met zeer strenge criteria voor de werking van groeifactor BMP-2, nl. in vergelijking met autoloog bot, de huidige standaard in de orthopedie. Dit is feitelijk onjuist, en de werking van BMP-2 in proefdieren (m.n. de rat) in vergelijking met niets doen is wel degelijk voorspelbaar voor de werking in de mens en dus transleerbaar naar de kliniek. In de tekst is nu aangegeven dat BMPs wel degelijk effectief zijn voor botvorming, met name voor spinale fusies, maar dat het succes betwijfeld wordt omdat er in bepaalde gevallen ernstige bijwerkingen gevonden worden. Door aanpassingen in de toedieningsvorm (dosis en duur) zullen de bijwerkingen naar verwachting verminderen/verdwijnen. Informatie over de keuze van de scaffolds en hoe deze een onderdeel vormen van het ontwerp, is toegevoegd. Met alle genoemde scaffolds heeft de onderzoeksgroep ruime ervaring en referenties zijn vermeld.**
- **De afdeling [REDACTED] is een zeer gericht op translatie van onderzoeksresultaten naar de kliniek, blijkend uit de voortdurende intensieve interacties tussen onderzoekers en klinici, de ontwikkeling van nieuwe therapieën die daadwerkelijk naar de kliniek worden gebracht en de vele klinische trials die gedaan worden. Daarnaast heeft de onderzoeker uitgelegd waarom juist BMP-2 relevant is in botonderzoek. Als een van de potentste groeifactoren voor botvorming heeft deze factor vooral te kampen gehad met een negatief imago door een aantal gesignaleerde bijwerkingen die het gevolg bleken van de extreem hoge doses aanwezig in de twee FDA goedgekeurde producten (een met BMP-2, en een met BMP-7). Het is een breed gedragen mening, dat het toedienen van een veel lagere dosis (geschat wordt 100-1000 keer lager) met daaraan gekoppeld een juiste timing, zal leiden tot een veel veiliger product. Door de ervaring van de onderzoeksgroep met BMP-2 biologie, expressie en readout essays, en de beschikbaarheid van geschikte afgifte systemen, is gekozen voor BMP-2 als initiële groeifactor, mogelijk uit te breiden met andere groeifactoren (waaronder BMP-7).**
- **Onder aim 2 zijn de genen gespecificeerd die gebruikt zullen worden om synergie met BMP-2 te bestuderen. Deze genproducten zijn al tijdens in vitro experimenten**

effectief bevonden voor botregeneratie. Van een enkele, nl. BMP-7, is aangetoond in de literatuur dat de heterodimeer van BMP-2 en BMP-7 een 10-keer hogere affiniteit heeft met BMP receptoren.

- Het verschil in aantal dieren is gebaseerd op berekeningen van de power op grond van eerdere spreidingen in de data gevonden voor de verschillende ratten stammen. Dit is nu aangegeven in de tekst.

- In samenspraak met de IVD zijn de details globaler gemaakt waar dat kon, en is meer precies omschreven hoe de humane eindpunten gehanteerd zullen worden.

- 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(ën) zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling(en).
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Het wordt ingeschat als een substantieel belang. **Het belang wordt ingeschat als substantieel. Bij gecompliceerde breuken, pathologische defecten of bij het grote botdefecten kunnen er problemen zijn met het bothelingsproces. Hierdoor ontstaat de noodzaak tot bottransplantaties of botvervangingsproducten. Jaarlijks worden wereldwijd meer dan 2,2 miljoen bottransplantaties uitgevoerd. Bot transplantaties zijn het meest succesvol met autoloog bot, maar dit heeft ook nadelen, zoals beperkte beschikbaarheid en donorpijn. Het**

verbeteren van bot vervangende materialen kan bijdragen aan het veiliger en efficiënter gebruik van bot vervangende materialen voor de humane geneeskunde.

4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. **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 DEC acht deze aanpak zeer degelijk omdat er een analyse wordt gedaan van hetgeen nodig is in de verschillende stadia van het proces van botvorming. Relatief nieuw is daarbij onderzoek naar de rol van ontstekingscellen en hun producten.**
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)
- De keuze hiervoor is voldoende wetenschappelijk onderbouwd.
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. **Het ongerief is door de onderzoeker ingeschat als mild tot matig. De dieren ondergaan een operatie t.b.v. implantatie, waarbij adequate pre- en post-operatieve pijnstilling wordt gegeven en adequate humane eindpunten worden toegepast. Bij een deel van de experimenten zullen de dieren meerdere malen een onder narcose een CT-scan ondergaan, wat licht ongerief geeft. Na afloop van het experiment zullen de dieren worden geëuthanaseerd om de implantaten uit te nemen en te kunnen analyseren. Gezien deze handelingen is de DEC van mening dat het genoemde ongerief een realistische inschatting is.**
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen vervangen. **Voor het bestuderen van botvorming is geen goed in vitro model beschikbaar. Ook in vitro onderzoek met botvormende cellen toonde aan dat de resultaten daarvan een slechte overeenkomst vertonen met de werkelijke botvorming. Voor een veilige humane toepassing van nieuwe medicijnen zijn voorafgaande dierstudies wettelijk vereist. Directe toepassing in de mens is daarom niet mogelijk en zijn proefdieren nodig.**

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. **De DEC is van mening dat het maximale aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en proportioneel is ten opzichte van de gekozen strategie en looptijd. Door twee benaderingen (onderhuids/intra musculair implantaat en botdefect) in één dier te onderzoeken wordt het aantal dieren beperkt. Daarnaast worden door middel van pockets verschillende testruimtes gemaakt in één dier, zodat tegelijkertijd meerdere stoffen en condities kunnen worden onderzocht. Ook maakt deze benadering het mogelijk dat statistisch significante verschillen gevonden worden terwijl minder dieren worden ingezet.**
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 DEC is van mening dat het project in overeenstemming is met de vereisten ten aanzien van de verfijning van dierproeven. Bij de opzet is rekening gehouden met dierenwelzijn. Zo krijgen de dieren een week om zich aan te passen aan hun nieuwe omgeving voordat de operatie zal worden gestart. De operaties zullen onder narcose worden uitgevoerd door ervaren chirurgen, er wordt adequate pre- en post-operatieve pijnstilling toegepast, er wordt gebruik gemaakt van resorbeerbare hechtingen en de dieren worden per twee gehuisvest. Tevens wordt na de operatie dagelijks de gezondheid en het gewicht van de dieren bewaakt en zijn heldere humane eindpunten geformuleerd. Ook de MRI metingen vinden plaats onder narcose.**
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 is de DEC unaniem van mening dat het belang van de doelstelling, namelijk onderzoeken welke combinatie van groeistimulerende medicijnen, toedieningsmethoden en botweefselconstructie de beste resultaten geeft, substantieel is en opweegt tegen het milde tot matige ongerief dat de dieren in dit onderzoek zullen ondervinden.

Door het onder narcose aanbrengen van de, subcutane dan wel intra musculaire, implantaten en het maken van MRI-scans treedt weliswaar mild tot matig ongerief op, maar naar het oordeel van de DEC is gekozen voor de juiste onderzoeksstrategie en zijn deze handelingen noodzakelijk voor het bereiken van het gewenste doel. Het is niet mogelijk om dit onderzoek bij mensen uit te voeren en er zijn evenmin in vitro alternatieven beschikbaar. De DEC acht vertaling van de resultaten naar de mens mogelijk. Dit alles brengt de DEC tot het oordeel dat het gebruik van de dieren in dit project gerechtvaardigd is.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

- ☐ De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
- De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is.
 - De volgende doorslaggevende ethische bezwaren.
 - De volgende tekortkomingen in de aanvraag.
- ☐ De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
- Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.
 - Voor de uitvoering van dit project is tevens een ministeriële ontheffing vereist.
 - Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden.
- ☒ De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht
t.a.v. ASC
o.v.v CB.841910.3.01.011
Postbus 80011
3508 TA UTRECHT


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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD115002015111
Bijlagen

Datum 06-05-2015
Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 6 mei 2015
Vervaldatum: 5 juni 2015
Factuurnummer: 201570111

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvegrunning dierproeven	€ 741,00
Betreft aanvraag AVD115002015111	

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL28RBOS 056.99.96.066 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht



Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

www.zbo-ccd.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD115002015111

Bijlagen

2

Datum 06-05-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw ,

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 30 april 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD115002015111. 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. Zodra uw aanvraag compleet is, ontvangt u binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. 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 wordt uw aanvraag buiten behandeling 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.zbo-ccd.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: 11500

Naam instelling of organisatie: UMC Utrecht

Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde:

KvK-nummer: 302444197

Postbus:

Postcode en plaats: UTRECHT

IBAN:

Tenaamstelling van het
rekeningnummer: Universiteit Utrecht

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam:

Functie:

Afdeling:

Telefoonnummer:

E-mailadres:

Gegevens plaatsvervangende 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 april 2015
Geplande einddatum: 1 april 2017
Titel project: The role of osteogenic growth factors in bone replacement constructs.
Titel niet-technische samenvatting: De rol van groeifactoren in botregeneratie implantaten.
Naam DEC: DEC Utrecht
Postadres DEC: Postbus 85500 3508 GA Utrecht
E-mailadres DEC: dec-utrecht@umcutrecht.nl

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 741,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen: ☒ Projectvoorstel
☒ Beschrijving Dierproeven
☒ Niet-technische samenvatting
Overige bijlagen: ☒ DEC-advies
☒ Flowchart; brief tbv leges



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD115002015111

Bijlagen

2

Datum 06-05-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 6 mei 2015

Vervaldatum: 5 juni 2015

Factuurnummer: 201570111

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvegrunning dierproeven Betreft aanvraag AVD115002015111	€ 741,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL28RBOS 056.99.96.066 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.



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).
- 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.

Bone tissue has the capacity to heal perfectly, however when complicated fractures, pathological defects or large bone defects have to be bridged, healing processes may fail. This may be the result of insufficient blood supply, infections or even systemic disease may lead to non-unions. This causes the need for bone grafts or bone graft substitutes. Bone is frequently transplanted (over 2.2 million bone grafting procedures annually worldwide) and this is most successful for autologous bone, which unfortunately has several drawbacks such as limited availability and donor site pain. In bone regenerative medicine, much effort is paid to development of hybrid bone replacement grafts, in which the essential components for bone generation are all present. These components are: the cells that form the bone or their progenitors, a suitable osteoconductive biocompatible scaffold and the growth factors that guide new tissue formation, including efficient vascularization.

This project focuses on designing a bone replacement construct, which combines the most efficient set of (growth) factors and scaffolds, in which the scaffold also functions as a controlled delivery system.

Several factors, including growth factors with therapeutic potential have been identified, among which the bone morphogenetic proteins (BMPs) are the most promising as the proteins have shown excellent osteogenic capacity (1,2). Two of them, BMP-2 and BMP-7 are successfully being used in the clinic, especially in spinal fusion procedures. As the use of BMPs at very high dosages increased, many serious complications associated with these new growth factor-based technologies have emerged (7). Since 2011, doubt has been raised concerning the safety of BMPs due to the supraphysiological doses used, and this has led to the general notion that controlled delivery of BMPs at lower dosage is preferred (7-10). As such, this would ensure relevant bioactivity to be present locally at the defect site and at physiological concentrations (11).

BMPs are still the most potent growth factors to induce bone formation, and therefore all efforts are focused on improving the delivery methods and thereby lowering the dosage that is effective for bone formation, while increasing safety. For BMP-2, so far neither the therapeutic window nor the required timing and duration of BMP-2 release are known. Furthermore, it is not known how growth factor release timing affects early events such as cell recruitment and vascularization. Therefore, technologies to determine in vivo availability of the growth factors like BMP-2 have been developed by us and will be used to optimize its site-specific pharmacological actions and subsequent local tissue response. Because bone formation can only be achieved in living individuals, animal models are needed to determine the most optimal delivery strategy for BMPs (this holds true for BMP-2 and other BMPs). The animal models described here are sensitive to BMP treatment and are predictive for the clinical situation, although they show some limitations for translation due to their size. The experimental design is based on implantation of a so-called bone construct, which consists of a scaffold (i.e. carrier) and the growth factors (BMPs or combinations with other growth factors) embedded. The scaffolds are of different nature (polymer scaffolds, ceramic scaffolds or hydrogels) and were chosen based on their proven biocompatibility, biodegradability and binding/release of the BMPs. At the moment it is unknown which scaffold is best suited to stimulate bone formation with the different BMP-2 controlled release formulations.

Our group has wide experience with the application of each of these scaffolds and with the appropriate methods for analysis of bone formation therein (12,

18, 19).

Correlation of in vivo release profile to tissue response

Studying the effects of different release scenarios of BMP-2 protein on the local tissue response is complicated, as alterations to the growth factors release rate often require changes of the scaffold structure or composition, which will also influence the cellular response to the scaffold and subsequent bone formation. In previous studies we developed a composite formulation with polymer microspheres (i.e. PLGA) embedded in a hydrogel scaffold for bone regeneration which has the ability to tailor the BMP-2 release without changing the main scaffold structure (12). Whereas incorporation of BMP-2 in either the microspheres or the hydrogel allows tailoring of the growth factor release, the scaffold matrix components remain the same and differences in cellular responses and bone formation can be attributed to the growth factor pharmacokinetics. Furthermore, by using a radiolabeled BMP-2 in an in vivo set-up, it became clear that in vitro release profiles are not necessarily reflected in the in vivo availability of the released factor (12-16). This means that after careful selection of the most promising scaffold/delivery system, in vivo experimentation will be necessary to gain conclusions on eventual effectivity with respect to bone formation.

Burst release versus sustained release

It is still unknown which is the most efficient release profile for BMPs, and should those release profiles contain a burst release and/or a sustained release. The burst release scenario, which results in a high concentration of BMPs during the early days of implantation, assumes that a critical density of BMP responsive cells and a minimal concentration of BMPs are necessary to induce bone regeneration. In this scenario, BMP is considered an inductive agent which initiates the cascade of bone regeneration.

In a sustained release scenario, it is assumed that cell recruitment at the target site takes time. The surgical procedure and implanted biomaterial initiate an inflammatory response with the release of chemotactic factors that favour recruitment of mesenchymal stem cells (MSCs). The BMP release during the first few days contributes to this response as it stimulates the cytokine and growth factor response of local cells. In this scenario, bone regeneration is coordinated by multiple growth factors and cytokines each playing different roles at different stages. BMPs like BMP-2, -4 and -7 are acting as the differentiation factors, which guide tissue formation towards bone. In the sustained release scenario, the burst release of the majority of the BMP in the early days is considered ineffective as large amounts will be lost in the hematoma at the defect site. Therefore, it is necessary to gain knowledge on the actual requirement of the crucial growth factors like the BMPs within the first weeks of implantation.

Delivery of bone stimulatory growth factors through non viral gene therapy

A recently developed strategy to overcome the use of high doses of BMP-2 is BMP-2 gene therapy. Non-viral delivery of the growth factor encoding sequence, in the form of plasmid DNA, has proven to result in a relatively sustained delivery of protein. The non-viral approach has several advantages over viral gene therapy, most importantly the absence of immune reactivity to the vector, no recombination risks and a relatively transient expression pattern, which is suited for bone healing to occur. Non-viral gene therapy strategies for bone repair may either be through a direct in vivo approach, in which endogenous cells are the targets, or transgene delivery is performed ex vivo, whereafter the cells are placed in the bone construct. In previous work we have developed a non-viral gene therapy method in which alginate functions both as the scaffold and the transfection agent. In vitro analysis showed high transfection efficiencies, resulting in adequate transgene (i.e. BMP-2) expression and increasing protein levels over a period of five weeks. Mesenchymal stem cells (MSCs) non-virally transfected with the BMP-2 gene have shown efficient bone formation in a-thymic mice (18,19).

In order to translate this work further, this project aims to show effectivity in rats at different ectopic and orthotopic locations under a variety of conditions.

Characterization of early tissue response

Animal models have demonstrated the dose-dependent nature of BMP-2 treatment and its inflammatory response. (20) BMPs also have indirect chemotactic effects on lymphocytes and monocytes. (21) To obtain a better understanding of the cellular and tissue response to BMP treatment of serious bone defects, it

is important to study the early effects after growth factor exposure. Therefore, the present study will investigate the effect of different release strategies on the early inflammatory phase as well as the osteoinductive capacity of the construct over a longer period of time. In addition, as it is known that pro-inflammatory mediators may modulate bone formation positively, the interplay of inflammatory mediators and BMP-2 is being studied. The goal is to identify possible synergistic effects which stimulate bone formation and apply these in bone replacement construct design. For this purpose, ectopic rat and rabbit models of local inflammation in conjunction with bone formation, have been developed at our department. In this model a 'biomembrane' is induced which prevents the leakage of the studied growth factors and inflammatory compounds. Early screening studies are performed in rats, which also allow for screening in combination with more mechanistic studies. For this specific research line, the most effective combinations of BMP-2 and inflammatory mediators are subsequently tested in the available rabbit models. The rabbit offers the advantage that larger constructs can be tested and that its immune system is more comparable to humans. Therefore it is assumed to be a more clinically relevant model in the translation towards humans. In addition, the results obtained in the rabbit ectopic model can be validated in the orthotopic tibia model already used at our department.

1. TK Sampath, AH Reddi, Dissociative extraction and reconstitution of extracellular matrix components involved in local bone differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981, 78, 7599.
2. MR Urist, Bone: formation by autoinduction. *Science* 1965, 150, 893.
5. EJ Carragee, EL Hurwitz, BK Weiner, A critical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 trials in spinal surgery: emerging safety concerns and lessons learned. *Spine J* 2011, 11, 471.
6. SK Mirza, Commentary: Folly of FDA-approval studies for bone morphogenetic protein. *Spine J* 2011, 11, 495.
7. D Benglis, MY Wang, AD Levi, A comprehensive review of the safety profile of bone morphogenetic protein in spine surgery. *Neurosurgery* 2008, 62, ONS423.
8. LM Tumialan, J Pan, GE Rodts, PV Mummaneni, The safety and efficacy of anterior cervical discectomy and fusion with polyetheretherketone spacer and recombinant human bone morphogenetic protein-2: a review of 200 patients, *J Neurosurg Spine* 2008, 8, 529.
9. RD Dickerman, AS Reynolds, BC Morgan, J Tompkins, J Cattorini, M Bennett. rh-BMP-2 can be used safely in the cervical spine: dose and containment are the keys! *Spine J* 2007, 7, 508.
10. Committee for Medicinal Products for Human Use, E.M.A. scientific discussion for the approval of Osigraft. <http://www.emea.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/osigraft/039301en6.pdf>, 2004.
11. KR Garrison, S Donell, J Ryder, I Shemilt, M Mugford, I Harvey, F Song, Clinical effectiveness and cost-effectiveness of bone morphogenetic proteins in the non-healing of fractures and spinal fusion: a systematic review. *Health Technol Assess* 2007, 11, 1.
12. DHR Kempen, L.Lu, TE Hefferan, L Creemers, A Maran, KL Classic, WJA Dhert and MJ Yaszemski, Retention of in vitro and in vivo BMP-2 bioactivity in sustained delivery vehicles for bone tissue engineering, *Biomaterials* 2008;29:3245-52
13. PQ Ruhe, OC Boerman, FG Russel, AG Mikos, PH Spauwen, JA Jansen, In vivo release of rhBMP-2 loaded porous calcium phosphate cement pretreated with albumin. *J Mater Sci Mater Med* 2006, 17, 919.
14. BH Woo, BF Fink, R Page, JA Schrier, YW Jo, G Jiang, M DeLuca, HC Vasconez, PP DeLuca, Enhancement of bone growth by sustained delivery of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in a polymeric matrix. *Pharm Res* 2001, 18, 1747.
15. RH Li, ML Bouxsein, CA Blake, D D'Augusta, H Kim, XJ Li, JM Wozney, HJ Seeherman, rhBMP-2 injected in a calcium phosphate paste (alpha-BSM) accelerates healing in the rabbit ulnar osteotomy model. *J Orthop Res* 2003, 21, 997.
16. K Hori, C Sotozono, J Hamuro, K Yamasaki, Y Kimura, M Ozeki, Y Tabata, S Kinoshita, Controlled-release of epidermal growth factor from cationized gelatin hydrogel enhances corneal epithelial wound healing. *J Control Release*, 2007, 118, 169
17. Southwood, L.L., et al., Delivery of growth factors using gene therapy to enhance bone healing. *Vet Surg*, 2004. 33(6): p. 565-78.
18. Wegman, F., et al., Osteogenic differentiation as a result of BMP-2 plasmid DNA based gene therapy in vitro and in vivo. *Eur Cell Mater*, 2011. 21: p. 230-42; discussion 242.

19. Wegman, F., et al., Combination of bone morphogenetic protein-2 plasmid DNA with chemokine CXCL12 creates an additive effect on bone formation onset and volume. (manuscript in preparation).
20. J Zara, RK Siu, X Zhang, J Shen, R Ngo, M Lee, et al. High doses of BMP-2 induce structurally abnormal bone and inflammation in vivo. Tissue Eng Part A 2011, 17, 1389
21. KB Lee, SS Murray, CE Taghavi, KJ Song, EJ Brochmann, JS Johnson, et al. Bone morphogenetic protein binding peptide reduces the inflammatory response to BMP-2 and BMP-7 in a rodent model of soft-tissue inflammation. Spine J 2011, 11, 568

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 purpose of this project is to obtain knowledge with respect to optimal growth factor delivery in order to design optimal bone replacement constructs.

Aim 1: Correlate BMP-2 release profiles with early and late tissue formation

- Describe early responses for the designed constructs and correlate the differences to the various release profiles.
- Integrate early tissue response information in new bone construct design.
- Select most effective BMP-2 pharmacokinetic profile for in vivo bone formation.

Aim 2: Translate BMP non viral gene therapy to rat ectopic and orthotopic bone formation

- Assess effectiveness of BMP non viral gene delivery on bone formation in a ectopic and orthopic environment.
- Define optimal conditions with respect to construct composition.

Aim 3: To study the combined effects of proinflammatory mediators and BMP-2 on bone formation

Aim 1:

We will proceed on a project performed by us at the [REDACTED], in which different hydrogel/scaffold constructs were designed and tested for their pharmacokinetic profile. Using radiolabeled growth factor, in vivo retention of BMP-2 was measured for various formulations, leading to selection of constructs with either a burst release or a sustained release profile.

The selected constructs will now be further investigated in detail in a subcutaneous rat model, whereby release profile will be correlated to both early responses (tissue reaction, vascularization) and late responses (bone formation). Finally a rat model, in which a femoral defect will be treated with constructs generating various release profiles of BMP-2, will be used to study effectiveness of the constructs in bone healing.

Aim 2:

BMP non viral gene therapy has been subject of investigation in our group during the last 5 years, and this has lead to in-depth knowledge on this matter. Transgene expression in vitro and subsequent bone formation in a-thymic mouse models has recently been shown. In order to translate this knowledge further, several steps have to be taken: effectiveness of this strategy in a rat model with a normal immune system has to be investigated, and subsequently, this strategy has to be investigated in a critical size bone defect. The rat femoral defect model was chosen as it is very reproducible and robust, allows

longitudinal monitoring using micro CT, and could be combined with ectopic implants, functioning both as internal control and to gain knowledge on the use of different construct compositions.

Aim 3:

In the in vivo situation, bone stimulating factors such as [REDACTED] In line with this, [REDACTED] on the differentiation of mesenchymal stem cells into bone forming cells. If synergistic effects indeed occur in vivo, the [REDACTED]

To test the hypothesis that these factors can be used for bone regeneration, their effects will be studied in previously used rat and rabbit models of bone formation. Early screening studies are performed in rats, which also allow for screening in combination with more mechanistic studies. For follow-up studies, the rabbit model offers the advantage that larger constructs can be tested and that its immune system is more comparable to humans. In addition, the results obtained in the rabbit ectopic model can be validated in the orthotopic tibia model already used at our department.

These aims are achievable within two years:

[REDACTED] has a longstanding expertise in bone research, and all necessary equipment, infrastructure and trained surgeons to perform and guide the project are in place. [REDACTED] extensively tested the polymers used in the proposed project.

Three PhD candidates will work on both projects, therefore enough manpower will be present to do all the work needed.

3.3 Relevance

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

Bone is, after blood, the most commonly transplanted tissue worldwide. The diverse clinical needs for bone regeneration include application after resection of primary and metastatic tumors, bone loss after skeletal trauma, total joint arthroplasty with bone deficiency, spinal fusion, and trabecular voids. To date, close to 2.2 million bone substitution procedures are performed worldwide each year and given our aging population, this number is expected to increase. The standard and currently most effective treatment for bone defects consists of transplantation of autologous bone. However, the weakness of autograft is its limited supply, donor site morbidity, additional surgical time and difficulty to be modeled into desired shapes. These disadvantages of autograft treatments drive the quest for alternative methods to reconstruct large bone defects.

Bone regeneration based on the delivery of growth factors is an emerging field within tissue engineering research, which has evolved tremendously over the past decades and has the potential to revolutionize bone regeneration strategies. Due to a limited understanding of the biological actions of growth factors and the current clinical experience with BMP-based therapies with serious product-related adverse events, growth factor-based bone regeneration is still under heavy pressure. The challenge facing researchers today is to optimize growth factor delivery, lowering the growth factor dosage and to create the appropriate local environment for bone regeneration within the delivery vehicle. Eventually, this will ensure that patients can safely benefit from these new bone regeneration strategies in future clinical applications. Among the BMP isotypes known to stimulate bone formation, BMP-2 is best studied, also by our group, and therefore the BMP isotype that we focus on initially. Because we have indications that combined delivery with other BMPs (such as BMP-7) or with other growth factors is beneficial to promote bone formation (unpublished results), combined testing will also be performed.

Within the Orthopedics department, researchers and clinicians have worked together for more than a decade to tackle the challenge of bone tissue engineering. We have combined in vitro work with preclinical work in several animal models, and are convinced that the route from small animal models for the initial screenings of most optimal constructs and subsequently testing these in bony defects in larger animal models, is the preferred route to clinical

translation. Our department has brought several products to the clinic and is involved in many clinical trials.

3.4 Research strategy

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

Three interconnected aims are described for this project. To investigate these aims a subcutaneous rat model, a subcutaneous combined with an orthotopic rat model and an intramuscular rat and rabbit model are needed. Furthermore, a rabbit intramuscular pocket model is used, as it ensures local effects of inflammatory mediators.

Aim 1: Correlate BMP-2 release profiles with early and late tissue formation

Previous studies have shown that the correlation between in vitro and in vivo BMP-2 release kinetics is very weak (1). A pharmacokinetic study performed at

in a subcutaneous rat model. This proven in vivo BMP-2 release profiles will be used to further investigate the early tissue response of BMP-2 burst and sustained release in a subcutaneous rat model.

Previous studies have shown that other growth factors and cytokines have synergistic activity with BMP-2 (2). Unfortunately little is known about their in vivo cell response mechanism. Based on the results of the early tissue response study, other enhancement and inhibitory factors will be identified which are involved in the early phase of BMP-2 induced bone regeneration. These factors will be investigated in a subcutaneous rat model.

The logical final step will be to investigate the pharmacokinetics of BMP-2 of an optimized construct in an orthotopic rat model.

Aim 2: Translate BMP non viral gene therapy to rat ectopic and orthotopic bone formation

Previous work in our group has shown the potential of BMP non viral gene therapy via the transfection method that was optimized at our facility. This gene therapy method has resulted in prolonged transgene expression, BMP production and bone formation in a-thymic mouse models. The immune system has a big influence on gene therapy efficiency as we know from literature. Now the first step is to test different concentrations of plasmid DNA and different combinations of genes and or different target cells in a normothymic model. Subsequently we aim to test the optimized constructs in a orthotopic environment.

The first part therefore consists of a subcutaneous rat screening model in and the logical final step would be to test these optimized constructs in a orthotopic location in the same rat model; the femoral defect.

Aim 3: Study of cross-talk between inflammatory mediators and BMP-2

To study multiple conditions of inflammatory mediators in a single animal, it is of importance that the substances used will remain local. This has been achieved by introducing a pocket model which may be applied subcutaneously and intramuscularly. By placement of inert spacers (Masquelet technique), a biological membrane is formed, which can be filled with test constructs for bone regeneration and closed by sutures. This model has been developed in our group (unpublished results) and will be used to study a limited set of mediators in combination with BMP-2. Primary outcome will be bone formation, measured by histomorphometry. Furthermore, immune responses (blood parameters) and cellular effects are investigated by immunohistochemistry.

1. DHR Kempen, L.Lu, TE Hefferan, L Creemers, A Maran, KL Classic, WJA Dhert and MJ Yaszemski, "Retention of in vitro and in vivo BMP-2 bioactivity in sustained delivery vehicles for bone tissue engineering," *Biomaterials* 2008:29:3245-52

2. DHR Kempen, L Lu, A Heijink, TE Hefferan, LB Creemers, A Maran, MJ Yaszemski, WJA Dhert, "Effect of local sequential VEGF and BMP-2 delivery on ectopic and orthotopic bone regeneration", *Biomaterials* 2009:30:2816-25

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.

Aim 1: Correlate BMP-2 release profiles with early and late tissue formation

The early tissue response of BMP-2 release profiles will be analyzed after 1 and 2 weeks of subcutaneous implantation. In vivo tissue response and bioactivity is determined by microCT (for bone formation), histology, immunohistochemistry and molecular biology techniques for gene expression such as polymerase chain reaction (PCR).

Enhancement/inhibition factors identified in the early tissue response study will be investigated using a subcutaneous rat model. These enhancement or inhibitory factors will be absorbed in the hydrogel. Since it takes time before bone tissue is formed, investigation of these synergetic or inhibitory effects at a late timepoint provides valuable information on the importance of these pathways during the regeneration process. Tissue formation is determined by microCT and histology.

Since osteoconduction and periosteal bone formation will act as disturbing mechanism on bone formation, BMP-2 release profiles will be compared in an orthotopic site. Bone formation will be analyzed in an orthotopic rat model by microCT and histology.

Aim 2: Translate BMP non-viral gene therapy to rat ectopic and orthotopic bone formation

Different concentrations of plasmid DNA and different combinations of genes and or different target cells are studied in a normothymic subcutaneous rat model. Tissue formation is determined by microCT and histology.

Since osteoconduction and periosteal bone formation will influence bone formation, the best performing construct from the first study will be compared in an orthotopic site. Bone formation will be analyzed in an orthotopic rat model by microCT and histology.

Aim 3: The role of inflammatory mediators in BMP-2 induced bone formation

Previous in vitro and ongoing in vivo work have identified a limited set of inflammatory mediators with bone promoting characteristics. Dosage information from the ongoing study will be used to design constructs in which release timing and synergism with BMP-2 will be studied. We have experienced that rats, due to their size, are the smallest animal model which allows for screening of various conditions within the same animal. Furthermore, we have observed that conditions in the intramuscular and the subcutaneous environment can be tested in parallel in rats. Therefore, first relatively small samples are studied in rats to screen for the optimal construct. The rat model hereby offers the advantage that more analytical tools are available for this species (e.g. ELISAs, antibodies), allowing for more mechanistic studies such as quantification of the early inflammatory response. In the next phase, larger, more clinically relevant sized samples can be tested in rabbits, as the pocket model has already been optimized for both rats and rabbits. The rabbit model offers a second advantage that its immune system is more comparable to humans than rodents. Therefore, physiological concentrations inflammatory mediators can be tested together with BMP-2. Moreover, in rabbits, an orthotopic tibia model is developed for implant-related infection/inflammation studies, and is used here as it represents a clinical situation.

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 overall purpose of the project is to obtain more knowledge with respect to optimal (growth) factor release timing for bone replacement constructs. All aims evaluate growth factor based bone tissue engineering and focus on better understanding of the biological activity of these growth factors. Furthermore, the efficiency of several growth factor delivery methods is investigated and their possible interaction with local tissue or immune mediators is investigated. Different rat models are used, i.e. Sprague Dawley and Fischer 344, for BMP-2 release and BMP-2 gene therapy/inflammation studies, respectively. We have experience with both models at our department. The choice of the Fischer 344 rats is based on their inbred nature, allowing for the syngeneic transplantation of mesenchymal stem cells without rejection by the immune system. Cell transplantation is not performed in the BMP-2 release studies.

Therefore, the outbred Sprague Dawley model is used to maximize comparability and reproducibility with previous release experiments performed at the [REDACTED]

Multiple studies focusing on the osteogenic potential of BMPs in rats have shown that inter-species differences are minimal. We therefore believe that the results obtained with the different rat models can be compared.

Coherence aim 1

First the early tissue response of BMP-2 release profiles is investigated in a subcutaneous rat model. This study will provide data for BMP-2 inhibitory or enhancement factors in the second subcutaneous study. In the same rat model a bone defect will be created to test the BMP-2 release profiles in an orthotopic site.

Coherence aim 2

First different constructs components are analysed in a subcutaneous screening model. If bone formation is observed in any of these constructs/conditions the mile stone is reached and the consecutive study is performed, in which in the same rat model the construct is investigated in a orthotopic location.

Coherence aim 3

Knowledge from ongoing screening studies will be used as it provides dosage information. These results will feed into this aim to design optimal combinations with known bone stimulatory BMP-2. The rat model, due to its size and the availability of most analytical tools for this species, offers the advantage that screening studies can be combined with more mechanistic studies. The most optimal construct from rat studies will then be translated to rabbits, as their immune system is more comparable to human. It is thought that this allows for testing of more physiological concentrations of inflammatory mediators in combination with BMP-2. Furthermore, a model is available in rabbits involving a more clinically relevant orthotopic location.

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	Subcutaneous rat model
2	Subcutaneous + orthotopic rat model
3	Intramuscular pockets in rats and rabbits, combined with orthotopic model in rabbits
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: UMC Utrecht
 Adres: Postbus 12007
 Postcode en woonplaats: 3501 AA Utrecht
 Deelnemersnummer: 11500

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 juli 2015 tot en met 30 juni 2017, voor het project 'The role of osteogenic growth factors in bone replacement constructs' met aanvraagnummer AVD115002015111, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Utrecht.

De functie van de verantwoordelijke onderzoeker is [REDACTED].

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen bij digitale indiening op 30 april 2015 en per post aangepast op 7 mei 2015;
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 30 april 2015;
 - b. Niet-Technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 30 april 2015;
 - c. Advies van dierexperimentencommissie DEC Utrecht d.d. 28 april 2015 en ontvangen op 30 april 2015.

Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst
Subcutaneous rat model	- Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) / Male Harlan Sprague Dawly; Male Fischer 344 (IcoCrl)	35: - 20 Harlan Sprague Dawly mannelijk ratten; - 15 Fischer 344 (IcoCrl) mannelijke ratten;	Licht
Subcutaneous + orthotopic rat model	- Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) / Male Harlan Sprague Dawly; Male Fischer 344 (IcoCrl)	143: - 88 Harlan Sprague Dawly mannelijk ratten; - 55 Fischer 344 (IcoCrl) mannelijke ratten;	Matig
Intramuscular pockets in rats and rabbits, combined with orthotopic model in rabbits	- Konijnen (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) / mannelijke en vrouwelijke New Zealand White - Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) / male Fischer 344 (IcoCrl)	62 konijnen: mannelijke en vrouwelijke New Zealand White 12 ratten: Fischer 344 (IcoCrl) mannelijke ratten;	Matig

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 blijven schade zal blijven

Datum

12 juni 2015

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD115002015111

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.

Van: ZBO-CCD
Verzonden: woensdag 6 mei 2015 12:06
Aan: [REDACTED]@umcutrecht.nl'; 'info@ivd-utrecht.nl'
CC: [REDACTED]@umcutrecht.nl'; [REDACTED]umcutrecht.nl'
Onderwerp: Aangepaste adresgegevens factuur aanvrag AVD115002015111
Bijlagen: Factuur AVD115002015111.pdf

Geachte heren,

Hier ontvangt u de aangepaste factuur (adresgegevens).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Centrale Commissie Dierproeven www.zbo-ccd.nl

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

T: 0900 2800028

E: ZBO-CCD@minez.nl

Van: ZBO-CCD
Verzonden: dinsdag 2 juni 2015 12:14
Aan: [REDACTED]@umcutrecht.nl
CC: info@ivd-utrecht.nl; [REDACTED]@umcutrecht.nl; [REDACTED]@umcutrecht.nl
Onderwerp: Aanvullende informatie aanvraag AVD115002015111
Bijlagen: Aanvullende informatie AVD115002015111.pdf

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw project aanvraag "The role of osteogenic growth factors in bone replacement constructs" op 30 april 2015 ontvangen en in behandeling genomen. Over uw aanvraag hebben wij nog aanvullende informatie nodig. In bijgaande brief vind u onze vragen.

We hebben de leges voor uw aanvraag ontvangen.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

Uitvoeringsexpert

Centrale Commissie Dierproeven www.zbo-ccd.nl

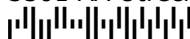
.....
Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag
.....

T: 0900 2800028

E: ZBO-CCD@minez.nl



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht
Prof. dr. F. Miedema
t.a.v. Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht
Postbus 12007
3501 AA Utrecht


**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.zbo-ccd.nl

T 0900-28 000 28 (10 ct /min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD115002015111

Datum 2 juni 2015
Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

Bijlagen
1

Geachte ,

Op 30 april 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'The role of osteogenic growth factors in bone replacement constructs' met aanvraagnummer AVD115002015111. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

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

Onduidelijkheden

In uw aanvraag geeft u aan gebruik te maken van zowel konijnen als ratten. Voor konijnen gaat u zowel mannelijke als vrouwelijk dieren gebruiken, terwijl voor ratten alleen mannelijke dieren gebruikt gaan worden. De onderbouwing voor de keuze om alleen mannelijke ratten te gebruiken ontbreekt. De commissie zou graag een goed onderbouwde motivering voor uw keuze willen ontvangen.

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

Opsturen binnen veertien dagen

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via NetFTP. Stuurt u het per post op, gebruik dan het formulier dat u bij deze brief krijgt.

Wanneer een beslissing

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

Meer informatie

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

Datum

2 juni 2015

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD115002015111

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlage:

- formulier Melding Bijlagen via de post



Melding

Bijlagen via de post

- U wilt één of meerdere bijlagen naar ons versturen? Voeg *altijd* deze Melding Bijlagen toe. Wij weten dan welke documenten van u zijn en hoeveel documenten u opstuurt.
- Meer informatie vindt u op www.zbo-ccd.nl
- Of bel met ons: 0900 28 000 28 (10 ct/min).

1 Uw gegevens

- 1.1 Vul de gegevens in.
- | | | | |
|----------------|--|------------|--|
| Naam aanvrager | | | |
| Postcode | | Huisnummer | |
- 1.2 Bij welke aanvraag hoort de bijlage?
Het aanvraagnummer staat in de brief of de ontvangstbevestiging.
- | | | | |
|----------------|--|--|--|
| Aanvraagnummer | | | |
|----------------|--|--|--|

2 Bijlagen

- 2.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
Vul de naam of omschrijving van de bijlage in.
- | | |
|--------------------------|--|
| ☐ | |
| ☐ | |
| ☐ | |

3 Ondertekening

- 3.1 Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:
- | | | | |
|--------------|---|---|----|
| Naam | | | |
| Datum | - | - | 20 |
| Handtekening | | | |
- Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Van: ZBO-CCD
Verzonden: donderdag 7 mei 2015 13:31
Aan: [REDACTED]@umcutrecht.nl; info@ivd-utrecht.nl
CC: [REDACTED]@umcutrecht.nl; [REDACTED]@umcutrecht.nl
Onderwerp: Acceptatiebrief aanvraag AVD115002015111
Bijlagen: AcceptatieBrief-AVD115002015111.pdf

Geachte heren,

Bijgaand de acceptatiebrief voor aanvraag AVD115002015111 die vandaag ook per post is verzonden aan [REDACTED]
[REDACTED] t.a.v. IVD Utrecht.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Centrale Commissie Dierproeven www.zbo-ccd.nl

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

T: 0900 2800028

E: ZBO-CCD@minez.nl

[REDACTED]

Van: [REDACTED]
Verzonden: dinsdag 9 juni 2015 15:25
Aan: [REDACTED]@uu.nl
CC: info@ivd-utrecht.nl; [REDACTED]@umcutrecht.nl
Onderwerp: dubbel betaling aanvraag projectvergunning AVD115002015111

Geachte heer/ mevrouw,

Op 29 mei 2015 hebben we een betaling ontvangen voor €741 euro op factuurnummer 201570111 horend bij de aanvraag AVD115002015111. De bankrekening waarvan het geld is overgemaakt is NL69RABO0143774735 op naam van Univers. Med. Centrum.

Op 8 juni 2015 hebben we een andere betaling ontvangen voor dezelfde factuur vanaf de bankrekening NL04ABNA0555129063 op naam van Universiteit Utrecht.

We vragen ons af of ergens een fout is gemaakt en dezelfde factuur per ongeluk dubbel is betaald, of de tweede betaling toevallig bij een andere factuur hoort (misschien 201570113)?

Alvast hartelijk bedankt voor uw antwoord.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]
Uitvoeringsexpert

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028

E: ZBO-CCD@minez.nl

[REDACTED]

Van: ZBO-CCD
Verzonden: dinsdag 9 juni 2015 11:49
Aan: [REDACTED]
Onderwerp: AVD115002015111

Hoi,

Er is een betaling binnengekomen van deze aanvrager op 8 juni.
Op de 29 mei hebben zij de factuur al betaald.
Waarschijnlijk hebben ze nu dubbelbetaald.
Kan jij contact met ze opnemen hierover.

Thanks.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven www.zbo-ccd.nl
Nationaal Comité advies dierproevenbeleid www.ncadierproevenbeleid.nl

.....
Bezuidenhoutseweg 73 | 2500 EK | Den Haag
Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag
.....

T: [REDACTED]
E: [REDACTED]@rvo.nl

[REDACTED]

Van: [REDACTED]
Verzonden: woensdag 6 mei 2015 11:29
Aan: ZBO-CCD
Onderwerp: RE: Factuur aanvraag projectvergunning/ o.v.v. CB.841910.3.01.011
Bijlagen: Factuur AVD115002015111.pdf

Categorieën: Dossierhouder: [REDACTED]

Beste,

Factuur is geadresseerd aan UMC Utrecht.
Daar doen wij de administratie niet van.
Mocht deze factuur voor de Universiteit Utrecht zijn, dan verzoeken wij het adres te weisigen in:

Universiteit Utrecht
t.a.v. ASC
Postbus 80011
3508 TA Utrecht

Hoop u hierbij voldoende te hebben geïnformeerd.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED] | Administratief Service Centrum - Directie Financiën, Control &
Administratie | Universiteit Utrecht | Heidelberglaan 8 | kamernummer [REDACTED] | ✉ Postbus 80011, 3508 TA Utrecht
☎ 030-[REDACTED] | 📠 [REDACTED] | @ E-mail: [REDACTED] | 🌐 <http://www.uu.nl> | aanwezig op: maandag t/m vrijdag van
08.00 t/m 16.30 uur



Denk aan het Milieu. Printen is niet altijd nodig.

Van: ZBO-CCD [<mailto:ZBO-CCD@minez.nl>]
Verzonden: woensdag 6 mei 2015 10:51
Aan: U [REDACTED]
Onderwerp: Factuur aanvraag projectvergunning/ o.v.v. CB.841910.3.01.011

Geachte heer/mevrouw,

Na aanleiding van uw verzoek sturen wij bij deze de factuur voor een nieuwe aanvraag projectvergunning, o.v.v. CB.841910.3.01.011 (uw referentie).

Uw wordt vriendelijk verzocht om de leges binnen de vermelde termijn over te maken.

De factuur is ook naar de aanvrager en de verantwoordelijke onderzoeker verstuurd.

De factuur wordt automatisch gegenereerd met de gegevens van de aanvrager.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Centrale Commissie Dierproeven www.zbo-ccd.nl

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

T: 0900 2800028

E: ZBO-CCD@minez.nl

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

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

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

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

[REDACTED]

Van: ZBO-CCD
Verzonden: woensdag 6 mei 2015 12:02
Aan: [REDACTED]
Onderwerp: RE: Factuur aanvraag projectvergunning/ o.v.v. CB.841910.3.01.011
Bijlagen: Factuur AVD115002015111.pdf

Beste,

Bij deze de aangepaste factuur.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Centrale Commissie Dierproeven www.zbo-ccd.nl

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

T: 0900 2800028

E: ZBO-CCD@minez.nl

Van: [REDACTED] uu.nl

Verzonden: woensdag 6 mei 2015 11:29

Aan: ZBO-CCD

Onderwerp: RE: Factuur aanvraag projectvergunning/ o.v.v. CB.841910.3.01.011

Beste,

Factuur is geadresseerd aan UMC Utrecht.

Daar doen wij de administratie niet van.

Mocht deze factuur voor de Universiteit Utrecht zijn, dan verzoeken wij het adres te weisgen in:

Universiteit Utrecht

t.a.v. ASC

Postbus 80011

3508 TA Utrecht

Hoop u hierbij voldoende te hebben geïnformeerd.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED] | Administratief Service Centrum - Directie Financiën, Control & Administratie | Universiteit Utrecht | Heidelberglaan 8 | kamernummer [REDACTED] | ✉ Postbus 80011, 3508 TA Utrecht
☎ 030-253 4[REDACTED] | 📠 030-[REDACTED] | @ E-mail: [REDACTED] f@uu.nl | 🌐 <http://www.uu.nl> | aanwezig op: maandag t/m vrijdag van 08.00 t/m 16.30 uur



Denk aan het Milieu. Printen is niet altijd nodig.

Van: ZBO-CCD [<mailto:ZBO-CCD@minez.nl>]

Verzonden: woensdag 6 mei 2015 10:51

Aan: [REDACTED]

Onderwerp: Factuur aanvraag projectvergunning/ o.v.v. CB.841910.3.01.011

Geachte heer/mevrouw,

Na aanleiding van uw verzoek sturen wij bij deze de factuur voor een nieuwe aanvraag projectvergunning, o.v.v. CB.841910.3.01.011 (uw referentie).

Uw wordt vriendelijk verzocht om de leges binnen de vermelde termijn over te maken.

De factuur is ook naar de aanvrager en de verantwoordelijke onderzoeker verstuurd.

De factuur wordt automatisch gegenereerd met de gegevens van de aanvrager.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Centrale Commissie Dierproeven www.zbo-ccd.nl

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

T: 0900 2800028

E: ZBO-CCD@minez.nl

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

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

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

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

[REDACTED]

Van: Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht <info@ivd-utrecht.nl>
Verzonden: donderdag 7 mei 2015 11:42
Aan: ZBO-CCD; Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht
CC: [REDACTED]@umcutrecht.nl
Onderwerp: RE: t.a.v. dhr. [REDACTED] betreft aanvraag projectvergunning AVD115002015111
Bijlagen: Ondertekend aanvraagformulier [REDACTED].pdf;
aanvraagformulier_projectvergunning_dierproeven_1 - UMCU-3-1-3 update.pdf

Geachte mevrouw [REDACTED]

Naar aanleiding van uw e-mail kan ik u als volgt antwoorden

Ad 1. Het ondertekende aanvraagformulier is een aantal dagen geleden per post verzonden. Bijgaand vind u een gescande versie van het ondertekende en gedateerde formulier.

Ad 2. Per abuis meldt u dat in het digitale aanvraagformulier is vermeld dat er een gemachtigde is. Er is op het formulier echter niet aangegeven, dat er een gemachtigde is en dus ook niet dat er een bijbehorende bijlage meegestuurd zou worden.

Ad 3. De vermelde aanvangsdatum is inderdaad achterhaald. [REDACTED] heeft aangegeven, dat de startdatum nu op **1-7-2015** is gesteld en de einddatum op **1-7-2017** (zie de aangepaste data in de 2^e bijlage).

Ik hoop u op deze wijze voldoende geïnformeerd te hebben.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

[REDACTED] • [REDACTED] • Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht • Bolognalaan 50 • kamer [REDACTED] • 3584 CJ Utrecht •
www.ivd-utrecht.nl • [REDACTED]@uu.nl • +31 (0)30 [REDACTED] • 06 [REDACTED] •

Gebruik info@ivd-utrecht.nl voor algemene vragen.



From: ZBO-CCD [<mailto:ZBO-CCD@minez.nl>]
Sent: woensdag 6 mei 2015 16:38
To: Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht
Cc: [REDACTED]@umcutrecht.nl
Subject: t.a.v. dhr. [REDACTED] betreft aanvraag projectvergunning AVD115002015111

Geachte heer [REDACTED]

Op 30 april 2015 hebben we een aanvraag voor een projectvergunning van UMC ontvangen met de titel "The role of osteogenic (growth) factors in bone replacement constructs", met aanvraagnummer AVD115002015111.

In de brief die u mee hebt gestuurd vraagt u om verdere correspondentie gerelateerd aan deze aanvraag aan de IvD Utrecht te verzenden. Dus stellen we u de volgende vragen.

1) In de brief meldt u dat het ondertekende aanvraagformulier wordt per post verstuurd. Tot nu toe hebben we geen formulier per post ontvangen, dus willen we graag weten of het formulier al verstuurd is en wanneer kunnen we het verwachten.

2) In het digitale aanvraagformulier is vermeld dat er een gemachtigde is, maar u heeft geen machtiging mee gestuurd. Komt die ook ondertekend per post? Wij hebben de machtiging en de gegevens van de gemachtigde nodig.

3) Op het aanvraagformulier en de NTS staat 1-04-2015 als begindatum van het project. Omdat de begindatum niet in de verleden kan zijn, willen we u vriendelijk vragen om de begindatum en einddatum, indien van toepassing, te veranderen en aan ons schriftelijk bekend te maken via een email, of een aangepaste digitale versie van het aanvraagformulier en NTS. Een project kan niet worden opgestart vóór dat de vergunning verleend is.

We hopen snel een reactie van uw te mogen ontvangen.

Pas als de aanvraag compleet is kunnen we haar verder in behandeling nemen; het betekent ook dat de klok stil staat.

Mocht u nog vragen hebben, dan hoor ik dat graag.

Met vriendelijke groet,


Uitvoeringsexpert

Centrale Commissie Dierproeven

Centrale Commissie Dierproeven www.zbo-ccd.nl

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

T: 0900 2800028

E: ZBO-CCD@minez.nl

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

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

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

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

[REDACTED]

Van: ZBO-CCD
Verzonden: donderdag 7 mei 2015 12:52
Aan: 'Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht'
Onderwerp: RE: t.a.v. dhr. [REDACTED] betreft aanvraag projectvergunning AVD115002015111

Geachte heer [REDACTED]

Hartelijk bedankt voor uw snelle reactie.

Vanochtend is het aanvraagformulier met de natte handtekening binnengekomen.

Met betrekking tot de gemachtigde: in de digitale versie van het aanvraagformulier dat wij samen met de andere documenten op 30 april hebben ontvangen staat "Ja" aangekruist bij de vraag of er een gemachtigde is, maar het kan zijn dat door het feit dat er de invulbare pdf was, heeft iemand per ongeluk verkeerd ingedrukt later in het proces. In ieder geval, dank u voor het verduidelijken.

Met vriendelijk groet,

[REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven

Centrale Commissie Dierproeven www.zbo-ccd.nl

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

T: 0900 2800028

E: ZBO-CCD@minez.nl

Van: Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht [mailto:info@ivd-utrecht.nl]

Verzonden: donderdag 7 mei 2015 11:42

Aan: ZBO-CCD; Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht
[REDACTED]@umcutrecht.nl

Onderwerp: RE: t.a.v. dhr. [REDACTED] betreft aanvraag projectvergunning AVD115002015111

Geachte mevrouw [REDACTED]

Naar aanleiding van uw e-mail kan ik u als volgt antwoorden

Ad 1. Het ondertekende aanvraagformulier is een aantal dagen geleden per post verzonden. Bijgaand vind u een gescande versie van het ondertekende en gedateerde formulier.

Ad 2. Per abuis meldt u dat in het digitale aanvraagformulier is vermeld dat er een gemachtigde is. Er is op het formulier echter níet aangegeven, dat er een gemachtigde is en dus ook niet dat er een bijbehorende bijlage meegestuurd zou worden.

Ad 3. De vermelde aanvangsdatum is inderdaad achterhaald. [REDACTED] heeft aangegeven, dat de startdatum nu op **1-7-2015** is gesteld en de einddatum op **1-7-2017** (zie de aangepaste data in de 2^e bijlage).

Ik hoop u op deze wijze voldoende geïnformeerd te hebben.

Met vriendelijke groet,

Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht • Bolognalaan 50 • kamer • 3584 CJ Utrecht •
www.ivd-utrecht.nl • +31 (0)30 9 06

Gebruik info@ivd-utrecht.nl voor algemene vragen.



From: ZBO-CCD [<mailto:ZBO-CCD@minez.nl>]
Sent: woensdag 6 mei 2015 16:38
To: Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht
Cc: @umcutrecht.nl
Subject: t.a.v. dhr. betreft aanvraag projectvergunning AVD115002015111

Geachte heer

Op 30 april 2015 hebben we een aanvraag voor een projectvergunning van UMC ontvangen met de titel "The role of osteogenic (growth) factors in bone replacement constructs", met aanvraagnummer AVD115002015111.

In de brief die u mee hebt gestuurd vraagt u om verdere correspondentie gerelateerd aan deze aanvraag aan de IvD Utrecht te verzenden. Dus stellen we u de volgende vragen.

1) In de brief meldt u dat het ondertekende aanvraagformulier wordt per post verstuurd. Tot nu toe hebben we geen formulier per post ontvangen, dus willen we graag weten of het formulier al verstuurd is en wanneer kunnen we het verwachten.

2) In het digitale aanvraagformulier is vermeld dat er een gemachtigde is, maar u heeft geen machtiging mee gestuurd. Komt die ook ondertekend per post? Wij hebben de machtiging en de gegevens van de gemachtigde nodig.

3) Op het aanvraagformulier en de NTS staat 1-04-2015 als begindatum van het project. Omdat de begindatum niet in de verleden kan zijn, willen we u vriendelijk vragen om de begindatum en einddatum, indien van toepassing, te veranderen en aan ons schriftelijk bekend te maken via een email, of een aangepaste digitale versie van het aanvraagformulier en NTS. Een project kan niet worden opgestart vóór dat de vergunning verleend is.

We hopen snel een reactie van uw te mogen ontvangen.

Pas als de aanvraag compleet is kunnen we haar verder in behandeling nemen; het betekent ook dat de klok stil staat.

Mocht u nog vragen hebben, dan hoor ik dat graag.

Met vriendelijke groet,

Uitvoeringsexpert

Centrale Commissie Dierproeven

Centrale Commissie Dierproeven www.zbo-ccd.nl

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

T: 0900 2800028

E: ZBO-CCD@minez.nl

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

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

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

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

Van: ZBO-CCD
Verzonden: vrijdag 12 juni 2015 10:39
Aan: 'dec-utrecht@umcutrecht.nl'
Onderwerp: Terugkoppeling beslissing aanvraag AVD115002015111 (uw referentie 2015.II.115.002)

Geachte heer/mevrouw,

Op 28 april 2015 heeft de DEC Utrecht advies uitgebracht aan de CCD betreffende het project "The role of osteogenic growth factors in bone replacement constructs", uw kenmerk: 2015.II.115.002. Wij danken u voor uw advies, en koppelen graag het oordeel van de CCD over deze aanvraag aan u terug.

De CCD heeft nog een vraag aan de aanvrager gesteld:

"In uw aanvraag geeft u aan gebruik te maken van zowel konijnen als ratten. Voor konijnen gaat u zowel mannelijke als vrouwelijk dieren gebruiken, terwijl voor ratten alleen mannelijke dieren gebruikt gaan worden. De onderbouwing voor de keuze om alleen mannelijke ratten te gebruiken ontbreekt. De commissie zou graag een goed onderbouwde motivering voor uw keuze willen ontvangen."

De aanvrager heeft een goed onderbouwd en overtuigend antwoord gegeven.

De CCD heeft besloten de vergunning, overeenkomstig uw advies, te verlenen. De aanvrager en verantwoordelijk onderzoeker zijn hierover ingelicht.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028

E: ZBO-CCD@minez.nl

[REDACTED]

Van: ZBO-CCD
Verzonden: woensdag 6 mei 2015 16:38
Aan: info@ivd-utrecht.nl
CC: [REDACTED]@umcutrecht.nl
Onderwerp: t.a.v. dhr. [REDACTED] betreft aanvraag projectvergunning AVD115002015111

Geachte heer [REDACTED]

Op 30 april 2015 hebben we een aanvraag voor een projectvergunning van UMC ontvangen met de titel "The role of osteogenic (growth) factors in bone replacement constructs", met aanvraagnummer AVD115002015111.

In de brief die u mee hebt gestuurd vraagt u om verdere correspondentie gerelateerd aan deze aanvraag aan de IVD Utrecht te verzenden. Dus stellen we u de volgende vragen.

- 1) In de brief meldt u dat het ondertekende aanvraagformulier wordt per post verstuurd. Tot nu toe hebben we geen formulier per post ontvangen, dus willen we graag weten of het formulier al verstuurd is en wanneer kunnen we het verwachten.
- 2) In het digitale aanvraagformulier is vermeld dat er een gemachtigde is, maar u heeft geen machtiging mee gestuurd. Komt die ook ondertekend per post? Wij hebben de machtiging en de gegevens van de gemachtigde nodig.
- 3) Op het aanvraagformulier en de NTS staat 1-04-2015 als begindatum van het project. Omdat de begindatum niet in de verleden kan zijn, willen we u vriendelijk vragen om de begindatum en einddatum, indien van toepassing, te veranderen en aan ons schriftelijk bekend te maken via een email, of een aangepaste digitale versie van het aanvraagformulier en NTS. Een project kan niet worden opgestart vóór dat de vergunning verleend is.

We hopen snel een reactie van uw te mogen ontvangen.

Pas als de aanvraag compleet is kunnen we haar verder in behandeling nemen; het betekent ook dat de klok stil staat.

Mocht u nog vragen hebben, dan hoor ik dat graag.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]
Uitvoeringsexpert

Centrale Commissie Dierproeven

Centrale Commissie Dierproeven www.zbo-ccd.nl

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

T: 0900 2800028

E: ZBO-CCD@minez.nl