

Inventaris Wob-verzoek W16-04s									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTS 20151220								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Niet-technische samenvatting	x							
3	DEC Advies				x		x	x	
4	Bijlage dierproef 1				x			x	
5	Bijlage dierproef 2				x			x	
6	Bijlage dierproef 3				x			x	
7	Projectvoorstel				x			x	
8	Ontvangstbevestiging				x		x		
9	Advies CCD		x						x
10	Beschikking en vergunning				x		x	x	

18 AUG 2015



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? Ja > Vul uw deelnemernummer in 10300
 Nee > U kunt geen aanvraag doen
Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.

1.2 Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.
 Naam instelling of organisatie Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
 Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde [Redacted]
 KvK-nummer 4 1 0 5 5 6 2 9

1.3 Vul de gegevens van het postadres in. *Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.*
 Straat en huisnummer Geert Groteplein-Noord 9
 Postbus 9102
 Postcode en plaats 6525EZ Nijmegen
 IBAN NL90ABNA0231209983
 Tenaamstelling van het rekeningnummer UMC St Radboud

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker. Dhr. Mw.
 (Titel) Naam en voorletters [Redacted]
 Functie [Redacted]
 Afdeling [Redacted]
 Telefoonnummer [Redacted]
 E-mailadres [Redacted]

1.5 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker. Dhr. Mw.
 (Titel) Naam en voorletters [Redacted]
 Functie [Redacted]
 Afdeling [Redacted]
 Telefoonnummer [Redacted]
 E-mailadres [Redacted]

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 01_10_2015
- Einddatum 01_10_2020
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Targeting the prostaglandinE receptor 4 (EP4) with a new anti-rheumatic drug in arthritis
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Het remmen van reuma via de EP4-receptor
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC RU DEC
- Postadres Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen [Redacted]
- E-mailadres [Redacted]

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 741,00 Lege
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.
- Via een eenmalige incasso
 Na ontvangst van de factuur

5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
- Verplicht
- Projectvoorstel
- Niet-technische samenvatting
- Overige bijlagen, indien van toepassing
- Melding Machtiging
- DEC advies; Informatie voor de CCD factuur

6 Ondertekening

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

Centrale Commissie
 Dierproeven
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondergetekende verklaart:

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

Naam	[Redacted]
Functie	Instantie voor dierenwelzijn
Plaats	Nijmegen [Redacted]
Datum	14 - 08 - 2015
Handtekening	[Redacted]



DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer 2015-0066
2. Titel van het project: Targeting the prostaglandin E receptor 4 (EP4) with a new anti-rheumatic drug in arthritis.
3. Titel van de NTS: Het remmen van reuma via de EP4-receptor.
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
 - Naam DEC: RUDEC
 - Telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED] bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9:00 tot 15:00 uur
 - Mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject:
 - ontvangen door DEC: 23-04-2015
 - in vergadering besproken: 04-05-2015
 - vragen gesteld: 11-05-2015
 - termijnonderbreking(en) van 11-05-2015 tot 13-05-2015 en van 19-05-2015 tot 20-05-2015
 - aanpassing aanvraag: 13-05-2015
 - aanvraag compleet: 13-05-2015
 - anderszins behandeld:
 -
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen: n.v.t.
 - advies aan CCD: 14-08-2015
7. Eventueel horen van aanvrager: n.v.t.
 - Datum
 - Plaats
 - Aantal aanwezige DEC-leden
 - Aanwezige (namens) aanvrager
 - Strekking van de vraag / vragen
 - Strekking van het (de) antwoord(en)
 - Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag
8. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum: 11-05-2015
 - Strekking van de vragen:
 -
 - **Project Proposal:**
 - 3.1 De commissie mist informatie over de gebruikte EP4-receptor antagonist, en verzoekt de onderzoekers deze informatie toe te voegen.

- 3.4.2 De onderzoekers willen de effecten van de EP4-receptor antagonist eerst in het AIA-model onderzoeken, en daarna in het 'golden standard' CIA-model. Kennelijk is een effect in dit laatste model noodzakelijk alvorens een translatie naar de kliniek kan worden begonnen. De commissie vraagt zich af of de onderzoekers niet kunnen beginnen met het CIA-model. Is er bij een ontbrekend effect in het CIA model nog een rationale voor het werk in het AIA model? Indien zij het effect van de EP4-receptor antagonist in ieder geval in het AIA-model willen testen, dienen zij dit te onderbouwen.
- De toegevoegde waarde van het SCID mouse model blijkt niet duidelijk uit de gegeven beschrijving. De onderzoekers worden verzocht dit toe te lichten.
- **Description of Animal Procedures:**
- - Dierproef 1-3, onderdeel A, eerste vraag. De onderzoekers schrijven dat de dieren behandeld worden met de EP4 receptor. Bedoelen zij de EP4 receptor antagonist?
- - Dierproef 1, onderdeel A, tweede vraag. De onderzoekers verduidelijken dat de behandeling systemisch zal zijn omdat het AIA model een systemisch arthritis model is. Bij de eerste vraag hebben zij uitgelegd dat het AIA-model een lokaal model is. Zij worden verzocht dit zodanig te formuleren dat het in overeenstemming met elkaar is.
- - Dierproef 3, onderdeel A, tweede vraag. De onderzoekers verduidelijken dat de behandeling systemisch zal zijn omdat het AIA-model een systemisch arthritis model is. In deze dierproef wordt een ander model gebruikt. Zij worden verzocht het juiste argument te gebruiken.
- Datum antwoord: 13-05-2015
- Strekking van de antwoorden:
- **Project Proposal:**
- 3.1. " [REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]. " This text has been added to our application.
- 3.4.2. "After demonstrating proof-of-concept in this AIA model, we will continue with validating the therapeutic efficacy of our EP4 receptor antagonist in a second arthritis model. RA is a very heterogeneous disease, and the many different arthritis models all only partially mimic the disease of certain patients or specific stages of the arthritis process. Therefore, further confirmation of therapeutic efficacy of EP4 receptor targeting in a second, more severe model is highly informative, and will teach us more about responses in more progressive and destructive RA processes. Our choice for validation is the more challenging, systemic collagen-induced arthritis model. Because this model is more severe, shows more variation and does not contain the control tissues (left knee joint in AIA) that we prefer for showing our proof of concept, we decided to start in the AIA and next validate in the CIA model."
- "The SCID model, as final model, is clearly the translational step of our research. We are currently testing the EP4 receptor antagonist ex vivo on human synovium explants, but culture time of these complex tissues is limited to 24 hours. Therefore, to expand on our potentially positive findings in experiment 1 and 2, we want to provide further proof that

human synovial tissue in an in vivo setting also response well to systemic treatment with an EP4 receptor antagonist. This translational part of our study will greatly support further decisions to continue or not with clinical studies in RA patients.”

- These two text boxes have been added to our proposal.
-
- **Description of Animal Procedures:**
- Dierproef 1-3, A1. This should indeed be the EP4 receptor antagonist and has been changed accordingly.
- Dierproef 1, A2. Thank you for pointing out this inconsistency, this was only partially wrong since the AIA is systemically induced (by immunization and boosting) and is expressed locally in the knee joint after injection of the antigen. The text has been changed as follows: “Treatment will be applied systemically, not locally, since the AIA model is a **systemically-induced (but locally expressed)** arthritis model...”.
- Dierproef 3, A2. My apologies for this incorrect field, the text has been replaced by: “Treatment will be applied systemically in line with experiment 1 and 2, also because of the fact that the grafts are transplanted subcutaneously, and therapeutic application in the clinic is also foreseen as being systemically provided.”
- Datum: 19-05-2015
- Strekking van de vragen: Bij de beantwoording van de vragen en opmerkingen over het project proposal punt 3.4.2 mist nog een directe beantwoording van de volgende vragen:
- De commissie vraagt zich af of de onderzoekers niet kunnen beginnen met het CIA-model. Is er bij een ontbrekend effect in het CIA model nog een rationale voor het werk in het AIA model?
- Datum antwoord: 20-05-2015
- Strekking van het antwoord: In our approach, we choose to start with the AIA because this model is [redacted] cells and has the practical characteristics to demonstrate the mode of action. In the next step, we continue with the CIA that besides a [redacted] part is also strongly driven by B cells and antibodies. If our inhibitor fails to show efficacy in this second model, we still have obtained the knowledge that strongly [redacted] disease like the AIA can be blocked by targeting the EP4 receptor, and this may be followed [redacted] [redacted] in disease models for systemic sclerosis, multiple sclerosis or psoriasis. Because this is expected to be future plans beyond the next 5 years, these future plans are not included in this application.
- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

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

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig.
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.

C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:

uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord

2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.
3. De DEC onderschrijft het belang van het voorgenomen onderzoek, dat er op gericht is om te bepalen of het blokkeren van de EP4 receptor met een antagonist in muismodellen voor artritis (RA) de pathologie, gekenmerkt door gewrichtsontsteking en aantasting van kraakbeen en bot, reduceert. ██████████

██████████ Tot slot zullen de eventuele positieve bevindingen met het blokkeren van de EP4 receptor getest worden in een gehumaniseerd muismodel waarin humaan synoviaal weefsel van RA patiënten getransplanteerd wordt in SCID muizen. Het blokkeren van de EP4 receptor in dit model zou de ziekte moeten onderdrukken. De te behalen onderzoeksresultaten zullen een indicatie geven van het mogelijke therapeutische effect bij mensen met reumatische artritis. Die informatie is nodig om een beslissing te kunnen nemen over de vraag of de gebruikte remmer verder zal worden onderzocht in klinische trials bij mensen. Reumatische artritis is een invaliderende ziekte met een hoge prevalentie in de bevolking. Maatschappelijk is dit onderzoek van belang, omdat de resultaten kunnen bijdragen aan de ontwikkeling van betere therapieën voor deze ziekte. Met name voor het grote aantal mensen dat geen of weinig baat heeft bij de huidige therapieën is het van belang dat er meer en betere therapieën beschikbaar komen. Dat zou resulteren in gezondheidswinst voor veel mensen, en in kostenreductie door het terugdringen van invaliditeit. De realisatie van de genoemde doelstellingen vertegenwoordigt in de ogen van de DEC een substantieel belang.

4. De gekozen strategie en experimentele aanpak zijn wetenschappelijk verantwoord en kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Deze groep heeft veel ervaring in dit onderzoeksveld en met de voorgestelde dierproeven. De gekozen aanpak leidt tot betrouwbare uitspraken over het effect van dit geneesmiddel op gewrichtsschade bij muizen ██████████, en geeft een indicatie van het mogelijke therapeutische effect bij mensen met artritis.
5. Er is geen sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren.
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is op grond van eigen ervaring van de onderzoekers realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het betreft algemeen gebruikte modellen in dit type onderzoek en de inschatting van het ongerief is in overeenstemming met de consensus daarover. Het ongerief wordt hoofdzakelijk veroorzaakt door het induceren van de gewrichtsontstekingen, de pijn en hinder als gevolg van die gewrichtsontstekingen en de handelingen die nodig zijn om de ontstane ontstekingen te behandelen met de EP4 receptor antagonist en het effect van die behandeling te volgen. De DEC schat het ongerief als gevolg van de injecties, de bloedafnames,

en het imago in als licht, het ongerief als gevolg van de operatie schat de commissie in als matig, evenals het ongerief veroorzaakt door de gewrichtsontstekingen. Het cumulatief ongerief voor alle muizen in de beschreven vergunningaanvraag, matig, is dus juist ingeschat.

7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**. De onderdelen van het project die in vitro uitgevoerd kunnen worden zijn al uitgevoerd, voor de resterende onderzoeksvragen zijn dierproeven in de genoemde artritis muismodellen noodzakelijk. De doelstelling van het project kan niet gerealiseerd worden zonder proefdieren of door gebruik van minder complexe diersoorten.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd. De DEC is het eens met het achtereenvolgens inzetten van de beschreven muismodellen voor artritis en met onderbouwing van het aantal benodigde dieren. Door de logische, stapsgewijze aanpak: XXXXXXXXXX gestuurd model (AIA) > systemisch model (CIA) > gehumaniseerd muismodel (translationeel), wordt onnodig gebruik van proefdieren voorkomen. De DEC is van oordeel dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 550 muizen.
9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven. De experimentele handelingen bij de dieren zullen worden uitgevoerd door hierin getrainde onderzoekers, waardoor de stress voor de dieren zoveel mogelijk wordt beperkt. De dieren krijgen extra verzorging na anesthesie. Dagelijks controles van de dieren zorgen ervoor dat bij onverwacht optredend ongerief tijdig kan worden ingegrepen. De DEC is ervan overtuigd dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.
10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project, zelfstandig leesbaar, beknopt en begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

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

Met dit onderzoek wordt inzicht verkregen met betrekking tot de vraag of het blokkeren van de EP4 receptor met een antagonist mogelijk een goede behandeling zou kunnen zijn voor mensen met reumatisch artritis. De resultaten geven onder andere een antwoord op de vraag of het zinvol zou zijn om de gebruikte antagonist verder te onderzoeken in klinische trials bij mensen. Het is aannemelijk dat dit onderzoek kan bijdragen aan het ontwikkelen van betere therapieën voor mensen met reumatische artritis. Het belang van het beschikbaar komen van meer therapeutische opties en betere therapieën acht de DEC substantieel, gezien de omvang van dit medische probleem en gezien het feit dat de huidige therapieën bij veel mensen niet of niet goed blijken te werken.

Tegenover dit substantiële belang staat het gegeven dat alle dieren die in dit onderzoek gebruikt worden matig ongerief zullen ondervinden als gevolg van het induceren van RA symptomen en de daarop volgende behandeling. De commissie is er van overtuigd dat bij de dierproeven adequaat invulling zal worden gegeven aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en/of verfijning van dierproeven. Het gebruik van de dieren en het daarbij optredende ongerief is onvermijdelijk, wil men de doelstellingen kunnen realiseren. De experimenten komen qua design

overeen met wat in het onderzoeksveld gebruikelijk is.

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

E. Advies

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



Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300				
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen				
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	<table border="1"><thead><tr><th>Serial number</th><th>Type of animal procedure</th></tr></thead><tbody><tr><td>1</td><td>Antigen-induced arthritis</td></tr></tbody></table>	Serial number	Type of animal procedure	1	Antigen-induced arthritis
Serial number	Type of animal procedure					
1	Antigen-induced arthritis					

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

To study the effect and mode-of-action of blocking the EP4 receptor during experimental arthritis, we will start our in vivo studies with blocking the EP4 receptor in the antigen-induced arthritis (AIA) model. This is a local, [REDACTED] driven arthritis model induced by immunization (day 0) and boosting (day 7) with methylated Bovine Serum Albumin (mBSA) in FCA as antigen, and arthritis will be limited to the right knee joint which is subsequently injected with a small amount of this antigen (day 21). The left control joint will serve as internal control and will be injected with saline only (day 21; all AIA procedures under anesthesia).

Mice will be treated with the EP4 receptor **antagonist** and relevant negative and positive controls for a maximum of 2 weeks with a maximum frequency of injection of twice daily per oral gavage or once daily intra-peritoneal/ subcutaneous.

This mono-arthritis is ideal for our proof-of-concept study, because it allows us, besides demonstrating the clinical efficacy of the EP4 receptor antagonist on arthritis pathology (imaging, pain/gait analysis, histology), to also demonstrate the mechanism(s) through which this inhibitor acts. From both the inflamed (right) and the non-inflamed (left) joint, synovial tissue, washout and draining lymph nodes will be obtained for analysis of [REDACTED] cytokine expression (Luminex) and gene expression profiles (RT-QPCR), which will allow us to demonstrate the effect of EP4 receptor inhibition on [REDACTED] differentiation and activation in vivo.

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

Mice will be treated with the EP4 receptor **antagonist** and relevant negative and positive controls for a maximum of 2 weeks with a maximum frequency of injection of twice daily per oral gavage or once daily intra-peritoneal/ subcutaneous.

After intra-articular injection of the antigen (mBSA), arthritis will start in the injected knee joint, but this joint inflammation will disappear in 3-4 weeks when all antigen is cleared from the joint. Therefore, the therapeutic window in this model is limited to a treatment period of maximum 2 weeks.

Treatment will be applied systemically, not locally, since the AIA model is a **systemically-induced (but locally expressed)** arthritis model [REDACTED]

During the treatment period, a maximum of 4 times anesthesia is foreseen for in vivo imaging of inflammation (<30 min) and collection of blood (< 2 min) to determine [REDACTED] and cytokine levels.

At the end of the study, mice will be terminally bled under anesthesia and tissues will be collected for further analysis.

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

Om het juiste aantal benodigde dieren (n) per experimentele groep te bepalen waarbij statistisch betrouwbare data kan worden verkregen, zal gebruik worden gemaakt van een power-analyse waarbij een formele hypothese wordt getoetst met continue variabelen. Deze analyse zorgt ervoor dat er geen onnodig hoge aantallen muizen per groep zullen worden gebruikt. Hierbij zal de volgende formule worden toegepast: $n = 1 + 2C(s/d)^2$. De C-waarde wordt berekend m.b.v. de power (1-) en het gewenste significantieniveau (a). Wanneer twee groepen (controle en experimenteel) met elkaar vergeleken worden (met de gewenste power van 0,8 en een significantieniveau van 0,05) resulteert dit in een C-waarde van 7,85. Als er meer dan twee groepen met elkaar vergeleken worden zal een Bonferroni-correctie worden toegepast. De s- en d-waarden staan voor de geschatte standaarddeviatie (s) en de verwachte mate van verschil tussen controle en experimentele groep (d). Deze waarden zullen herleid worden uit eerder uitgevoerde (pilot)experimenten of reeds gepubliceerde data.

B. The animals

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

Species: C57Bl6N mice, since this is the most commonly used strain for the AIA model. The use of female mice is preferred to prevent problems due to fighting of animals. (The choice for use of mice in general in this study was already previously motivated.)

Age range: young adult, standard approx. 10-12 week old mice are used in this type of arthritis research.

Origin: certified animal supplier like Janvier, Jackson or Charles River.

Estimated number of animals: maximum 200 mice, based on a max. of 5 experimental groups (max. 3 doses of EP4 receptor antagonist, a negative and a positive control treatment), and per group a rough estimate of max. 10 mice per group for each of the 4 different readout parameters at time of sacrifice (histology, FACS, Luminex, RT-QPCR). Poweranalysis will further sophisticate the required number of animals per technique in the final study design.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
C57Bl6N mice	Certified supplier	200	10-12 weeks

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement: we are at a stage of our project in which we need to proof our complex hypothesis regarding the EP4 receptor in joint pathology and the immune system in the complexity of an organism with similarities to the human system, and that cannot be further achieved with alternatives in vitro and without the use of animals.

Reduction: With the proposed strategy and step-wise approach, we will prevent unnecessary use of animal in case the findings in the first studies do not support our hypothesis. Sample size calculations will determine the group sizes, and the experimental groups included are required to address the question. A further reduction will result in unreliable data and is therefore not possible.

Refinement: The AIA model has been chosen for its best chances to demonstrate clinical efficacy and proof-of-concept within one model, with arthritis limited to one knee joint. Since pain is a readout parameter in the study (by gait analysis and incapitance tester), and pain killers can affect the immune response and thus the disease model, they are not used in the study. Two injections with FCA are required to induce a good immune response in our AIA protocol, but no adverse events like ulceration of the skin due to these injections have been observed in our lab. All AIA-procedures will be performed under adequate anesthesia, and extra comfort will be provided by providing soft tissues during recovery of anesthesia. Daily inspections of the animal will allow animals with unexpected discomfort to get proper treatment or be taken out of experiment to prevent further discomfort and/or pain.

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

Although arthritis and pain cannot be minimized in these studies, extra comfort will be provided by providing soft paper tissues towels during recovery of anesthesia during the induction of arthritis. Food pellets may be provided at the bottom during arthritis development, so mice do not have to stand on their two hind paws to reach the food. Daily inspections of the animal will allow animals with unexpected discomfort to get proper treatment or be taken out of experiment to prevent further discomfort and/or pain.

Repetition and Duplication

E. Repetition

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

Not applicable

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

All mice in the AIA studies will have potential pain from the joint inflammation in the right knee joint. However, as mentioned under the 3Rs, pain killing in these studies is not compatible with our readout parameters and objective to study inflammation processes. In < 2% of the animals the arthritis will lead to a reduced mobility.

Explain why these effects may emerge.

Severe joint inflammation and destruction of cartilage and bone might cause such a reduced mobility.

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

This reduced mobility (and the underlying joint inflammation) cannot be prevented since it is related to the research question, experimental model and study design. However, these animals showing reduced mobility will be taken out of experiment having reached the humane end point criteria.

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

A mouse will be taken out of experiment when it shows reduced mobility due to severe joint inflammation/destruction, as demonstrated by less loading of the affected paw, difficult movement and longer periods of resting while cage mates are active.

Indicate the likely incidence.

Based on our experience with the model, the incidence of decreased mobility is estimated to be < 2%.

K. Classification of severity of procedures

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

100% moderate

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

Animals are sacrificed to collect tissues for further analysis.

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

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

Yes



Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 2	Type of animal procedure Collagen-induced arthritis

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

After demonstrating proof-of-concept in the AIA model, we will continue with validating the therapeutic efficacy of our EP4 receptor antagonist in the more challenging, systemic collagen-induced arthritis (CIA) model, a model that is internationally regarded as the "golden standard" for therapeutic testing of anti-rheumatic drugs. This model is induced by immunization with bovine collagen type II in FCA, and arthritis starts after a second injection of this antigen in saline. This model is [REDACTED], but is more challenging due to the systemic character of this model, in which all synovial joints could get affected.

CIA is induced by immunisation with bovine collagen type II (CII) in FCA on day 0 under anesthesia, and boosting with CII in PBS by i.p. injection on day 21. Arthritis will start to develop around day 21-28, and therefore mice will be scored macroscopically for signs of arthritis 3x/week from the day of booster till the end of the study.

Primary outcome parameter will be clinical efficacy of the EP4 receptor antagonist on arthritis pathology (macroscopic scores, imaging, pain/gait analysis, histology). In addition, we will study the effect of EP4 **receptor** inhibition on [REDACTED] cytokine expression (Luminex) and gene expression profiles (RT-QPCR) in draining lymph nodes, synovial tissue and blood.

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

Mice will be treated with the EP4 receptor **antagonist** and relevant negative and positive controls for a maximum of 3 weeks with a maximum frequency of injection of twice daily per oral gavage or once daily intra-peritoneal/ subcutaneous.

After intra-peritoneal injection of the antigen (CII), arthritis will start to progress in both the front and the hind paws, with a progressive character which means that without intervention, mice will start reaching the humane end points of severe arthritis around week 8-10 of the study. Therefore, we limit our therapeutic window from week 3 to maximum week 7. Mice will be included in the treatment groups after clear onset of the disease (based upon a standardized macroscopic scoring system for redness and swelling of toes and ankle joints) and subsequently treated for a period of maximum 3 weeks.

Treatment will be applied systemically, not locally, since the CIA model is a systemic arthritis model and [REDACTED]

a [REDACTED]
During the treatment period, a maximum of 4 times anesthesia is foreseen for in vivo imaging of inflammation (<30 min) and collection of blood (< 2 min) to determine [REDACTED] and cytokine levels.

At the end of the study, mice will be terminally bled under anesthesia and tissues will be collected for further analysis.

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

Om het juiste aantal benodigde dieren (n) per experimentele groep te bepalen waarbij statistisch betrouwbare data kan worden verkregen, zal gebruik worden gemaakt van een power-analyse waarbij een formele hypothese wordt getoetst met continue variabelen. Deze analyse zorgt ervoor dat er geen onnodig hoge aantallen muizen per groep zullen worden gebruikt. Hierbij zal de volgende formule worden toegepast: $n=1+2C(s/d)^2$. De C-waarde wordt berekend m.b.v. de power (1-) en het gewenste significantieniveau (a). Wanneer twee groepen (controle en experimenteel) met elkaar vergeleken worden (met de gewenste power van 0,8 en een significantieniveau van 0,05) resulteert dit in een C-waarde van 7,85. Als er meer dan twee groepen met elkaar vergeleken worden zal een Bonferroni-correctie worden toegepast. De s- en d-waarden staan voor de geschatte standaarddeviatie (s) en de verwachte mate van verschil tussen controle en experimentele groep (d). Deze waarden zullen herleid worden uit eerder uitgevoerde (pilot)experimenten of reeds gepubliceerde data.

B. The animals

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

Species: DBA-1 mice, since this is the only strain sensitive for our CIA model with bovine collagen type II. (The choice for use of mice in general in this study was already previously motivated.)

Age range: young adult, standard approx. 10-12 week old mice are used in this type of arthritis research.

Origin: certified animal supplier like Janvier, Jackson or Charles River.

Estimated number of animals: maximum 200 mice, based on a max. of 5 experimental groups (max. 3 doses of EP4 receptor antagonist, a negative and a positive control treatment), and per group a rough estimate of max. 10 mice per group for each of the 4 different readout parameters at time of sacrifice (histology, FACS, Luminex, RT-QPCR). Poweranalysis will further sophisticate the required number of animals per technique in the final study design.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
DBA-1 mice	Certified supplier	200	10-12 weeks

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement: we are at a stage of our project in which we need to proof our complex hypothesis regarding the EP4 receptor in joint pathology and the immune system in the complexity of an organism with similarities to the human system, and that cannot be further achieved with alternatives in vitro and without the use of animals.

Reduction: With the proposed strategy and step-wise approach, we will prevent unnecessary use of animal in case the findings in the first studies do not support our hypothesis. Sample size calculations will determine the group sizes, and the experimental groups included are required to address the question. A further reduction will result in unreliable data and is therefore not possible.

Refinement: The CIA model has been chosen as second step, since it is regarded as a more severe, but the golden standard model for therapeutic testing in preclinical arthritis. Since pain is a readout parameter in the study (by gait analysis), and pain killers can affect the immune response and thus the disease model, they are not used in the study. CIA immunisation with FCA will be performed under adequate anesthesia, and the tail is thoroughly cleaned after injection to prevent skin irritation around the injection site. Extra comfort will be provided by providing soft tissues during recovery of anesthesia. Daily inspections of the animal will allow animals with unexpected discomfort to get proper treatment or be taken out of experiment to prevent further discomfort and/or pain.

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

Although arthritis and pain cannot be minimized in these studies, extra comfort will be provided by providing soft paper tissues towels during recovery of anesthesia. Food pellets will be provided at the bottom during arthritis development, so mice do not have to stand on their two hind paws to reach the food. Daily inspections of the animal will allow animals with unexpected discomfort to get proper treatment or be taken out of experiment to prevent further discomfort and/or pain.

Repetition and Duplication

E. Repetition

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

Not applicable

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

All mice in the CIA studies will have potential pain from the joint inflammation in front and hind paws. However, as mentioned under the 3Rs, pain killing in these studies is not compatible with our readout parameters and objective to study inflammation processes.

In < 5% of the animals the arthritis will lead to a reduced mobility.

Explain why these effects may emerge.

Severe joint inflammation and destruction of cartilage and bone will cause such a reduced mobility.

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

This reduced mobility (and the underlying joint inflammation) cannot be prevented since it is related to the research question, experimental model and study design. However, these animals showing reduced mobility will be taken out of experiment having reached the humane end point criteria.

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

A mouse will be taken out of experiment when it shows reduced mobility due to severe joint inflammation/destruction, as demonstrated by less loading of the affected paw, difficult movement and longer periods of resting while cage mates are active.

An additional quantitative criterion that will be applied, is when a mouse reaches a macroscopic arthritis score of 7 on a scale of 0-8 based on swelling and redness of the four paws (toes and ankles/wrists); the mouse will then be taken out of experiment.

Indicate the likely incidence.

Based on our experience with the model, the incidence of decreased mobility is estimated to be < 5%.

K. Classification of severity of procedures

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

100% moderate

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

Animals are sacrificed to collect tissues for further analysis.

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

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

Yes



Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300				
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen				
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	<table border="1"><thead><tr><th>Serial number</th><th>Type of animal procedure</th></tr></thead><tbody><tr><td>3</td><td>RA synovium SCID mouse</td></tr></tbody></table>	Serial number	Type of animal procedure	3	RA synovium SCID mouse
Serial number	Type of animal procedure					
3	RA synovium SCID mouse					

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

Finally, to predict the efficacy of our inhibitor in RA patients, we would like to use our humanized arthritis model, the human RA synovium SCID mouse model, before seeking partners to setup highly expensive and time-consuming clinical trials. In this translational model, inflamed synovial tissue from RA patients undergoing joint replacement surgery is engrafted into SCID mice. After a standard engraftment period to reach good vascularization of the transplant, the mice are treated with the EP4 receptor antagonist, or positive or negative control treatments, and the effects of the treatment are studied on biomarker expression in the serum (e.g. human IL-6, IL-8) and histological analysis of the synovial graft (e.g. scoring of cellularity, immunohistochemistry). Starting these SCID studies will depend on the positive observed effects of EP4 targeting in the CIA model.

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

Mice will be treated with the EP4 receptor **antagonist** and relevant negative and positive controls for a maximum of 2 weeks with a maximum frequency of injection of twice daily per oral gavage or once daily intra-peritoneal/ subcutaneous.

For the transplantation of human RA synovium biopsied into the mice, SCID mice are anesthetized using isoflurane inhalation, and after disinfection of the neck region two small incisions (< 1cm) are made behind the ears (above the shoulders). Two small subcutaneous pockets are created to insert the transplants (6 mm of diameter), and subsequently each pocket is closed with a suture clip.

After transplantation of the two RA biopsies subcutaneously on the back of the SCID mice, an engraftment period of one week is required to reach good vascularization of the graft. At day 7, treatment with the inhibitor and controls will be started. Since previous studies demonstrated that inflammation-related biomarkers (like human IL-7 in the serum of these engrafted mice) drop rapidly after 10 days, the mice will be treated for one week and sacrificed at day 14 after transplantation.

Treatment will be applied systemically in line with experiment 1 and 2, also because of the fact that the grafts are transplanted subcutaneously, and therapeutic application in the clinic is also foreseen as being systemically provided.

During the treatment period, a maximum of 2 times anesthesia is foreseen for in vivo imaging of inflammation (<30 min) and collection of blood (< 2 min) to determine ██████ and cytokine levels.

At the end of the study, mice will be terminally bled under anesthesia and tissues will be collected for further analysis.

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

Om het juiste aantal benodigde dieren (n) per experimentele groep te bepalen waarbij statistisch betrouwbare data kan worden verkregen, zal gebruik worden gemaakt van een power-analyse waarbij een formele hypothese wordt getoetst met continue variabelen. Deze analyse zorgt ervoor dat er geen onnodig hoge aantallen muizen per groep zullen worden gebruikt. Hierbij zal de volgende formule worden toegepast: $n = 1 + 2C(s/d)^2$. De C-waarde wordt berekend m.b.v. de power (1-) en het gewenste significantieniveau (a). Wanneer twee groepen (controle en experimenteel) met elkaar vergeleken worden (met de gewenste power van 0,8 en een significantieniveau van 0,05) resulteert dit in een C-waarde van 7,85. Als er meer dan twee groepen met elkaar vergeleken worden zal een Bonferroni-correctie worden toegepast. De s- en d-waarden staan voor de geschatte standaarddeviatie (s) en de verwachte mate van verschil tussen controle en experimentele groep (d). Deze waarden zullen herleid worden uit eerder uitgevoerde (pilot)experimenten of reeds gepubliceerde data.

B. The animals

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

Species: SCID.CB17 mice, since this is a commonly used strain for this type of transplantation studies (due to their lack of functional T and B cells). The use of female mice is preferred to prevent problems due to fighting of animals. (The choice for use of mice in general in this study was already previously motivated.)

Age range: young, standard approx. 5-15 week old mice are used in this type of arthritis research. Mice should not get too old (generally over 26 weeks) due to the risk of leakiness, meaning that they might be able to develop functional T and/or B cells with ageing.

Origin: certified animal supplier like Janvier, Jackson or Charles River.

Estimated number of animals: maximum 150 mice, based on a max. of 5 experimental groups (max. 3 doses of EP4 receptor antagonist, a negative and a positive control treatment), and per group a rough estimate of max. 30 mice per group for histological analysis (because of interpatient variation an estimate of 10 donors is required with each 3 mice/group transplanted to detect differences between groups). Poweranalysis will further sophisticate the required number of animals per technique in the final study design.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Mice, SCID.CB17	Certified supplier	150	5-15 weeks

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement: we are at a stage of our project in which we need to proof our complex hypothesis regarding the EP4 receptor in joint pathology and the immune system in the complexity of an organism with similarities to the human system, and that cannot be further achieved with alternatives in vitro and without the use of animals.

Reduction: With the proposed strategy and step-wise approach, we will prevent unnecessary use of animal in case the findings in the first studies do not support our hypothesis. Sample size calculations will determine the group sizes, and the experimental groups included are required to address the question. A further reduction will result in unreliable data and is therefore not possible.

Refinement: The SCID model has been chosen for its unique potential to demonstrate the effect of a potential new therapeutic agent on human arthritis tissue in an in vivo setting (without going into patients and clinical trials). The small surgical procedure in this model will be performed under adequate anesthesia, and no further pain killing is necessary because the grafts do not cause any further discomfort. Extra comfort will be provided by providing soft tissues during recovery of anesthesia. Daily inspections of the animal will allow animals with unexpected discomfort to get proper treatment or to be taken out of experiment to prevent further discomfort and/or pain.

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

Extra comfort will be provided by providing soft paper tissue towels during recovery of anesthesia. No further adverse events are expected to occur. Daily inspections of the animal will allow animals with unexpected discomfort to get proper treatment or be taken out of experiment to prevent further discomfort and/or pain.

Repetition and Duplication

E. Repetition

E. Repetition

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

Not applicable

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

The mice will have discomfort from waking up after anesthesia and by the treatment injection, but no further adverse events are expected to occur.

Explain why these effects may emerge.

Not applicable

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

Not applicable

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

Indicate the likely incidence.

K. Classification of severity of procedures

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

100% moderate

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

Animals are sacrificed to collect tissues for further analysis.

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

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

Yes



Form Project proposal

- This form should be used to write the project proposal of animal procedures.
- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed
- For more information on the project proposal, see our website(www.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'. | 10300 |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment. | Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen |
| 1.3 | Provide the title of the project. | Targeting the prostaglandin E receptor 4 (EP4) with a new anti-rheumatic drug in arthritis |

2 Categories

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

Forensic enquiries

Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

3 General description of the project

3.1 Background

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

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

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic autoimmune disorder that is estimated to affect up to 1% of the population worldwide (Williams, 2006). Although not life-threatening, RA is a painful and debilitating disease that progressively limits the ability of patients to carry on normal lives. The factors that trigger this disease are not well understood but are believed to include both genetic and environmental components. Over the last decade, novel discoveries into the regulation of the immune system have permitted a better understanding of the development of autoimmunity.

Prostaglandin E2 (PGE2) is an arachidonic acid metabolite that acts as a potent biological mediator, exerting its effects via activation of membrane G protein-coupled receptors (GPCRs). There are four receptor subtypes (EP1, 2, 3 and 4; nomenclature follows Alexander et al., 2009) which selectively bind PGE2 and mediate its effects: Activation of EP1 receptors leads to the influx of calcium. Activation of EP3 receptors can induce a variety of signalling events depending on the particular EP3 splicing variant being expressed, with inhibition of adenylate cyclase activity via Gi being the most common effect. EP2 and EP4 receptors induce Gs-mediated activation of adenylate cyclase and a subsequent increase in intracellular cyclic AMP (cAMP). In addition, EP4 receptors activate the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) signalling pathway (Fujino et al., 2003). PGE2 is known to play important roles in mediating many inflammatory responses and is often found at increased concentrations under a variety of inflammatory conditions (Hata and Breyer, 2004). Many reports suggest that PGE2, via the induction of intracellular cAMP, can suppress pro-inflammatory function, including receptor signalling and consequent production of interleukin (IL)-2 (Mustelin and Tasken, 2003; Chemnitz et al., 2006). PGE2 has also been implicated in differentiation and is reported to inhibit Th1 but not Th2 cytokines via the induction of intracellular cAMP (Betz and Fox, 1991; Gold et al., 1994; Hilkens et al., 1995; Okano et al., 2006). However, other reports indicate a pro-inflammatory role for PGE2. PGE2 can induce production of IL-23 from dendritic cells (DCs), which promotes the differentiation of pro-inflammatory

█ cells (Sheibanie et al., 2004; Khayrullina et al., 2008). Recent reports also suggest that PGE2 can synergize with IL-23 to promote expansion of human █ cells and enhance IL-17 production (Chizzolini et al., 2008; Boniface et al., 2009; Napolitani et al., 2009). Furthermore, PGE2 has been shown to exacerbate symptoms in mouse models of arthritis (Sheibanie et al., 2007a) and inflammatory bowel disease (Sheibanie et al., 2007b), and the blockade of EP2 and EP4 receptor signaling in a mouse model of arthritis can alleviate the severity of the disease (McCoy et al., 2002; Honda et al., 2006). Interestingly, EP4 was demonstrated to be a potential therapeutic target in a mouse model of multiple sclerosis (experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)), which revealed that deletion of the EP4 receptor in bone marrow-derived cells lead to a significant delay in the onset of EAE. This effect was due to an impaired preclinical inflammatory process indicated by reduced numbers of █ and of the █ secreted interleukin-17 (IL-17) in the blood of mice lacking EP4 in peripheral immune cells (Schiffmann et al., 2014). We demonstrated that the expression of PGE2 and the EP4 receptor are clearly enhanced in rheumatoid arthritis patients and in our experimental arthritis models, a █ suggesting that the PGE2/EP4 pathway might contribute █ arthritis processes. It is clear that the role of PGE2 and its EP receptors in inflammation processes like arthritis is still not fully identified, █

█. We therefore would like to test the potential of the EP4 receptor as therapeutic target █ experimental arthritis by blocking this receptor with a specific antagonist during experimental arthritis using a step-wise approach: (1) proof-of-concept in the mono-arthritic AIA model, (2) validation in the systemic CIA model, and (3) translational targeting in the humanized RA synovium SCID mouse model.

█ like RA. Therefore, CR6086 has been made available to us to further explore this therapeutic potential.

(Arthritis models and related abbreviation will be explained in further parts of the project.)

3.2 Purpose

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

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

The aim of the project is to determine whether blocking the EP4 receptor in murine experimental arthritis reduces the arthritis pathology reflected by joint inflammation and destruction of cartilage and bone, █ (experiment 1+2). In addition, we aim to translate positive findings of the mouse studies (experiment 1+2) to a humanized mouse model in which human RA synovial tissue is transplanted into SCID mice, to investigate whether also EP4 receptor blocking in this humanized setting results in disease suppression (experiment 3). This would support our hypothesis that also in clinical practice, EP4 receptor targeting might form a potential therapeutic approach in the treatment of rheumatoid arthritis.

We expect that the studies to reach our goals are feasible within this 5-year project: the proposed animal models are standardized and routinely used in our department of rheumatology, and for the transplantation model we have access to human surgery material from four hospitals in the Netherlands (on average 1-2 donors/month). In addition, the techniques for assessing the effects of intervention are optimized and frequently applied.

3.3 Relevance

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

Rheumatoid arthritis is an invalidating disease that affects 1-2% of the world population. Treatment of RA generally comprises a combination of NSAIDs (non-steroidal antiinflammatory drugs), DMARDs (disease-modifying anti-rheumatic drugs) and biologicals. Although a lot of new biological treatments have entered the market recently, there is still a group of 30% of the RA patients that do not respond to the current therapies. Therefore, the search for new RA treatments continues. More efforts are needed to develop effective and potent new therapies that can benefit the non-responding patient and reduce the costs for patient care which are increasing rapidly. The identification of such treatments will be of direct benefit for the patient. However, successful testing of new therapies in mouse models of arthritis is a crucial step before a new biological can be tested in the clinic.

Our EP4 receptor antagonist is [REDACTED], and therefore (if proven effective) a great alternative for the expensive biological treatments that continuously enter the market.

Proof of therapeutic efficacy in animal models of experimental arthritis is one of the steps of the pre-clinical process before testing a newly developed therapeutic in clinical trials in humans with the help of pharmaceutical partners or other sponsors. We want to demonstrate that blocking the EP4 receptor can indeed lead to enhanced reduction of joint inflammation and destruction in a murine model of experimental arthritis, and reduce synovial activation in a humanized, translation model of RA. These preclinical studies may contribute to the development of new therapeutic options for patients who do not respond to current available treatments.

3.4 Research Strategy

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

We would like to investigate the potential of the EP4 receptor as therapeutic target in [REDACTED] driven experimental arthritis by blocking this receptor with a specific antagonist during experimental arthritis using a step-wise approach: (1) proof-of-concept in the mono-arthritic AIA model, (2) validation in the systemic CIA model, and (3) translational targeting in the humanized RA synovium SCID mouse model.

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.

First, we will start with blocking the EP4 receptor in the antigen-induced arthritis (AIA) model (type of experiment 1). This is a local, [REDACTED] arthritis model induced by immunization and boosting with methylated Bovine Serum Albumin (mBSA) in FCA as antigen, and arthritis will be limited to the right knee joint which is subsequently injected with a small amount of this antigen. The left control joint will serve as internal control and will be injected with saline only. This mono-arthritis is ideal for our proof-of-concept study, because it allows us, besides demonstrating the clinical

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	Antigen-induced arthritis
2	Collagen-induced arthritis
3	RA synovium SCID mouse



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
p/a [REDACTED]
Postbus 9101
6500 HB NIJMEGEN


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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD103002015220
Bijlagen
2

Datum 18-08-2015
Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw [REDACTED]
Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 18 augustus 2015.
Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD103002015220. 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: 10300

Naam instelling of organisatie: Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde:

██████████

KvK-nummer: 41055629

Straat en huisnummer: Geert Groteplein-Noord 9

Postbus: 9102

Postcode en plaats: 6525 EZ NIJMEGEN

IBAN: NL90ABNA0231209983

Tenaamstelling van het
rekeningnummer: UMC St. Radboud

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam:

██

Functie:

██

Afdeling:

██

Telefoonnummer:

████████████████

E-mailadres:

██

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

Naam: [REDACTED]
Functie: Instantie voor Dierenwelzijn
Afdeling: [REDACTED]
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Gegevens gemachtigde

BSN: [REDACTED]
Naam: [REDACTED]
Postbus: 9101
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN
Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Ja

Over uw aanvraag

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

Over uw project

Geplande startdatum: 1 oktober 2015
Geplande einddatum: 1 oktober 2020
Titel project: Targeting the prostaglandin E receptor 4 (EP4) with a new anti-rheumatic drug in arthritis
Titel niet-technische samenvatting: Het remmen van reuma via de EP4-receptor
Naam DEC: RU DEC
Postadres DEC: Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen ([REDACTED])
E-mailadres DEC: [REDACTED]

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:

- Melding Machtiging
- DEC-advies

Ondertekening

Naam:



Functie:

Instantie voor dierenwelzijn

Plaats:

Nijmegen

Datum:

14 augustus 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
p/a [REDACTED]
Postbus 9101
6500 HB NIJMEGEN


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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD103002015220
Bijlagen
2

Datum 18-08-2015
Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 18 augustus 2015
Vervaldatum: 17 september 2015
Factuurnummer: 201570220

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvegrunning dierproeven Betreft aanvraag AVD103002015220	€ 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.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
t.a.v. [REDACTED]
Postbus 9102
6525 EZ Nijmegen

**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie
AVD103002015220

Uw referentie
uw ref

Bijlagen
1

Datum 25 september 2015
Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte heer/mevrouw,

Op 18 augustus 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'Targeting the prostaglanin E receptor 4 (EP4) with a new anti-rheumatic drug in arthritis' met aanvraagnummer AVD103002015220. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning. Voor aanvang van het project moet het daadwerkelijk benodigd aantal dieren per dierproef in overleg met de IvD worden vastgesteld. De reden hiervoor is dat u in de aanvraag heeft aangegeven dat het maximaal benodigd aantal dieren slechts een ruwe schatting is. Daarnaast dient u de eventuele go/no go momenten voor aanvang van het project in overleg met de IvD vast te stellen. Hoewel u in uw aanvraag wel heeft aangegeven dat er go/no go momenten zijn gedefinieerd, heeft u de criteria die zullen worden toegepast om tot een beslissing te komen over het wel of niet continueren van de verschillende dierproeven niet in uw aanvraag vermeld.

U kunt met uw project 'Targeting the prostaglanin E receptor 4 (EP4) with a new anti-rheumatic drug in arthritis' starten. De vergunning wordt afgegeven van 01 oktober 2015 tot 01 oktober 2020.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Radboud Universiteit gevoegd. Dit advies is opgesteld op 14 augustus 2015. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons grotendeels vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. De CCD is echter van mening dat voor aanvang van het project zowel het benodigd aantal dieren als de criteria voor de go/no go momenten in overleg met de IvD dient te worden vastgesteld. Wij nemen de rest van het 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- en regelgeving liggen ten grondslag aan dit besluit.

Bezwaar

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

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

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

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


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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

De Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

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

Bijlagen

- Vergunning

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



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
Adres: Postbus 9102
Postcode en woonplaats: 6525 EZ Nijmegen
Deelnemersnummer: 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak 01 oktober 2015 tot 01 oktober 2020, voor het project project 'Targeting the prostaglanin E receptor 4 (EP4) with a new anti-rheumatic drug in arthritis' met aanvraagnummer AVD10300020152220, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Radboud Universiteit.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is wetenschappelijk onderzoeker. Voor de uitvoering van het project is de Instantie voor Dierenwelzijn verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 18 augustus 2015
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 14 augustus 2015;
 - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 14 augustus 2015;
 - c. Advies van Dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 14 augustus 2015

Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst
Antigen-induced arthritis	Muizen	200	Matig
Collagen-induced arthritis	Muizen	200	Matig
RA synovium SCID mouse	Muizen	150	Matig

Voorwaarden

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

-Voor aanvang van het project moet het daadwerkelijk benodigd aantal dieren per dierproef worden vastgesteld. De IvD dient in te stemmen met het daadwerkelijk benodigd aantal dieren.

-De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat eventuele go/no go momenten voor aanvang van het project worden vastgesteld en dat de IvD instemt met de vastgestelde criteria.

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

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

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

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

Verzorging

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

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

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

Pijnbestrijding en verdooving

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdooving wordt uitgevoerd tenzij dat niet mogelijk is, dan wel bij het verrichten van een dierproef worden pijnstillers toegediend of andere goede methoden gebruikt die de pijn, het lijden, de angst of de blijvende schade bij het dier tot een minimum beperken. Een dierproef die bij het dier gepaard gaat met zwaar letsel dat hevige pijn kan veroorzaken, wordt niet zonder verdooving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdooving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdooving onverenigbaar is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd voldoende verdooving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn kunnen lijden als de verdooving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

Einde van een dierproef

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

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

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

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.