



26 JAN. 2016

AVD 103002016403



## Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

### 1 Gegevens aanvrager

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

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

## 2 Over uw aanvraag

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

## 3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 0 1 \_ 0 4 \_ 2 0 1 6
- Einddatum 0 1 \_ 0 4 \_ 2 0 2 1
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Drug development for malaria
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Geneesmiddelenontwikkeling voor malaria
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC RU DEC
- Postadres Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen
- E-mailadres

## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1.441,00 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
- DEC-advies, factuurinformatie

## 6 Ondertekening

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

Centrale Commissie  
Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag

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

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

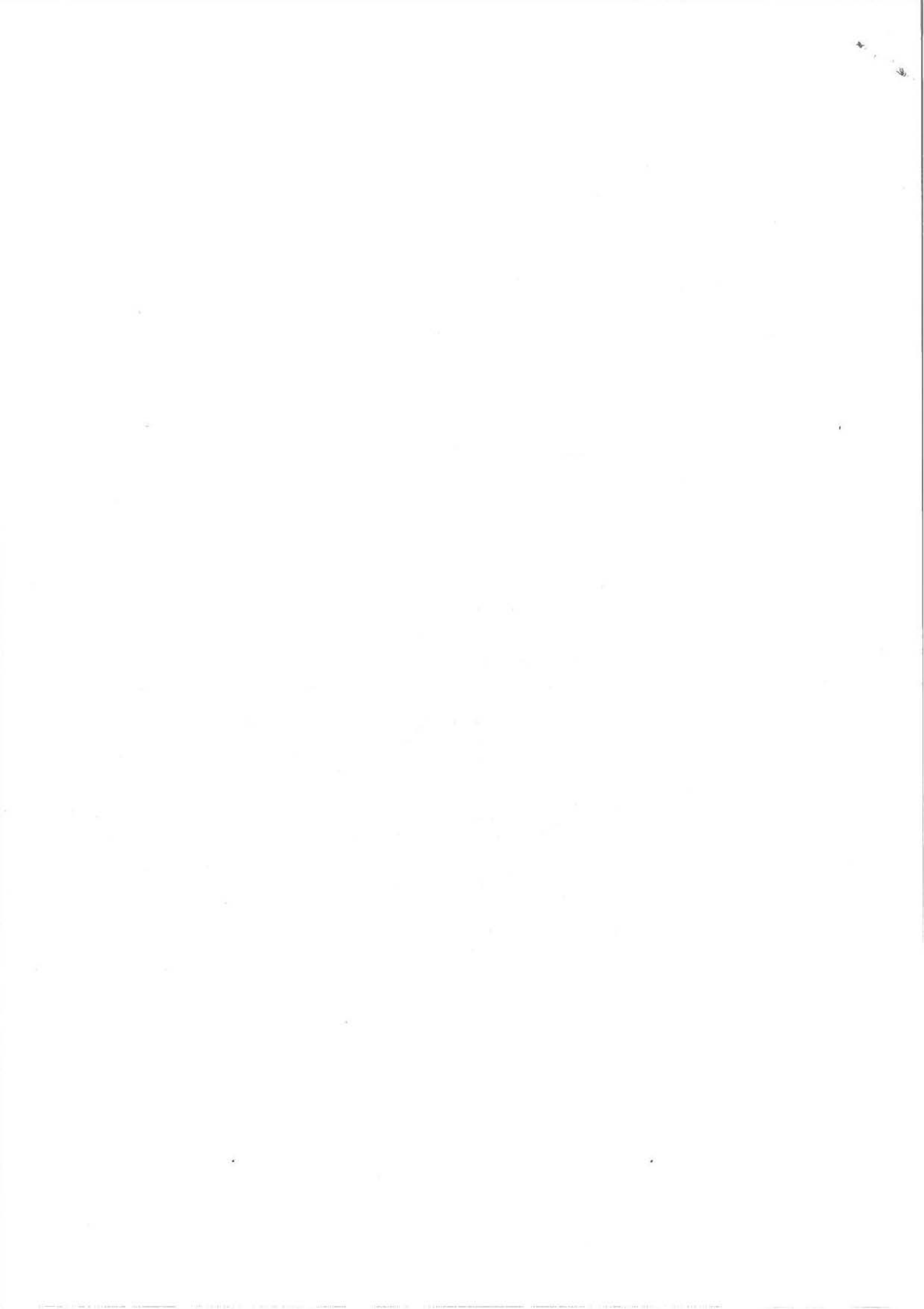
Naam 

Functie 

Plaats Nijmegen

Datum 22 - 01 - 2016

Handtekening 



### Form Project proposal

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

## 1 General information

- |     |  |  |
|-----|--|--|
| 1.1 | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. | 10300                                      |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment.  | Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen |
| 1.3 | Provide the title of the project.  | Drug development for malaria               |

## 2 Categories

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

---

Forensic enquiries

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

---

## 3 General description of the project

### 3.1 Background

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

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

#### General background

Malaria is one of the most devastating infectious diseases worldwide, caused by infection with parasites of the genus *Plasmodium*. Despite all the progress that has been made in reducing the malaria-threat, in 2013 there were still ~200 million cases and ~0.6 million deaths, particularly of children less than five years of age [1]. In addition to the tremendous human suffering, this disease forms a profound economic burden for the affected countries, which are already struggling with poverty. Dwindling effectiveness of all currently registered anti-malarials due to fast emergence and spread of resistance and the absence of an effective vaccine further emphasize the urgency of the situation. There are a number of factors that contribute to the complexity of the problem such as the complicate life cycle of the parasite, the occurrence of six *Plasmodium* species that infect humans, and the ability of the parasite to evade the human immune system.

The study of *P. falciparum* the most important human parasite, is largely restricted to *in vitro* cultures. The cultures do not capture the full life cycle of the parasite, and do not incorporate drug absorption, distribution, metabolism and excretion processes that have a large impact on drug efficacy. For this reason, mouse models for malaria are extremely important to study parasite biology and to test antimalarial drugs. The most commonly used infections of rodents are *P. berghei*, *P. yoelii*, and *P. chabaudi*. These models allow the study of *in vivo* infections as well as the complete *Plasmodium* life cycle. Furthermore, *P. berghei* and *P. yoelii* provide straightforward and efficient experimental genetics approaches. Comparative *Plasmodium* genome analyses have validated the use of such model species, particularly for studying basic parasite biology [3-6].

#### Current chemotherapeutics for malaria

Uncomplicated malaria may be treated with oral medications. The most effective treatment for *P. falciparum* infections is the use of artemisinins in combination with other antimalarials (known as artemisinin-combination therapy, or ACT), which decreases resistance to any single drug component. These additional antimalarials include: amodiaquine, lumefantrine, mefloquine or sulfadoxine/pyrimethamine. Another recommended combination is

dihydroartemisinin and piperaquine. ACT is about 90% effective when used to treat uncomplicated malaria. Recommended treatment for severe malaria is the intravenous use of antimalarial drugs.

### Development of drug resistance

Control of *P. falciparum* malaria relies strongly on chemotherapy but is severely compromised by emerging resistance to all known antimalarial drugs [7]. Malaria strains found on the Cambodia–Thailand border are resistant to combination therapies that include artemisinins and may therefore be untreatable. Exposure of the parasite population to artemisinin monotherapies in subtherapeutic doses for over 30 years and the availability of substandard artemisinins likely drove the selection of the resistant phenotype. Resistance to artemisinin has been detected in Cambodia, Myanmar, Thailand, and Vietnam and there has been emerging resistance in Laos.

Clinical development of antimalarials has been slow and new chemical classes of compounds have not been introduced since 1996. The existing portfolio targets primarily asexual forms responsible for clinical disease but not the sexual forms responsible for transmission to the mosquito vector and spread of the parasite in the population. The latter is critical for malaria eradication strategies.

### Previous work on antimalaria drug development

[REDACTED] as a potential new class of anti-malarials. These [REDACTED] kill *Plasmodium* parasites *in vivo* in rodent models but also block transmission of *P. falciparum* to mosquitoes [REDACTED]. The presumed target is the poorly understood [REDACTED] which is different from the canonical pathway. [REDACTED]

[REDACTED] Continued fundamental studies of the gene/protein functions in the target pathways will provide the fundamental basis for the continued clinical development of potential novel anti-malarials that target both asexual and transmission stages. [REDACTED]

[REDACTED] The current project application covers important animal studies (rat and mice) that use rodent malaria parasites as a model system.

### References

1. World Health Organization. *World Malaria Report 2014*. (2014). [REDACTED]
3. Hall, N. *et al.* A comprehensive survey of the *Plasmodium* life cycle by genomic, transcriptomic, and proteomic analyses. *Science* **307**, 82–86 (2005). [REDACTED]
5. Carlton, J. M. *et al.* Comparative genomics of the neglected human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Nature* **455**, 757–763 (2008).



6. Pain, A. *et al.* The genome of the simian and human malaria parasite *Plasmodium knowlesi*. *Nature* **455**, 799–803 (2008).
7. Burrows JN, van Huijsduijnen RH, Mohrle JJ, Oeuvray C, Wells TN. Designing the next generation of medicines for malaria control and eradication. *Malar J.* 2013;12:187.

---

### 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 overall aim of the project is to develop new, effective, safe, and cheap antimalaria drugs, with transmission blocking activity. We largely strive for the target product profile stated by the MMV, which includes single exposure, fast and radical cure, targeting asexual and sexual stages, shelf life > 2 years and cost of < \$1 per treatment.

We think that these ambitions are timely and achievable. The institute is home to excellent, state-of-the-art core facilities, including "omics", advanced microscopy, and flow-cytometry platforms. All animal experiments will be performed at the Central Animal Facility (CDL) and CDL personnel will be involved in all the experiments and the animal care-taking. Some of the senior and most experienced team members, with years of expertise and dedication, will be involved with the full breadth of the project and will maintain the overview ensuring that significant progress will be made through prioritizing promising tracks and abandoning "dead-ends". The project will be discussed and evaluated at regular meetings of the entire (local) team and by the (international) MMV board.

The project is well funded. The proposed objectives are achievable within the time frame of the project.

---

### 3.3 Relevance

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

The medical and societal relevance of effective, safe and affordable malaria drugs is evident as malaria is the most prevalent infectious disease, and particularly affects small children in developing countries. The increasing emergence of resistance against current antimalarials, and the paucity of new antimalarials in the pipelines of pharmaceutical industries put further pressure on the need to identify new targets and develop new drugs.

---

### 3.4 Research Strategy

---

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

---

##### **Overall strategy to achieve the objectives**

Drug development, as a rule, has a number of phases, some of which include the use of experimental animals (see figure 1 for an overview of the activities). We obtained a number of lead compounds, which need to be optimized before they can enter the final preclinical phase and subsequent clinical phases. The overall strategy here is to perform efficacy studies of the lead compounds and to improve the compounds in subsequent rounds of medicinal chemistry. This is an iterative process, which includes studies on pharmacokinetics (PK), pharmacodynamics (PD), and mechanism of action (MoA) of the compounds. All these steps include the use of experimental animals. Prior to *in vivo* testing, molecules will be triaged on basis of physicochemical characteristics and activity in *in vitro* models for antiparasitic efficacy, target engagement, metabolic stability, and plasma protein binding. Only a small subset of molecules will proceed to *in vivo* testing (see figure 1).

*In vivo* efficacy studies are aimed at evaluation of clinical parameters, such as parasitemia, in animal models for malaria. PK parameters such as bioavailability and clearance of the drugs will be assessed in wild type control animals (mice and rats). This will drive the chemical synthesis (lead optimization) to generate compounds with more favourable PK profiles. PD and MoA studies will be performed *in vitro* and *in vivo*. PD and MoA studies will be performed both in wild type control animals and animal models for malaria, to obtain a more detailed insight in the physiological and biochemical actions of the drug at the level of the parasite and the host.

##### **Sequence of experiments and go/no-go points**

Drug development is an iterative process, where the combined outcome of *in vitro* assays and *in vivo* PK and efficacy studies guides the medicinal chemistry efforts (lead optimization). This may lead to improved compounds, which are again subjected to PK and efficacy studies (see figure 1).

In general there are a number of criteria that need to be met before development of a certain drug class is taken to the next step. These include:

- *In vitro* metabolic stability, toxicology, and PD data will be used as go/no-go criteria points for lead compounds before continued testing in animal is considered.
- Pharmacokinetics of promising lead compounds will be performed before *in vivo* efficacy tests in experimental animals will be undertaken. When *in vivo* levels are expected to be insufficient for clinical activity, based on extrapolation of *in vitro* data, medicinal chemistry efforts will be directed at improving PK of the compounds.

---

#### 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.

---

##### **General outline**

Drug candidates will be optimized for clinical efficacy, PK and safety properties. This involves a cyclic process of medicinal chemistry (organic synthesis) and in vitro/in vivo testing of the compounds in various model systems. Mice are the preferred animal species in the model systems used here and are the gold standard for malaria drug research world-wide. The reason for this is that malaria infections in mice by *P.berghei* are similar to infections in humans by *P.falciparum*. Like humans, mice cannot control infection and the infection may be lethal when left untreated. The vast majority of publication on animal models for malaria is on mice. Although rats can also be infected by *P.berghei*, they tend to control the infection and only low levels of parasitemia are reached. For this reason, rats are not the preferred animal in most malaria drug studies. However, due to the nature of the compound class that we are developing [REDACTED] the drugs cannot always be adequately tested in mice because of the high plasma [REDACTED] levels [REDACTED] that may compete for some of the drugs at the level of transporters or target enzymes. For this subgroup of compounds we will use rats, which have a plasma [REDACTED] level that is similar to humans (1-2 micromolar). We cannot predict in advance what the percentage of compounds will be that show [REDACTED] competition. The numbers are based on the assumption that half of the compounds will be tested in rats and the other half in mice.

### 1. Pharmacokinetics of candidate drugs

Drug candidates are optimized for efficacy, pharmacokinetic and safety properties (see flow chart). This involves a process of organic synthesis and in vitro/in vivo testing. Drugs that are intended for systemic use will be studied for PK parameters by administration to rats or mice. This will be done p.o. and i.v. for determination of absorption, distribution, metabolism, excretion and bioavailability. Blood will be drawn at various intervals for analysis of drug levels and metabolites, using liquid chromatography and mass spectrometry (LC-MS). Animals will be sacrificed at the end of the experiment to collect blood and organs for PD and MoA studies. Although mice would in general be the preferred animal species for rodent malaria, some of the [REDACTED]-derivatives cannot be adequately tested in mice, as indicated above. For these compounds we need to use rats, which have a plasma [REDACTED] level that is similar to humans.

### 2. Efficacy studies of antimalarial drugs

Mice or rats (for motivation see above) will be infected with blood stage parasites (either wild type or genetically modified) to establish a blood-stage infection. Experimental drugs or established drugs will be administered to the animals in the drinking water, by oral gavage or by *i.v.*, *i.p.*, or *s.c.* injection, prior to or during an infection. Most commonly this will concern the application of drugs by oral gavage. Parasitaemia will be monitored by blood smears and quantitated by luminescence counts in blood, using a transgenic parasites that constitutively expresses the luciferase enzyme, and/or by daily blood. Parasitemia will not be allowed to continue above a certain threshold that causes severe discomfort to the animals. In such a case the experiment will be terminated. At the end of the experiment, animals will be sacrificed to collect blood and organs for further analysis.

### 3. Experimental animals for research tools and pilot studies

The [REDACTED] drugs target the [REDACTED] pathway, which is a five step synthesis starting with [REDACTED]. As part of our research strategy, we will perform experiments to identify which enzymes are targeted by the experimental drugs. Whenever possible, *in vitro*

biochemical and cell-based assays will be performed. These experiments require specific antibodies against parasite proteins as research tools, which are in general not available. For this reason, we will perform a limited number of immunizations of rabbits and guinea pigs according to standard protocols, to generate antisera against recombinant proteins of interest.

In some of the experiments, animal material is required to perform *in vitro* experiments that cannot be done with cell lines. These experiments include normal rat or mouse liver cells, which are cultured and used to test the effect of drugs on biotransformation and toxicity.

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

All components of the project are dependent on each other. Optimization of lead compounds is an iterative process involving medicinal chemistry, PK, and testing of compounds for efficacy and safety (see figure 1). PD and investigation of the mechanism of action follows are important aspects to guide medicinal chemistry efforts. Prior to *in vivo* efficacy testing, molecules will be triaged on basis of physicochemical characteristics and activity in *in vitro* models for, a.o., antiparasitic efficacy, target engagement, metabolic stability, and plasma protein binding. Development of certain compounds may be terminated at any stage based on an inability to meet these criteria.

**Figure 1**

# Main objective: drug development for malaria

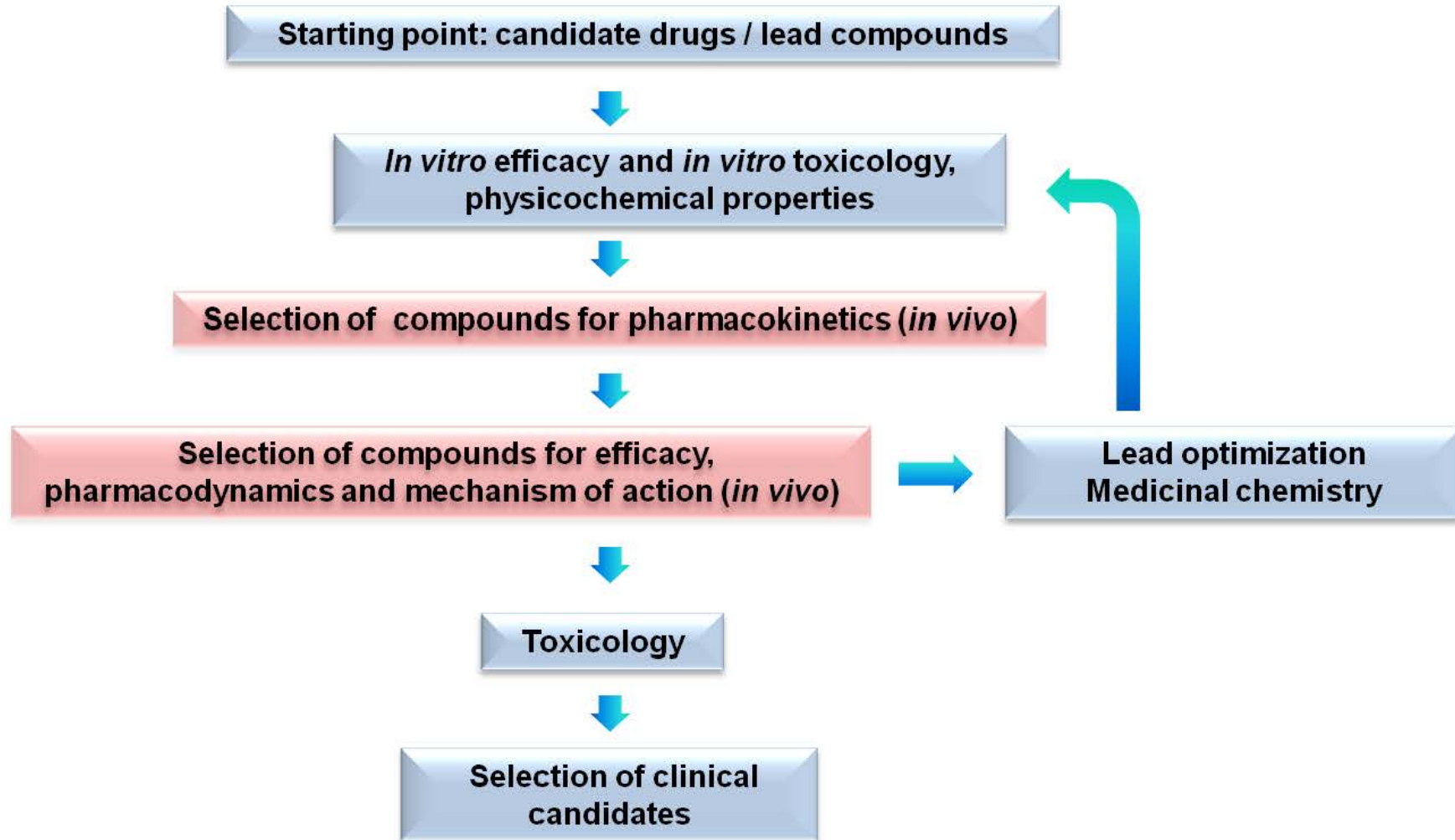


Figure 1: Flow chart of drug development. Red boxes indicate parts that involve experimental animals in the current project. Toxicology is not part of the project. Lead compounds with anti-malaria properties *in vitro* are investigated for PK properties (*in vivo*). Efficacy is evaluated by *in vivo* malaria models. Candidate compounds are subjected to multiple rounds of lead optimization until progression to the clinical phase.

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	Pharmacokinetics of antimalarial drugs
2	Efficacy studies of antimalarial drugs
3	Research tools

## Appendix

### Description animal procedures

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

## 1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number 1	Type of animal procedure Pharmacokinetics of antimalarial drugs

## 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.

As outlined in the Proposal Background we are developing novel antimalarial chemotherapeutics of the [REDACTED]. These compounds are unique because they target both sexual and asexual stages. This animal procedure covers pharmacokinetics of these novel antimalarial compounds. Compounds will be administered to mice or rats to test adsorption, distribution, metabolism and excretion of the compounds according to standard procedures. Based on PK data, we will be able to estimate whether the compounds reach a sufficient level to expect an effect in an *in vivo* malaria model.

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

---

#### PK analysis of new compounds

Inbred C57BL/6 mice, Wistar rats or Brown Norway rats will receive single doses drugs by oral administration or by *i.v.* or *i.p.* injection. Just prior to administration of the compound and during a 24 hour period blood samples will be collected (maximum five times) via tail snip for LC-MS quantification of the compounds. At 24 hours after drug administration the animals will be sacrificed by terminal retro-orbital or intracardiac bleeding under adequate general anaesthesia and organs will be dissected for further analysis (histology, blood chemistry, qPCR). **The animals will be housed in conventional cages.**

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

---

Based on previous experiments we know that 3 animals per drug dosage will give adequate data to generate a time course of drug exposure.

### B. The animals

---

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

---



We will use mice and rats from registered EU breeding companies. The choice of rats or mice is guided by the compound properties determined *in vitro*. All compounds that show competition with [REDACTED] will be tested in rats rather than mice, because of the [REDACTED] plasma levels in mice [REDACTED]. Rats are similar to humans in this respect [REDACTED]. A subset of compounds will be tested in both mice and rat in order to better understand the PK-PD relationship in relation to body volume and plasma [REDACTED] levels of the different species. We will use either sex depending on availability.

Based on previous experience, we hope to obtain a maximum of 10 new compounds each year to be tested for PK in mice and in rats. These may be completely novel chemical entities, or modifications of previous compounds that result from lead optimization. Each compound will be tested via 2 different dosage routes (p.o, i.v.) in 3 animals each. These are commonly used (minimal) numbers. In previous experiments, we found that the variance of the drug levels is sufficiently small to allow time courses on only 3 animals per dose.

3 animals x 2 routes x 10 compounds x 5 years = 300 mice and 300 rats for PK studies (maximum).

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
WT mice	Regular breeding	300	Young
WT rats	Regular breeding	300	Young

### 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

PK studies are by definition *in vivo* studies and cannot (yet) be replaced by *in vitro* studies.

## Reduction

Each compound will be tested in 3 animals each per administration route. These are minimal numbers. In previous experiments, we found that the variance of the drug levels is sufficiently small to allow time courses on only 3 animals per dose.

## Refinement

The number of blood samples has been reduced to the minimum number of 5 per experiment. The quantity of blood is minimal (100 µl).

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

---

- 1) Animal welfare will be monitored daily. The experiments will be performed by authorized and skilled personnel only. In order to minimize the risk of possible adverse effects resulting from the application of novel, putative anti-malarial compounds, all compounds are first tested in mammalian cell models for *in vitro* toxicology. Thus far, none of the compounds of the class that we tested showed adverse effects in animal studies.
- 2) There are no measurable adverse effects on the environment.

## 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?

---

The animals will experience stress during the experimental procedures.

Explain why these effects may emerge.

---

The discomfort (stress) is caused by the experimental procedures, such as drug administration and the collection of blood samples.

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

---

Since the levels of discomfort result from the experimental procedures they cannot be prevented. The severity is minimized while the experiment will be performed by authorized and skilled personnel only.

### **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.

---

In general, we do not expect clinical features associated with the proposed PK experiments. However, as we are using new compounds that have not been tested before *in vivo*, adverse effects cannot be completely excluded. Distress/pain and abnormal behavior may be signs of an adverse drug effect and will serve as criteria for termination of the experiment.

Indicate the likely incidence.

---

Based on previous work and the low dosages required for PK, we think that the incidence will be low to negligible.

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

---

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

---

The animals will experience moderate levels of discomfort due to the administration of the compounds and repeated collection of blood.

## **End of experiment**

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

---

Will the animals be killed during or after the procedures?

---

No

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

---

At the end of the experiment, blood and organs will be collected for analysis as indicated above. Therefore, all animals will be sacrificed, either by terminal retro-orbital or intracardial bleeding under adequate general anaesthesia, or by cervical dislocation.

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

---

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

---

Yes

---

## Appendix

### Description animal procedures

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

## 1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number 2	Type of animal procedure Efficacy studies of antimalarial drugs

## 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.

---

As outlined in the Proposal Background we are developing novel chemotherapeutics for malaria. The applied methods all involve the administration of these compounds to mice or rats to test their *in vivo* properties such as anti-malarial activity and possible side effects. The rodent malaria infection models will allow us to test lead compounds that demonstrated promising anti-malarial activities *in vitro*. Ideally, such compounds would demonstrate activities against liver-stage, asexual blood-stage, and sexual blood-stage parasites, thus functioning as a prophylactic, curative, and transmission-blocking compound.

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

---

#### High dosage and dose-response screens in rodent malaria models

If PK properties are favourable, a rodent malaria model will be used to test the compounds for antimalarial activity. Mice or rats will be infected with parasites from frozen stocks, live transfers, or *in vitro* cultures and can be mosquito-derived sporozoites, which first migrate to the liver before establishing a blood-stage infection, or blood-stage parasites. Mice and rats can be infected with the same strains (e.g. *P.berghei* or *P.yoellii*) and all procedures are similar for mice and rats, with exception of parasite inoculums and drug dosing. The parasites will be administered by mechanical injection (typically *i.v.* or *i.p.*) or by natural bites from malaria parasite-infected mosquitoes under adequate general 30-min anaesthesia. Anti-malarial compounds will be administered orally or by *i.v.*, *i.p.*, or *s.c.* injection. To test prophylactic activity this will be done prior to a sporozoite infection. The testing of curing or transmission-blocking activities of the compounds will start following anywhere between one and seven days after the infection, but typically between three and five days after infection. A general treatment includes one to three administrations per day for a maximum of five successive days. In the first experiment, only a single dose will be tested at a high concentration. When we find compounds active at a high concentration, we will repeat the procedure described with different concentrations in order to find the lowest dose that is still efficient as an anti-malarial. All infections will be monitored through the collection of drops of tail blood, which may be analysed microscopically (e.g. through Giemsa-stained blood smears or by fluorescence microscopy), using flow-cytometry, or molecular techniques (e.g. PCR or sequencing). In a small proportion of mice (<5%), the *in vivo* liver load imaging system (IVIS) will be used to measure liver infection in anaesthetized animals (with a maximum of 2 measurements during 48 h). Based on the expected and observed course of infection, the frequency of collecting tail blood will be determined. During the final stages of the infection this is typically done on a daily basis, though specific experiments may require sampling twice

daily (for no more than 2 consecutive days). Besides the antimalarial activity of the compound to be tested, also some limited information of potential side effects of the compounds to the animals will be obtained. Up to eight days after start of the infection, the animals will be sacrificed, either by terminal retro-orbital or intracardial bleeding under adequate general anaesthesia, or by cervical dislocation. The organs will be dissected for further analysis. Blood will be analysed for clinical chemical parameters (e.g. glucose, electrolytes, liver and kidney function).

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

Drug testing experiments aim to have results with a significance of 0.05 and a power of 0.80. Here we assume that the proportion of success for the positive control is 0.99 and that the to-be-tested compounds can expect a proportion of success of 0.70. Other considerations regarding the reduction of animal numbers are extensively discussed in section D1: 3 R's. In summary, where appropriate we will employ state-of-the-art techniques that minimize animal use.

## B. The animals

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

We will use mice and rats from EU registered breeders. In general, we will use the C57BL/6 mice, Wistar rats and Brown Norway rats as these are commonly used for rodent malaria models. The sex of the animals is not directly relevant to the experiments. We will use either sex depending on availability. The age of the animals used will be from 8 to 30 weeks.

### Justification of the estimated maximum numbers of mice and rats

For the initial high dose screen for drug efficacy, we will use a maximum of 525 mice and 525 rats. Based on previous experience, we hope to obtain a maximum of 7 new compounds each year to be tested in the high dose screens for each animal species. These compounds are selected from the 10 compounds that were tested for PK. Each compound will be tested along positive and negative controls in 5 animals each.

(5 years × 7 compounds × [1 dosage + 2 controls] × 5 animals)

For the dose-response efficacy screen, we will use a maximum of 375 mice and 375 rats. We expect to test a maximum of 3 compounds per year, selected from the 7 compounds of the high dose screen. Each compound will be tested at 3 dosages along positive and negative controls in 5 animals each.

(5 years × 3 compounds × [3 dosages + 2 controls] × 5 animals)

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
---------	--------	---------------------------	------------



WT mice	Regular breeding	900	Young
WT rats	Regular breeding	900	Young

### C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

### D. Replacement, reduction, refinement

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

#### Replacement

The aim of the proposed study is to establish the relationship between dose and efficacy (PK-PD relationship). As indicated above, pharmacokinetics cannot be mimicked *in vitro*. In addition, malaria parasites show complex parasite-host interaction, e.g. by sequestering in bone marrow and organs. These complexities cannot be fully mimicked *in vitro* making the rodent malaria model an indispensable tool for the characterization of new anti-malarials.

#### Reduction

The minimum required number of animals to measure an effect size for a given experiment will be determined by means of a thorough statistical analysis. We will first perform PK experiments to test whether the compounds have beneficial parameters to give *in vivo* efficiency in a rodent malaria model. Further, we choose to test potential new anti-malarials first at one high concentration so we will avoid using mice to test different

concentrations of compounds that lack efficiency at high concentrations. When combining experiments enables more efficient use of mice of rats, *e.g.* through the reduction of the number of control mice required, this will be done when technically feasible. Where appropriate, we will apply novel methods utilizing luminescent or fluorescent parasite lines and *in vivo* imaging systems (such as IVIS), which enable us to follow infections in time without sacrificing mice for each time-point.

### **Refinement**

We are using the currently most refined malaria animal model, monitoring and visualizing the infection fast and accurately to minimize the risks of mice developing any clinical symptoms.

---

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

1) Animal welfare will be monitored daily. The experiments will be performed by authorized and skilled personnel only. The research team has years of experience and expertise with rodent malaria parasite infections. During the final stages of an infection, parasitaemia levels of the animals will be monitored daily. For certain critical experiments, special welfare forms will be kept and documented twice daily. The experiment will be terminated and the mouse sacrificed when it displays clinical symptoms or when parasitaemia has become too high (see humane endpoints for more details). In order to minimize the risk of possible adverse effects resulting from the application of novel, putative anti-malarial compounds, all compounds are first tested in mammalian cell models for *in vitro* toxicology. Thus far, none of the compounds of the class that we tested showed adverse effects in animal studies.

2) There are no measurable adverse effects on the environment.

## **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?

---

The animals will experience some stress during the procedures.

Explain why these effects may emerge.

---

The discomfort (stress) is caused by the experimental procedures such as oral drug administration and the collection of blood samples.

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

---

Since the levels of discomfort result from the experimental procedures they cannot be prevented. The severity is minimized while the experiment will be performed by authorized and skilled personnel only.

### **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.

---

Well-being and parasitaemias of all infected mice and rats will be monitored and animals will be sacrificed at parasitaemias <10% before they can develop malaria-associated clinical symptoms, such as cerebral malaria and anaemia. In the unanticipated case that an animal does start to display clinical symptoms, the parasitaemia will be determined (if not already done so) and a careful assessment of the well-being of the animal will be performed using specific recommendations to monitor experimental cerebral malaria (Lackner *et al. Neuropathol Appl Neurobiol* 2006; Carroll *et al. PLoS ONE* 2010). Based on this assessment in consultation with the biotechnician a decision as to whether to sacrifice the animal will be made. Furthermore, we apply the general humane endpoints.

Indicate the likely incidence.

---

The course of an infection with parasites can be readily predicted and typically mice will not experience adverse effects or display clinical symptoms before day 6 after inoculation or at parasitaemias below 1-2%. More typically though, clinical symptoms will only appear from day 7 onwards and at parasitaemias >10%. Variations between animal species and strains, parasite lines, and inoculation types and doses do exist. Therefore, we will monitor animal welfare and parasitaemia daily at the final stages of the infection, thus keeping the percentage of rare incidences where mice or rats unexpectedly display clinical symptoms and/or abnormal parasitaemia increases well below 1%.

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

---

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

---

All animals will experience **moderate** levels of discomfort starting with injection of malaria parasites **and subsequent repeated drug administrations**. Parasitaemias will be monitored by collection of drops of blood for a limited period. Finally, the animals will be sacrificed by cervical dislocation or by terminal retro-orbital or intracardial bleeding. In rare cases, when the parasitaemia of an infected animal has unexpectedly developed faster infected animals may start displaying clinical symptoms of the infection, at which stage the level of discomfort may be moderate. When this is observed the experiment will be terminated and the animal will be sacrificed as indicated under the humane endpoints (section J).

## **End of experiment**

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

---

Will the animals be killed during or after the procedures?

---

No

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

---

At the end of the experiment, the parasite-infected blood and/or specific organs need to be collected for further studies. Therefore, all animals will be sacrificed, either by terminal retro-orbital or intracardial bleeding under adequate general anaesthesia, or by cervical dislocation.

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

---

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

---

Yes

---

## Appendix

### Description animal procedures

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

## 1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number 3	Type of animal procedure Research tools

## 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.

---

These animal procedures are required to generate antisera to analyze and purify parasite proteins. These antisera are not commercially available. Rabbits and guinea pigs will be immunized with antigens, either recombinant or purified native proteins. In our experience, these are the most suitable animals for antibody production and may be conveniently used for ELISAs. In case that the antigens are sufficiently immunogenic, Freund's incomplete adjuvant will be used.

We will occasionally need rat liver cells e.g. to study biotransformation of drugs *in vitro*. For this reason we will sacrifice normal rats to dissect the livers. Cells will be cultured and drug metabolism *in vitro* will be studied by LC-MS.

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

---

As a general procedure the primary immunization will be by subcutaneous injection of 1-5 mg protein emulsified in Freund's incomplete adjuvant on the back of the animal, under general anesthesia. Booster injections using incomplete Freund's adjuvant, under general anesthesia, will be given up to 3 times, in general with 2-4 weeks intervals. Animals will be kept in experiments for a maximum of 6 months, until final bleeding for antiserum collection. Blood for determination of antibody titer will be drawn at the start of the experiment and at each booster injection. For collection of liver cells, animals will be sacrificed following standard protocols.

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

---

Not applicable

### B. The animals

---

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

---

All animals will be obtained from registered EU breeders. We will use animals of either sex, from 8 to 30 weeks of age. In our experience, rabbits and guinea pigs are the most suitable animals to generate antisera against human skin proteins. In case an ELISA needs to be set up, the antisera of



these two species are combined very well. We expect that we will need to make antisera against 5 antigens in total in the entire project. We need 2 animals of each species per immunogen. In total 10 rabbits and 10 guinea pigs.

For collection of rat liver cells, which is the usual species for these experiments, we need 4 rats per year for 5 years. In total 20 rats.

<b>Species</b>	<b>Origin</b>	<b>Maximum number of animals</b>	<b>Life stage</b>
WNZ rabbits	Regular breeding	10	Young
Duncan Hartley guinea pigs	Regular breeding	10	Young
WT rats	Regular breeding	20	Young

### **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**

Not applicable

#### **Reduction**

The number of animals (2 per immunogen) is the lower limit.

#### **Refinement**

We will use incomplete Freund's adjuvant (IFA) for the primary immunization rather than CFA, to minimize discomfort.

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

---

1) Animal welfare will be monitored daily. The experiments will be terminated and the animals sacrificed according to pre-specified conditions (see humane endpoints for more details).

2) There are no measurable adverse effects on the environment.

## 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.

---

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

---

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.

---

Injection of the adjuvant is painful. Pain relief by analgesics is likely to interfere with the immune response and is therefore not applied.

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 animals will experience stress due to the procedures.

Explain why these effects may emerge.

---

Stress is caused by the experimental procedures, such as injection of the immunogen and anesthesia before blood sampling.

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

---

Since the levels of discomfort result from the experimental procedures they cannot be prevented. The severity is minimized by closely monitoring the experiment.

#### **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.

---

In the unlikely case that the animals experience ulceration of the injection site, rapid weight loss, severe distress/pain and abnormal behavior, these will serve as criteria for euthanasia.

Indicate the likely incidence.

---

Unlikely to be present as a result of the experiments.

#### **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 ).

---

Injections with incomplete Freund's adjuvant cause moderate discomfort for the rabbits and guinea pigs. The animals will be sacrificed (terminal discomfort) for collection of serum. The rats used for liver cell collection will experience mild discomfort due to anesthesia before sacrificing them.

## **End of experiment**

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

---

Will the animals be killed during or after the procedures?

---

**L. Method of killing**

---

No

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

---

Animals are killed to obtain blood for antiserum. Therefore, all animals will be sacrificed, either by terminal retro-orbital or intracardial bleeding under adequate general anaesthesia, or by cervical dislocation.

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

---

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

---

Yes

---

## DEC-advies

---

### A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer 2015-0176
2. Titel van het project: Drug development for malaria
3. Titel van de NTS: Geneesmiddelenontwikkeling voor malaria
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: 22-12-2015
  - aanvraag compleet
  - in vergadering besproken: 05-01-2016
  - anderszins behandeld
  - termijnonderbreking(en) van 12-01-2016 tot 15-01-2016
  - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
  - aanpassing aanvraag: 15-01-2016
  - advies aan CCD: 22-01-2016
7. Eventueel horen van aanvrager
  - Datum
  - Plaats
  - Aantal aanwezige DEC-leden
  - Aanwezige (namens) aanvrager
  - Strekking van de vraag / vragen
  - Strekking van het (de) antwoord(en)
  - Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag
8. Correspondentie met de aanvrager
  - Datum: 12-01-2016
  - Strekking van de vragen:
 

**Project Proposal:**

-3.2: De onderzoekers worden verzocht het woord 'primarily' te schrappen om verwarring over de aard van de te onderzoeken stoffen te vermijden.

-3.4: De onderzoekers willen de medicijnen testen in muizen en ratten. Waarom willen zij onderzoek in muizen doen, wanneer alleen de [REDACTED] in ratten overeenkomen met die in de mens? Waarom zullen zij niet het hele project in de rat uitvoeren? Een duidelijke rationale hiervoor ontbreekt in de projectbeschrijving.

**Description of Animal Procedures:**

DAP1.

-A (en K): Hoe lang blijven de dieren in metabole kooien? Een verblijf van meer dan 24 uur is ingeschaald als matig ongerief. De onderzoekers worden verzocht dit te specificeren en de inschatting van het ongerief bij onderdeel K eventueel aan te passen en aan te geven voor welk percentage van de dieren dit zal optreden.

-B: Uit de tekst blijkt dat er meer muizen dan ratten gebruikt zullen worden. Bedoelen de onderzoekers dat ze maximaal 300 dieren van beide soorten zullen gebruiken?

-I: Het gegeven antwoord op de eerste vraag is niet adequaat. Er wordt gevraagd welke andere vormen van ongerief, behalve pijn, kunnen optreden. De onderzoekers worden verzocht deze vraag opnieuw te beantwoorden in alle bijlagen met dierproeven.

DAP3,

-A, eerste vraag: De commissie neemt aan dat de antisera niet bedoeld zijn voor het onderzoek naar AD.

-K: Het ongerief voor de ratten is niet matig maar licht (doden zonder voorafgaande handeling). De onderzoekers worden verzocht het percentage dieren te vermelden waarvoor het ongerief licht zal zijn.

**Niet-technische samenvatting:**

- 3.5 De beschrijving van het ongerief komt niet overeen met de beschrijving daarvan in de dierproeven en de beschrijving onder 3.4. De onderzoekers worden verzocht deze beschrijvingen in overeenstemming te brengen.

- Datum antwoord: 15-01-2016
- Strekking van de antwoorden:

**Project Proposal:**

-3.2: geschrap

-3.4: Dit was reeds beargumenteerd in de aanvraag maar dit is nu nog uitgebreider gedaan.

**Description of Animal Procedures:**

DAP1:

-A. het gebruik van metabole kooien is uit de aanvraag gehaald.

-B. Wij zullen maximaal 300 muizen en maximaal 300 ratten gebruiken voor PK, op basis van de bijgevoegde berekeningen.

- I: andere vormen van ongerief betreffen stress tgv bloedafname en anesthesie. Dit is aangepast in de DAPs.

DAP3:

-A: dit was een fout. Is aangepast in de nieuwe versie.

-K: De ratten worden gedood en daarna wordt de lever uitgenomen. Dit is licht ongerief.

**Niet-technische samenvatting:**

-3.5 Wij hebben dit aangepast.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

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

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

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

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

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

1. Het project is:
  - uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling, namelijk 'to develop new, effective, safe, and cheap antimalaria drugs, with transmission blocking activity.' De onderzoekers focussen daarbij op [REDACTED] en varianten daarvan. Zij onderzoeken het werkingsmechanisme van deze stoffen op moleculair niveau, zodat zij met deze kennis een medicijn kunnen ontwikkelen dat zowel aangrijpt op asexuele stadia als op transmissie stadia van de parasiet. Malaria kent een hoge prevalentie in de bevolking van de tropen en de subtropen. Met name kinderen jonger dan vijf jaar kunnen overlijden aan de ziekte. Maatschappelijk is dit onderzoek van belang, omdat deze ziekte een grote impact heeft op de maatschappij in de landen waar de parasiet voorkomt. Het malariaprobleem vormt met name in veel ontwikkelingslanden tevens een belemmering voor het verbeteren van de leefsituatie en de welvaart. Ook lopen reizigers naar deze landen het risico deze ziekte te krijgen. Er zijn anti-malaria middelen beschikbaar, maar in sommige delen van de wereld wordt de parasiet steeds resistenter hiertegen. De DEC acht meer inzicht in het werkingsmechanisme van anti-malaria middelen en de ontwikkeling van betere medicijnen van essentieel belang, aangezien de resultaten kunnen bijdragen aan de ontwikkeling van betere therapieën voor malaria, hetgeen niet alleen zou resulteren in gezondheidswinst voor enorme aantallen mensen, maar ook een belangrijke bijdrage zou leveren aan het verbeteren van de leefsituatie in veel ontwikkelingslanden.
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Deze groep heeft veel ervaring in dit onderzoeksveld en met de voorgestelde dierproeven. Zij heeft belangrijke samenwerkingsverbanden met een internationale non-profit partner [REDACTED] en met lokale experts op het gebied van het aangrijpingspunt van [REDACTED]. De gekozen aanpak leidt tot betrouwbare inzichten in het werkingsmechanisme van [REDACTED] en varianten daarvan bij muizen of ratten, waardoor een effectief medicijn ontwikkeld kan worden dat aangrijpt op zowel de asexuele als op de transmissie stadia van de malariaparasiet.
5. Er is geen sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren.
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief voor de muizen en ratten wordt hoofdzakelijk bepaald door de toediening van medicijnen en het effect daarvan op een infectie met al dan niet gemodificeerde parasieten. De DEC schat het ongerief als gevolg van de benodigde toediening van medicijnen p.o., i.v., s.c. of i.p., bloedafnames uit de staart of de wang, de infecties met parasieten door i.v., i.p. injecties of door geïnfecteerde muggen (dit laatste onder anesthesie), de immunisaties met of zonder



adjuvantia (incomplete Freund's adjuvant of milder), de toediening van medicijnen via het voedsel of i.v., i.p. of s.c. injecties, het doden door cervicale dislocatie, en in vivo imaging onder anesthesie (max. 2 maal in 48 uur) in als licht. Het ongerief als gevolg van het verbloeden of perfusie onder anesthesie is terminaal. De DEC is van mening dat de combinatie van deze factoren tot maximaal matig ongerief voor de dieren leidt. Het cumulatief ongerief voor de muizen en ratten in de beschreven vergunningaanvraag is dus juist ingeschat als matig voor alle muizen en 98% van de ratten, en licht voor 2% van de ratten.

Het ongerief voor de konijnen en cavia's wordt bepaald door de immunisaties met een antigeen in combinatie met incomplete Freund's adjuvant of complete Freund's adjuvant indien het eerstgenoemde adjuvant niet voldoende werkt. De DEC schat het ongerief als gevolg van de benodigde injecties onder anesthesie (maximaal 4 maal) en de gevolgen daarvan in als matig. Het ongerief veroorzaakt door de bloedafnames schat de DEC in als licht. Het ongerief als gevolg van het verbloeden is terminaal. Het cumulatief ongerief voor de konijnen en cavia's in de beschreven vergunningaanvraag is dus juist ingeschat als matig voor alle dieren.

7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**. De doelstelling van het project kan niet gerealiseerd worden zonder proefdieren of door gebruik van minder complexe diersoorten. Farmacokinetiek kan alleen bestudeerd worden bij proefdieren, omdat er nog geen in vitro alternatief voor is ontwikkeld. Malariaparasieten hebben een complexe interactie met hun gastheer, waardoor het effect van anti-malaria middelen alleen goed in vivo bestudeerd kan worden. Antistoffen tegen bepaalde eiwitten kunnen alleen efficiënt in proefdieren gemaakt worden. De onderzoekers gebruiken hiervoor konijnen en cavia's, omdat lagere diersoorten hier niet geschikt voor zijn. De toxiciteit van de medicijnen wordt in *in vitro* modellen bepaald.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd. De DEC is het eens met het beschreven onderzoeksmodel en de onderbouwing van het aantal benodigde dieren. Door het inbouwen van relevante go/no go momenten, door de stapsgewijze aanpak waarin de resultaten uit eerdere proeven worden gebruikt voor het design van vervollexperimenten en door het combineren van experimenten wordt onnodig gebruik van proefdieren voorkomen. De DEC is van oordeel dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 1200 muizen, 1220 ratten, 10 konijnen en 10 cavia's.
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. Dagelijkse controles van de dieren zorgen ervoor dat bij onverwacht optredend ongerief tijdig kan worden ingegrepen. Het gekozen model veroorzaakt het minste ongerief voor de dieren, omdat zij voordat ze ziek worden al worden gedood en de vermeerdering van de malariaparasieten zo mogelijk door imaging wordt gevolgd. Door de toxiciteit van nieuwe medicijnen eerst *in vitro* uit te testen, wordt het risico op onverwachte bijwerkingen verkleind. De DEC is ervan overtuigd dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.

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

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

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

Met dit onderzoek worden belangrijke wetenschappelijke inzichten verworven in het werkingsmechanisme van ██████████ en varianten daarvan bij muizen of ratten, waardoor een effectief medicijn ontwikkeld kan worden dat aangrijpt op zowel de asexuele als op de transmissie stadia van de malariaparasiet. De resultaten zullen bijdragen aan de ontwikkeling van betere anti-malaria middelen. Het belang van meer inzicht in de werkingsmechanismen van ██████████ en het beschikbaar komen van nieuwe medicijnen voor malaria acht de DEC essentieel, gezien de omvang van dit wereldwijde gezondheidsprobleem en de negatieve gevolgen die dit gezondheidsprobleem heeft voor de leefsituatie en welvaart van een groot deel van de wereldbevolking.

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

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

#### **E. Advies**

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen

Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD103002016403

**Bijlagen**

2

Datum 26 januari 2016

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 26 januari 2016.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD103002016403. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

**Wacht met de uitvoering van uw project**

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

**Factuur**

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

**Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

### **Gegevens aanvrager**

Uw gegevens

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

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: ██████████  
Functie: ██████████  
Afdeling: ██████████  
Telefoonnummer: ██████████  
E-mailadres: ██████████

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

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

Gegevens gemachtigde

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

Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Nee

Wat mag de gemachtigde doen?

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

**Over uw aanvraag**

Wat voor aanvraag doet u?

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

**Over uw project**

Geplande startdatum: 1 april 2016  
Geplande einddatum: 1 april 2021  
Titel project: Drug development for malaria  
Titel niet-technische samenvatting: Geneesmiddelenonderzoek voor malaria  
Naam DEC: RU DEC  
Postadres DEC: Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen [REDACTED]  
E-mailadres DEC: [REDACTED]

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 1441,-  
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

Verplichte bijlagen:  Projectvoorstel  
 Beschrijving Dierproeven  
 Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen:  Melding Machtiging  
 DEC-advies

**Ondertekening**

Naam: [REDACTED]  
Functie: [REDACTED]  
Plaats: Nijmegen  
Datum: 22 januari 2016



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD103002016403

**Bijlagen**

2

Datum 26 januari 2016

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 26 januari 2016

Vervaldatum: 25 februari 2016

Factuurnummer: 16700403

Ordernummer: 040823-461220 /2015-0176/

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD103002016403	€

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.



[REDACTED]

---

**Van:** [REDACTED]  
[REDACTED]  
**Verzonden:** maandag 8 februari 2016 16:50  
**Aan:** info@zbo-ccd.nl  
**Onderwerp:** RE: aanvullende informatie aanvraag AVD103002015403

**Categorieën:** [REDACTED]

Geachte [REDACTED]

De commissie heeft bij de onderzoekers nagevraagd welke methode voor het herhaaldelijk verzamelen van bloed zij zullen gebruiken, omdat wij vermoedden dat de onderzoekers zich hebben vergist bij hun omschrijving daarvan. De onderzoekers hebben bevestigd dat zij zich hebben vergist in de gebruikte terminologie: zij hebben vermeld een 'tailsnip' te zullen gebruiken, terwijl zij een 'tailcut' bedoelden. De eerste keer wordt een sneetje in de staart gemaakt waaruit een druppel bloed wordt opgevangen, waarna de wond zich sluit. Voor de herhaalde afname van een druppeltje bloed wordt het ontstane korstje telkens opengemaakt. De commissie is van mening dat dit een goede methode is voor herhaalde kleinere bloedafnames binnen 24 uur. Indien de onderzoekers dit inderdaad met een herhaalde tailsnip hadden willen doen, dan had de commissie hiermee niet ingestemd omdat dit niet de meest verfijnde methode is. De commissie schat het ongerief van de bedoelde herhaalde bloedafnames in als licht. Het totale volume aan bloed dat wordt afgenomen blijft ruim onder de 10% van het circulerend bloedvolume. Na 24 uur wordt het dier gedood. Wanneer het dier langer in de proef zou blijven, zou het mogelijk bloedarmoede kunnen ontwikkelen door deze herhaalde afname van kleine bloedvolumina, maar dat is in dit geval niet aan de orde. Op grond van deze overwegingen heeft de commissie het ongerief voor de dieren door de herhaalde bloedafname van maximaal 5 maal 20 microliter (totaal afgenomen volume maximaal 100 microliter) in 24 uur ingeschat als licht.

Met vriendelijke groet,

---

**Van:** Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]  
**Verzonden:** woensdag 3 februari 2016 15:02  
**Aan:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** aanvullende informatie aanvraag AVD103002015403

Geachte leden van RUDEC,

Bij de CCD is een aanvraag tot projectvergunning ingediend waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het betreft het project "Drug development for malaria" met aanvraag nummer AVD103002015403. Uw advies dateert van 22 januari 2016.

In deze aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden m.b.t. de herhaalde bloedafname in dierproef 3.4.4.1. (DAP1).

In de aanvraag wordt beschreven dat vóór de toediening van een stof en binnen 24uur daarna maximaal 5 keer bloed wordt afgenomen door 'tail snip' tot een maximaal volume van 100ul. Wij willen u vragen om aanvullend advies betreffende de voorgestelde methode en het bloedvolume, en hoe u dit heeft meegewogen in uw ethische afweging.

In literatuur staat dat deze methode niet het meest aanbevolen is, en indien nodig om toch via staart snip bloed af te nemen, dan alleen onder algehele anesthesie bij voorkeur in een terminaal experiment. Daarnaast staat er dat wanneer herhaaldelijke bloedafname bij dezelfde muis wenselijk is, dan niet meer dan 4 keer binnen 24uur en 10ul/keer, en liever met een canule. Het totale volume van 100ul zoals in de voorliggende aanvraag is beschreven ligt boven deze aanbevolen hoeveelheid.

Literatuur bron:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3043327/>  
<https://www.nc3rs.org.uk/mouse-tail-snip-surgical>

<https://www.nc3rs.org.uk/mouse-decision-tree-blood-sampling>

Omdat de behandeltermijn niet opgeschort kan worden wanneer de CCD om aanvullend advies wordt gevraagd en wij deze vraag eventueel ook aan de onderzoeker willen voorleggen verzoeken we u om uiterlijk maandag, 8 februari 2016, u reactie hierop naar ons toe te sturen.

Met vriendelijke groet,

██████████  
██████████

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

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

**T: 0900 2800028**

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

Het Radboudumc staat geregistreerd bij de Kamer van Koophandel in het handelsregister onder nummer 41055629. The Radboud university medical center is listed in the Commercial Register of the Chamber of Commerce under file number 41055629.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Postbus 9101,  
6500 HB NIJMEGEN



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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD103002016403  
**Bijlagen**  
1

29 FEB 2016

Datum

Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 26 januari 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Drug development for malaria" met aanvraagnummer AVD103002016403. 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 algemene voorwaarden zoals genoemd in de vergunning.

U kunt met uw project "Drug development for malaria" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 april 2016 tot en met 31 maart 2021. Deze termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat de looptijd van de vergunning maximaal 5 jaar is. Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

### **Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie RU DEC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 22 januari 2016. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet. Wij hebben de DEC om aanvullende informatie gevraagd. Op 8 februari 2016 heeft de DEC gereageerd op onze vragen. De DEC heeft gereageerd op de vraag van de CCD over het gebruik van de 'tail snip' methode en het ongerief dat ermee gepaard gaat. Zij heeft, in overeenstemming met de aanvrager, aangegeven dat er een vergissing aan de kant van de aanvrager was en dat eigenlijk 'tail cut' bedoeld wordt. Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de

Dierexperimentencommissie. Wij nemen het advies van de commissie over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Met het oog op art. 10a, lid 1, worden twee algemene voorwaarden toegevoegd. Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

#### **Bezwaar**

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

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

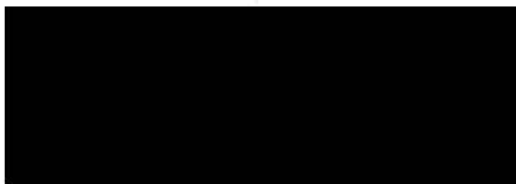
Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige voorziening vragen bij de Voorzieningenrechter van de rechtbank in de woonplaats van de aanvrager. U moet dan wel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

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

#### **Meer informatie**

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

Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:



#### **Bijlagen:**

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



## **Projectvergunning**

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

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

**Naam:** Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen  
**Adres:** Postbus 9101, [REDACTED]  
**Postcode en plaats:** 6500 HB NIJMEGEN  
**Deelnemersnummer:** 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 april 2016 tot en met 31 maart 2021, voor het project "Drug development for malaria" met aanvraagnummer AVD103002016403, volgens advies van Dierexperimentencommissie RU DEC.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED] voor de uitvoering van het project is Instantie voor Dierenwelzijn verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 26 januari 2016
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 26 januari 2016;
  - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 26 januari 2016;
  - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 22 januari 2016, ontvangen op 26 januari 2016, en aangevuld op 8 februari 2016.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
Pharmacokinetics of antimalarial drugs	Muizen ( <i>Mus musculus</i> ) / C57BL/6; beide geslachten; jonge dieren	300	Matig / moderate	
Pharmacokinetics of antimalarial drugs	Ratten ( <i>Rattus norvegicus</i> ) / Wistar of Brown Norway; beide geslachten; jonge dieren	300	Matig / moderate	
Efficacy studies of antimalarial drugs	Muizen ( <i>Mus musculus</i> ) / beide geslachten; jonge dieren	900	Matig / moderate	
Efficacy studies of antimalarial drugs	Ratten ( <i>Rattus norvegicus</i> ) / beide geslachten; jonge dieren	900	Matig / moderate	
Research tools	Konijnen ( <i>Oryctolagus cuniculus</i> ) / jonge dieren; beide geslachten	10	Matig / moderate	
Research tools	Cavia's ( <i>Cavia porcellus</i> ) / Duncan Hartle; jonge dieren; beide geslachten	10	Matig / moderate	
Research tools	Ratten ( <i>Rattus norvegicus</i> ) / beide geslachten; jonge dieren	20	Licht / mild	

#### Voorwaarden

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

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

In artikel 10, lid 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 een ontheffing is verleend.

## **Verzorging**

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

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

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

## **Pijnbestrijding en verdoving**

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

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

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

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

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

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

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

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





**Van:** Info-zbo  
**Verzonden:** maandag 29 februari 2016 10:27  
**Aan:** [Redacted]  
**CC:** [Redacted]  
**Onderwerp:** Beslissing aanvraag projectvergunning dierproeven  
**Bijlagen:** Beslissing aanvraag projectvergunning dierproeven AVD103002016403.pdf

Geachte heer/mevrouw,

Deze brief is ook per post verzonden.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)  
Nationaal Comité advies dierproevenbeleid [www.ncadierproevenbeleid.nl](http://www.ncadierproevenbeleid.nl)

.....  
Bezuidenhoutseweg 73 | 2594 AC | Den Haag Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag  
.....

**Van:** Info-zbo  
**Verzonden:** maandag 29 februari 2016 10:53  
**Aan:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** terugkoppeling besluit op aanvraag AVD103002016403

Geachte leden van RUDEC,

Op 22 januari 2016 heeft u advies uitgebracht op de projectaanvraag met titel 'Drug development for malaria', en aanvraagnummer AVD103002016403. Wij danken u voor uw advies en koppelen graag het oordeel van de CCD over deze aanvraag aan u terug. De CCD heeft besloten de vergunning te verlenen, onder de volgende algemene voorwaarden:

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

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.

De aanvrager en de verantwoordelijk onderzoeker zijn hierover ingelicht.

We hopen u op deze wijze voldoende geïnformeerd te hebben.

Met vriendelijke groet,

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

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

**T: 0900 2800028**

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