

Inventaris Wob-verzoek W16-22S									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTS2016408								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel				x	x			
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage beschrijving dierproeven				x	x			
5	DEC-advies				x	x			
6	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
7	Advies CCD		x						x
8	Beschikking en vergunning				x		x	x	



Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 24300 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen																
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">Naam instelling of organisatie</td> <td>Curax BV.</td> </tr> <tr> <td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td> <td>[REDACTED]</td> </tr> <tr> <td>KvK-nummer</td> <td>30183378</td> </tr> <tr> <td>Straat en huisnummer</td> <td>[REDACTED]</td> </tr> <tr> <td>Postbus</td> <td>[REDACTED]</td> </tr> <tr> <td>Postcode en plaats</td> <td>[REDACTED]</td> </tr> <tr> <td>IBAN</td> <td>NLOFTSB0844302087</td> </tr> <tr> <td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td> <td>Curax BV.</td> </tr> </table>	Naam instelling of organisatie	Curax BV.	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]	KvK-nummer	30183378	Straat en huisnummer	[REDACTED]	Postbus	[REDACTED]	Postcode en plaats	[REDACTED]	IBAN	NLOFTSB0844302087	Tenaamstelling van het rekeningnummer	Curax BV.
Naam instelling of organisatie	Curax BV.																	
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]																	
KvK-nummer	30183378																	
Straat en huisnummer	[REDACTED]																	
Postbus	[REDACTED]																	
Postcode en plaats	[REDACTED]																	
IBAN	NLOFTSB0844302087																	
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Curax BV.																	
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">Straat en huisnummer</td> <td>[REDACTED]</td> </tr> <tr> <td>Postbus</td> <td>[REDACTED]</td> </tr> <tr> <td>Postcode en plaats</td> <td>[REDACTED]</td> </tr> <tr> <td>IBAN</td> <td>NLOFTSB0844302087</td> </tr> <tr> <td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td> <td>Curax BV.</td> </tr> </table>	Straat en huisnummer	[REDACTED]	Postbus	[REDACTED]	Postcode en plaats	[REDACTED]	IBAN	NLOFTSB0844302087	Tenaamstelling van het rekeningnummer	Curax BV.						
Straat en huisnummer	[REDACTED]																	
Postbus	[REDACTED]																	
Postcode en plaats	[REDACTED]																	
IBAN	NLOFTSB0844302087																	
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Curax BV.																	
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">(Titel) Naam en voorletters</td> <td>[REDACTED]</td> <td style="width: 50%; text-align: right;"><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" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">(Titel) Naam en voorletters</td> <td>[REDACTED]</td> <td style="width: 50%; text-align: right;"><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]																	

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- | | |
|------------|----------------|
| Startdatum | 01 - 11 - 2015 |
| Einddatum | 01 - 11 - 2019 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Nieuwe medicatie voor COPD
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Nieuwe medicatie voor COPD
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|--------------------------------------|
| Naam DEC | De dierexperimentencommissie Utrecht |
| Postadres | Bureau van de DEC Utrecht |
| E-mailadres | dec-utrecht@umcutrecht.nl |

4 Betaalgegevens

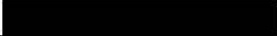
- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 935 Lege
- Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
- Via een eenmalige incasso
- Na ontvangst van de factuur
- Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1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


5 Checklist bijlagen

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

6 Ondertekening

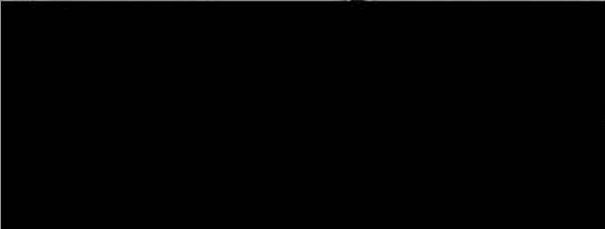
- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:
- Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag
- Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondergetekende verklaart:
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
 - dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
 - dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
 - dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
 - dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam 

Functie 

Plaats Utrecht

Datum 01 - 02 - 2016

Handtekening 





Format

Projectvoorstel dierproeven

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

1 Algemene gegevens

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

2 Categorie van het project

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

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

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

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

COPD (chronic obstructive pulmonary disease) is een chronische longziekte die wordt gekarakteriseerd door een abnormaal ontstekingsproces. Dit abnormale ontstekingsproces in de longen zorgt voor een

progressieve toename van luchtweg obstructie. Hierdoor hebben patiënten een verminderde longfunctie. Ontstekingscellen (waaronder neutrofiële granulocyten) en het immuunsysteem spelen een belangrijke rol bij deze ziekte. Aanhoudende ontstekingen kunnen leiden tot blijvende schade aan het bindweefsel van de longblaasjes (longemfyseem). Deze blijvende schade leidt tot zuurstof tekort in alle organen (1). Uiteindelijk kunnen deze patiënten niet meer normaal functioneren omdat ze in een rolstoel met zuurstof ondersteuning zitten voor de rest van hun leven. Door dit alles wordt de kwaliteit van leven aanzienlijk aangetast en is de levensverwachting aanzienlijk verkort.

Sigarettenrook is de bekendste risicofactor van COPD, maar ook luchtverontreiniging (2) en werkgerelateerde blootstelling aan biologische componenten (3) zijn gecorreleerd aan het ontstaan van COPD. Een groot punt van zorg is de COPD ontwikkeling in de lage en midden inkomen landen. Daar lopen vrouwen en kinderen het risico om COPD krijgen door het koken op biomassa in slecht geventileerde ruimtes. Echter is het toenemende aantal van rokende mensen door de opkomende economieën de belangrijkste factor. Een derde van de COPD patiënten woont in deze landen (4). Momenteel bestaan er feitelijk geen adequate therapieën om het ontstekingsproces bij COPD goed te behandelen.

De huidige therapie voor COPD patiënten bestaat uit luchtweg verwijders en hoge concentraties glucocorticosteroiden. Deze hoge concentraties glucocorticosteroiden zijn echter matig tot niet effectief en zorgen voor veel bijwerkingen. Hierdoor is de levenskwaliteit van deze mensen slecht.

Voorschrijven van deze grote hoeveelheden glucocorticosteroiden (en het behandelen van de bijeffecten) zijn ook erg duur. Er is wereldwijd enorme belangstelling om potente anti-inflammatoire behandelingen te vinden tegen de levensbedreigende ziekten als COPD. Deze studie zal bijdragen aan inzichten in en het vinden van nieuwe anti-inflammatoire behandelingen tegen COPD. Gezien de bijwerkingen van glucocorticosteroiden (osteoporose, huidverdunding en onderhuidse bloedingen, huidstriae, spieratrofie (dit is nadelig bij COPD), slechte wondheling, hoge bloeddruk, diabetes, bijnierschors insufficiëntie) en de prevalentie van ongevoeligheid voor gluco corticosteroiden, is er vraag naar nieuwe strategieën om de chronische luchtweg ontstekingen tegen te gaan.

COPD-patiënten worden gekenmerkt door een toename van neutrofielen en alveolaire macrofagen en lymfocyten. De alveolaire septa in de longen worden afgebroken en er komt long collageen vrij, dat vervolgens weer wordt afgebroken in kleinere fragmenten die proline en glycine herhalingen (PGP) bevatten (5,6). Sigarettenrook is in deze ontwikkeling van COPD de grootste veroorzakende factor. PGP vertoont chemotactische activiteiten en bevordert de migratie van neutrofiële granulocyten naar de ontstekingshaarden. Het enzym dat verantwoordelijk is voor de vrijzetting van PGP is prolyl endopeptidase. Een verhoogde prolyl endopeptidase activiteit leidt dus tot meer PGP en een verhoogde migratie van ontstekings cellen naar de longen (5,6).

In de afgelopen 4 jaar hebben wij verschillende rookmodellen getest met muizen om de theorie te testen dat het aangrijpen op de PGP cascade inderdaad inflammatie in de longen kan remmen. Dit werk is al gedeeltelijk gepubliceerd en een andere deel zal spoedig gepubliceerd worden. Deze rookmodellen waren onderdeel van de PhD project van [REDACTED].

In dit project voorstel beschrijven we enkele muizenmodellen waarin nieuwe prolyl endopeptidase remmers getest zullen worden. Om een vertaalslag te maken naar de kliniek, wordt gelijktijdig ook een onderzoek uitgevoerd met patiënten materiaal. In samenwerking met longartsen uit [REDACTED], wordt patiënt materiaal getest van patiënten met en zonder COPD. Bovendien zijn de COPD patiënten ook gediagnostiseerd op ernst (matig tot ernstig COPD). In dit patiënt materiaal (bloed en sputum) worden inflammatie mediators gemeten waaronder PGP waarden. De informatie die hieruit wordt verkregen wordt in een latere stadium gebruikt om beter en doelgerichter COPD patiënten te kunnen behandelen met een prolyl endopeptidase remmer.

De muizenmodellen bestaan uit het volgende:

In een 5 daags rook model hebben wij de zwakke prolyl endopeptidase remmer valproïne zuur getest. De inflammatie in de longen bij de muizen dat te zien was na 5 dagen, was voor een groot deel teniet gedaan door het remmen van dat enzym (7,8). Ook hebben we een ander prolyl endopeptidase remmer getest in een 6 weeks rook model in muizen. Ook hierbij bleek deze therapie aan te slaan in het

verminderen van de inflammatoire gevolgen door toedoen van sigarettenrook. Dit was te zien in de longen van de muizen maar ook in het hart. Behandelde muizen ontwikkelden geen rechter ventrikel hypertrofie van het hart, waar onbehandelde muizen die aan sigarettenrook zijn blootgesteld dat wel deden (8). Tenslotte hebben we een chronisch model getest, waarbij muizen 6 maanden aan rook werden blootgesteld. Hierbij kregen de muizen een middel dat PGP bindt en hiermee inactieveert. De onbehandelde muizen ontwikkelden symptomen die gelijk zijn aan die van COPD patiënten: longemfyseem en hartproblematiek. De behandelde muizen hadden deze symptomen in veel mindere maten tot geheel niet (8).

Nu dat we al deze experimenten hebben uitgevoerd, hebben we een "proof of concept" dat het aangrijpen op de PGP cascade in muismodellen voor COPD, de COPD fenotype doet verminderen tot geheel voorkomen. Ook weten we dat het lichte ongerief die de muizen ondergaan door de sigaretten rook nog minder wordt door een behandeling die op PGP aangrijpt. Een voorbeeld daarvan is dat muizen die aan rook blootgesteld worden meer lichaamsgewicht verloren tijdens onze 6 maanden model wanneer ze niet behandeld werden (8).

Een laatste model dat ook van grote interesse is in dit onderzoek, is de zogenaamde glucocorticosteroiden resistentie model. In dit model worden muizen blootgesteld aan rook om een situatie in de muizen te creëren die zeer vergelijkbaar is aan COPD. De muizen zijn na herhaalde blootstelling aan rook allemaal ongevoelig voor glucocorticosteroiden. 90% van de patiënten met COPD reageert niet op glucocorticosteroiden behandeling. Die overige 10% van de patiënten hebben meer eosinofielen in hun longen, wat wijst op gelijktijdige astma in de patiënt, waarbij glucocorticosteroiden wel goed werken (9). Dit model bestaat uit rook blootstelling gedurende 10 dagen. Na 5 dagen roken zijn de muizen ongevoelig voor glucocorticosteroiden. Wij vragen ons af of een prolyl endopeptidase remmer deze glucocorticosteroiden resistentie kan overkomen. Dit willen we testen door de muizen op dagen 6 t/m 10 te behandelen met een prolyl endopeptidase remmer alleen of in combinatie met een glucocorticosteroid om een eventueel synergetisch effect te kunnen waarnemen. Hoewel wij veel ervaring hebben met dit model, hebben we nog nooit dit model gebruikt in het bijzijn van een behandeling dat op de PGP systeem aangrijpt.

Wij verwachten dat bovenstaand muizenmodellen een goede voorspellende waarde hebben voor het uiteindelijk testen van deze teststoffen in COPD patiënten.

De [REDACTED] is zeer geïnteresseerd in onze onderzoeken en wil op basis van onze werk nieuwe geneesmiddelen voor COPD ontwikkelen (8). In de komende jaren willen we in muizen korte en lange rookmodellen uitvoeren. In deze modellen willen we nieuwe moleculen testen die op het PGP systeem aangrijpen. Deze moleculen zijn nog niet goed gekeurd voor het gebruik bij mensen met luchtwegaandoeningen. Voor gebruik van deze moleculen bij de mens moet de werkzaamheid eerst bewezen worden in een diermodel. Wanneer we uiteindelijk een stof hebben dat bij alle muizenmodellen effectief bleek te zijn, wil [REDACTED] dit middel aan patiënten met COPD geven om zo uiteindelijk een nieuwe therapie tegen COPD op de markt te kunnen brengen.

De nieuwe moleculen die [REDACTED] aanlevert zijn remmers van het enzym prolyl endopeptidase dat dus PGP uit collageen vrijmaakt. Er zullen verschillende remmers gesynthetiseerd door [REDACTED] en uitvoerig getest worden. Deze remmers verschillen op moleculaire niveau van elkaar maar hebben allemaal dezelfde aangrijpingpunt. Het is belangrijk om meerdere remmers te testen omdat het kan zijn dat de ene remmer een bepaalde bijwerking kan hebben die de andere remmers niet hebben. Post mortem zullen de muizen daarom ook op dergelijke bijwerkingen gecontroleerd worden. Denk hierbij aan afwijkingen in de longweefsel of hartweefsel bij histologie onderzoek.

[REDACTED] zal zelf eerst intensief de prolyl endopeptidase remmers onderzoeken in vitro. Onder andere wordt gekeken naar affiniteit van de remmer voor prolyl endopeptidase. Alleen moleculen met een hoge affiniteit voor het enzym van belang (prolyl endopeptidase) zullen in aanmerking komen voor het testen in de genoemde muismodellen. Wij, als onderzoekers binnen Curax, zullen ten alle tijden met [REDACTED] overleggen over de geselecteerde moleculen om zeker te zijn dat we niet onnodig muizen voor dit onderzoek opofferen.

Bovendien wordt er in samenwerking tussen Curax en [REDACTED] gelijktijdig onderzoek verricht naar de rol

van PGP in COPD patiënten. Het doel hiervan is om een COPD subpopulatie te kunnen identificeren die waarschijnlijk baat heeft bij het gebruik van een prolyl endopeptidase remmer. Hierdoor kunnen we na afronding van de dierexperimenten starten met het testen van het nieuwe geneesmiddel op COPD patiënten.

Curax BV voert de experimenten uit binnen de afdeling Farmacologie, UIPS, UU. De afdeling Farmacologie heeft reeds vele jaren ervaring met immunologische en fysiologische parameters in muizen die representatief zijn voor COPD in de mens (zoals luchtwegfunctie, aantal cellen in de longen, typen ontstekingscellen, ontstekingsmediatoren) (10,11).

- (1) O'Donnell et al, Chronic obstructive pulmonary disease: clinical integrative physiology. Clin Chest Med. 2014, 35:51-69.
- (2) Ko et al, Air pollution and chronic obstructive pulmonary disease. 2012, 17:395-401.
- (3) Metheson et al, Biological dust exposure in the workplace is a risk factor for chronic obstructive pulmonary disease. 2005, 60:645-651.
- (4) Gordon et al, Respiratory risks from household air pollution in low and middle income countries. Lancet Respir Med. 2014, 10:823-60.
- (5) Weathington NM, van Houwelingen AH, Noerager BD, Jackson PL, Kraneveld AD, Galin FS, Folkerts G, Nijkamp FP, Blalock JE. A novel peptide CXCR ligand derived from extracellular matrix degradation during airway inflammation. Nat Med 2006;12:317-323.
- (6) Gaggar A, Jackson PL, Noerager BD, O'Reilly PJ, McQuaid DB, Rowe SM, Clancy JP, Blalock JE. A novel proteolytic cascade generates an extracellular matrix-derived chemoattractant in chronic neutrophilic inflammation. J Immunol 2008;180:5662-5669.
- (7) Abdul Roda M et al. Targeting prolyl endopeptidase with valproic acid as a potential modulator of neutrophilic inflammation. PLoS One 2014;9:e97594.
- (8) Thesis: The matrikine PGP in lung diseases: a translational study. M. Abdul Roda, 2015.
- (9) Schäcke et al, Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. Pharmacol. & Ther. 2002, 96:23-46.
- (10) Barnes, Cellular and molecular mechanisms of chronic obstructive pulmonary disease, Clin Chest Med. 2014, 35:71-86.
- (11) Braber et al, An association between neutrophils and immunoglobulin free light chains in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med. 2012, 185:817-24.

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

Hypothese: Wanneer het enzym prolyl endopeptidase geremd wordt, zal er minder PGP aangemaakt worden. Hierdoor zal de migratie van neutrofielen naar de broncho alveolaire lavage afnemen. Als gevolg hiervan zal de fenotype van COPD, zoals long emfyseem en rechter ventrikel hypertrofie van het hart zich niet of minder voordoen.

Hoofddoel: Het testen van nieuwe prolyl endopeptidase remmers in muizen om uiteindelijk deze remmers in patiënten met COPD te kunnen testen.

We weten dat dit onderzoek haalbaar is, omdat we drie van de vier muizenmodellen eerder hebben uitgevoerd met andere PGP remmers: het 5 daags, 6 weeks en 6 maandse rookmodel zijn eerder in muizen getest met een interventie dat op het PGP systeem is gericht. Om echter tot een product te komen dat uiteindelijk in mensen getest kan worden op effectiviteit, moet deze eerst in muizenmodellen getest worden. Wanneer een compound in onze diermodellen effectief blijkt in het bestrijden van COPD symptomen, zoals emfyseem en hart hypertrofie, zal deze richting de METC gaan om in COPD patiënten

getest te worden.

Een tweede doel van deze onderzoeken zal zijn om meer over de rol van PGP te leren tijdens inflammatie. De onderzoeken die reeds zijn uitgevoerd hebben zich erg gefocust op primaire uitkomsten zoals nietrofielen influx in de longen, long emfyseem en hart hypertrofie. Er is echter niet gekeken naar de effecten op andere immuuncellen zoals B en T cellen, ook is het effect op cytokines en epitheelcellen niet onderzocht. Dat zijn onder andere zaken die we nu beter onder de loep willen nemen. Het effect van PGP remming in een glucocorticosteroid resistentie model is ook nog nooit onderzocht. Deze resultaten zullen dan ook te beschikking staan voor een eventuele wetenschappelijke publicatie. Directe effecten van de moleculen die door █████ worden aangeleverd mogen niet gepubliceerd worden.

Dit onderzoek heeft behalve een extra waarde voor het komen tot een nieuwe therapie voor COPD, ook een fundamenteel onderzoeksgerichte waarde dat ons meer zal leren over de rol van PGP tijdens inflammatie. Deze bevindingen kunnen in latere onderzoeken weer van belang zijn voor een eventueel nieuwe geneemiddelontwikkeling.

3.3 Belang

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

De World Health Organization heeft berekend dat COPD in 2020 de 3e doodsoorzaak wereldwijd zal zijn. Er wordt steeds meer aandacht besteed aan preventie, maar dit zal niet leiden tot een complete verdwijning van het probleem (12). Want

- A. net zoals andere verslavingsziekten zoals bijvoorbeeld overgewicht, is het vaak moeilijk voor mensen om te stoppen met hun slechte gewoontes.
- B. in het Westen neemt het aantal rokers af, echter niet onder de lager opgeleiden. In het Oosten neemt het aantal rokers toe door de verbeterde economische omstandigheden.
- C. in lage en midden inkomen landen komt COPD veel voor onder vrouwen en kinderen door het koken en verwarmen op biomassa.

De ziekte COPD zorgt voor veel uitval op het werk. De uitval op het werk is hoog door de uiteindelijke invaliditeit. Ook is het kostbaar om de symptomen in deze progressieve ziekte te verlichten. Deze kosten lopen op door de oplopende prevalentie van COPD.

Deze experimenten zouden kunnen leiden tot een effectieve therapie voor COPD patiënten. Hierdoor zou deze groep patiënten weer kunnen bijdragen aan het arbeidsproces en wellicht minder ziekenhuisbezoeken en opnames nodig hebben.

In de afgelopen 4 jaar hebben wij verschillende rookmodellen getest met muizen om de theorie te testen dat het aangrijpen op de PGP cascade inderdaad inflammatie in de longen kan remmen. Dit werk is al gedeeltelijk gepubliceerd en een andere deel zal spoedig gepubliceerd worden. Deze rookmodellen waren onderdeel van de PhD project van Mojtaba Abdul Roda. In juni 2015 heeft hij hiervoor de Utrecht Institute for Pharmaceutical Sciences PhD Competition 2015 prijs gewonnen. In oktober werd zijn werk bekroont met de hoofdprijs tijdens de nationale PhD competitie Pharmaceutical Sciences tijdens de Figo Dutch Medicine Days. In beide gevallen werd zijn werk geroemd om de vertaalslag naar de mens.

(12) World Health Organization. WHO Statistical Information System (WHOSIS). Available from: <http://www.who.int/whosis/whostat/2008/en/index.html>. Published 2008 Jan 1.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

De compounds zijn allemaal remmers van het enzyme prolyl endopeptidase. Alvorens █████ de compounds aanlevert, zullen wij ten alle tijden in discussie gaan met █████ waarom deze compounds gekozen zijn. Als er voldoende in vitro bewijs is dat een compound een mogelijk anti inflammatoire effect heeft in vivo, zal deze in de diermodellen ingezet worden. Er wordt o.a. gekeken naar remmings

constante van de remmer op prolyl endopeptidase en naar dosis response curves. Deze remmers verschillen op moleculaire niveau van elkaar maar hebben allemaal dezelfde aangrijpingpunt. Het is belangrijk om meerdere remmers te testen omdat het kan zijn dat de ene remmer een bepaalde bijwerking kan hebben die de andere remmers niet hebben. Post mortem zullen de muizen daarom ook op dergelijke bijwerkingen gecontroleerd worden. Denk hierbij aan afwijkingen in de longweefsel of hartweefsel bij histologie onderzoek.

In eerdere proeven hebben wij vastgesteld dat het aangrijpen op de PGP cascade in rookmodellen in muizen, de ontstekingen in de longen kan tegen gaan. Daarom willen we in dit onderzoek verschillende kort durende en lang durende modellen gebruiken waarbij wij nieuwe moleculen willen testen tegen de ontstekingen in de longen. We zullen eerst korte rook modellen in muizen testen zodat we zeker weten dat de moleculen effect hebben op de ontstekingen. Wanneer deze moleculen effectief blijken in korte modellen, zullen we langere modellen draaien. Indien deze moleculen weer effectief blijken, zullen we chronische rookmodellen gebruiken welke het meest de effecten van COPD weergeven. Indien een teststof in alle gevallen effectief blijkt te zijn (statistisch significante daling van ontstekingsparameters zoals neutrofiel aantallen en PGP waarden in bloed of long lavage) zal deze in overleg met ██████ in COPD patiënten getest worden. Het kan zijn dat ██████ soms ervoor kiest om een stof eerst zelf in een in vivo model te testen. In overleg met ons kan dan besloten worden om deze teststof dan direct in bijvoorbeeld een 6 weekse model te testen en dus geen 5 daags of 10 daags model te doen. Dit zal alleen gebeuren indien wij voldoende vertrouwen erin hebben dat deze teststof potentie heeft effectief te zijn in het model waarin wij deze zullen testen.

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

Op basis van de ervaring in ons laboratorium, de expertise die wij in huis hebben in het luchtwegontstekingsveld (7,11) en de acceptatie van dit model in de wetenschappelijke wereld kiezen wij voor het muizen rookmodel. Muizen worden in dit model 2 maal per dag met minimaal 5 uur rust blootgesteld aan lucht of sigaretten rook (max. 20-25 min). Deze blootstelling kan 5, of 10 dagen duren (korte model). Hierna wordt een sub-chronisch model gedaan van 6 weken. Indien dit model succesvol blijkt te zijn, wordt een 6 maanden model gedaan. 1 dag na de laatste blootstelling aan sigarettenrook bij elke rookmodel, zullen de muizen worden opgeofferd.

Er zal per teststof met ██████ overlegd worden welke toedieningsvorm gehanteerd moet worden. Bij voorkeur gaat de keuze naar een orale toedieningsvorm voor de muizen. Hierdoor zou een vertaalslag naar tablet vorm voor COPD patiënten in de toekomst makkelijker zijn.

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

Zoals eerder vermeld, wordt er in verschillende fases een molecuul getest. Indien een molecuul in een kortdurend model werkzaam blijkt te zijn, wordt deze in een langer model getest. Is het molecuul niet werkzaam bij een model, dan wordt in overleg met ██████ besproken of er op een ander molecuul overgegaan moet worden of dat we iets moeten veranderen.

Wanneer we een nieuwe teststof krijgen van ██████ die we willen testen in een diermodel zullen we eerst vragen of we binnen korte tijd nog een teststof kunnen verwachten om deze tegelijk te kunnen testen.

Hieronder is de beslisboom weergegeven:

Nieuwe teststof -> 5 daags model -> effectief? Dan in een 10 daagse model de optimale dosering zoeken door max. 4 verschillende doseringen te proberen.
-> niet effectief? Dan in overleg met ██████ een andere teststof testen.

-> 10 daagse dose finding model: de meeste effective dosering gaat verder als test dosering. Deze wordt uitgeprobeerd in een 6 weeks model en eventueel ook in een 10 daags combinatie model, in overleg met ██████

-> 6 weeks model -> effectief? Dan uitproberen in een 6 maanden model en eventueel ook in een 10 daags model, in overleg met ██████
-> niet effectief? Dan in overleg met ██████ een andere teststof testen.

-> 6 maanden model -> effectief? Dan met ██████ overleggen om in de mens te testen
-> niet effectief? Dan in overleg met ██████ een andere teststof testen.

De 10 daagse combinatie model wordt voornamelijk gedaan om de rol van PGP tijdens ontstekingen beter te begrijpen en heeft daarom geen vaste plek in de beslisboom. Een tweede doel hiervan is om te kijken of het remmen van de aanmaak van PGP de glucocorticosteroïde resistentie kan doorbreken.

Effectiviteit wordt gebaseerd op een statistisch significant verschil met de controle groep ($p < 0.05$) bij de volgende parameters: aantallen neutrofielen in de long lavage, PGP waarden in long lavage en/of bloed. Bij de 6 weken en 6 maanden model wordt ook naar longfunctie gekeken van de muizen. Verder is de 6 maanden experiment alleen geslaagd indien behandelde muizen geen emfyseem ontwikkelen en onbehandelde muizen dat wel doen na blootstelling aan rook.

In de 10 dagen combinatie model wordt gekeken of glucocorticosteroiden resistentie doorbroken kan worden. Een teststof is dat geval effectief indien deze een statistisch significant verbetering (verlaging) vertoont t.o.v. de groep muizen dat resistentie heeft ontwikkeld voor dexamethason ($p < 0.05$). Er wordt gekeken naar de volgende parameters: aantallen neutrofielen in de long lavage, PGP waarden in long lavage en/of bloed.

Het is noodzakelijk dat een teststof uiteindelijk effectief blijkt te zijn in de 6 maanden model. Echter het is te riskant om een middel meteen in een 6 maanden model te testen. Indien deze geen anti inflammatoire werking heeft zal dus voor niks 6 maanden lang muizen berooft en behandeld worden. Daarom worden de beschreven rookmodellen in de genoemde volgorde gedaan. Door de beslisboom aan te houden vergroten we de kans om uiteindelijk een teststof in de 6 maanden model te testen die long emfyseem door toedoen van roken werkelijk kan tegen gaan in onze muizen model.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	rookmodel
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	

9	
10	



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef |
|------------|----------------|
| 1 | Rookmodel |

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

De keuze van de specifieke prolyl endopeptidase remmers is gebaseerd op bevindingen die gedaan zijn door ██████████

Om nu inzicht te krijgen in de effecten van de behandeling met prolyl endopeptidase-remmers in een compleet immuunsysteem en een ontstekingen in de luchtwegen, wordt er gebruik gemaakt van het in vivo rookmodel.

De volgende rook modellen willen we in de komende 2 jaar uitvoeren:

- 5 dagen rook model
- 10 dose finding model
- 6 weken rookmodel
- 6 maanden rookmodel.
- 10 dagen combinatie rookmodel

Een teststof wordt effectief benoemd indien er een statistisch significant verschil is met de controle groep ($p < 0.05$) bij de volgende parameters: aantallen neutrofielen in de long lavage, PGP waarden in long lavage en/of bloed. Bij de 6 weken en 6 maanden model wordt ook naar longfunctie gekeken van de muizen. Verder is de 6 maanden experiment alleen geslaagd indien behandelde muizen geen emfyseem ontwikkelen en onbehandelde muizen dat wel doen na blootstelling aan rook.

De 5 daagse rookmodel is bedoeld om in een kort tijdsbestek snel te kunnen testen of een prolyl endopeptidase-remmer anti inflammatoire werking heeft. Hierbij worden muizen twee keer per dag aan rook blootgesteld en worden de muizen dagelijks behandeld met de remmer.

De effectieve teststoffen worden voordat ze verder worden getest in een 6 weken rook model of een 10 dagen combinatie model, eerst in verschillende doseringen test in een 10 daagse dose finding rookmodel. Hierbij worden muizen 10 dagen lang 2 keer per dag gerookt en behandeld met maximaal 4 verschillende doseringen van de teststof. Dit is een vorm van verfijning om verder te kunnen werken met een optimale dosering.

In de 6 weken model worden muizen wederom 2 maal per dag gerookt en dagelijks behandeld met een prolyl endopeptidase remmer (standaard regime van 5 dagen per week rook en behandeling) met de optimale dosering uit de 10 dagen dose finding studie. Dit is een sub-chronisch model om een idee te krijgen of deze remmer potentie heeft om gedurende een langere periode effectief te zijn. Indien dat het geval is, wordt overgegaan op een 6 maanden model.

De 6 maanden model bestaat uit een eenmaal daagse rook blootstelling en een dagelijkse behandeling met de remmer (standaard regime van 5 dagen per week rook en behandeling). Dit is een model voor long emfyseem. Uit ervaring weten we dat muizen gedurende deze blootstellingsperiode longemfyseem ontwikkelen (3). Dit houdt in dat longblaasjes worden afgebroken en de longen minder efficiënt zal zijn in het uitwisselen van gassen met bloed. Dit is een goed model voor long emfyseem welk voorkomt bij patiënten met COPD. Om een therapeutische benadering te volgen, zal er ook een groep worden gebruikt waarbij de muizen de eerste 10 weken alleen rook krijgen en geen behandeling, de rest van de 6 maanden zullen deze muizen wel behandeld worden met een remmer en aan rook blootgesteld worden. Het idee achter deze aanpak is dat hierdoor de muizen eerst een ontsteking in de longen kunnen ontwikkelen en hierna behandeld worden. COPD patiënten hebben namelijk ook eerst ontstekingen en worden na diagnose pas behandeld. Echter blijft ongeveer 50% van hen na diagnose roken (<http://www.cdc.gov/nchs/fastats/copd.htm>).

In de 10 dagen combinatie rookmodel wordt gekeken of glucocorticosteroiden (GCS) resistentie doorbroken kan worden. COPD patiënten hebben namelijk vaak GCS resistentie waardoor deze medicatie niet werkzaam zijn. Binnen Curax hebben we dit model ontworpen waarbij muizen gedurende 10 dagen 2 keer per dag aan sigarettenrook worden blootgesteld. Na de eerste 5 dagen ontwikkelen de muizen GCS waardoor een behandeling met een GCS tijdens de laatste 5 dagen geen baat meer levert. Er wordt getest of deze muizen bij een behandeling met een prolyl endopeptidase remmer deze resistentie kunnen doorbreken. Een teststof is effectief indien deze een statistisch significant verbetering (verlaging) vertoont t.o.v. de groep muizen dat resistentie heeft ontwikkeld voor de GCS ($p < 0.05$). Er wordt gekeken naar de volgende parameters: aantallen neutrofielen in de long lavage, PGP waarden in long lavage en/of bloed.

Primaire uitkomstparameters zijn het aantal en type ontstekingscellen in de broncho-alveolaire lavage (BAL) vloeistof. Deze BAL vloeistof wordt verkregen door de muis intraperitoneaal een overdosis euthasaat toe te dienen. Nadat de dood is ingetreden wordt er bloed afgenomen via een hart punctie. Verder wordt via een slangetje in de luchtpijp saline ingespoten en terug gezogen in de longen (long lavage). Het aantal en type ontstekingscellen wordt gemeten in de verkregen vloeistof. Deze cellen zijn indicatief voor de effectiviteit van de behandeling

Secondaire parameters zijn ontstekingsparameters (cytokines en PGP) in bloed en in de BAL vloeistof, histologische karakterisering van het longweefsel en de luchtwegfunctie.

Luchtwegfunctie wordt voorafgaand aan de euthanasie gemeten indien de muizen 6 weken of 6 maanden aan rook zijn blootgesteld. Hiertoe wordt de luchtwegweerstand en dynamische compliantie gemeten in de EMKA opstelling. De muizen worden daartoe onder anesthesie gebracht met KM-mix (i.p. 0.1 ml/10 g KMmix (Ketamine (125 mg/kg)-Medetomidine (0.2 mg/kg)) en worden geventileerd waarna ze worden blootgesteld aan toenemende concentraties metacholine (0.37 mg/ml tot 25mg/ml).

Deze secundaire parameters zijn belangrijk om de effectiviteit te kunnen onderbouwen.

De rookmodellen in muizen zijn inmiddels goed gestandaardiseerd waardoor wij in de huidige studie het effect van de specifieke prolyl endopeptidase remmers betrouwbaar kunnen bestuderen (1,2). Tevens is er heel veel ervaring opgedaan en kennis vergaard omtrent het meten van de luchtwegfunctie (3). Hierdoor kunnen we nu met een n van 10 muizen per groep duidelijke verschillen tussen de groepen meten wanneer we luchtwegfuncties willen meten. We zullen groepen vergelijken die niet behandeld zijn met actieve medicatie, dan wel behandeld zijn met specifieke prolyl endopeptidase remmers.

Uitsluitend noodzakelijke controle groepen worden meegenomen.

Met deze experimentele aanpak en uitleesparameters verwachten wij na te kunnen gaan of deze nieuwe prolyl endopeptidase remmers werkzaam zijn in een in vivo setting waarbij de longen ontstoken raken door sigaretten rook.

(1) Abdul Roda M et al. Targeting prolyl endopeptidase with valproic acid as a potential modulator of neutrophilic inflammation. PLoS One 2014;9:e97594.

(2) Thesis: The matrikine PGP in lung diseases: a translational study. M. Abdul Roda, 2015.

(3) Verheijden et al, Measurement of airway function using invasive and non-invasive methods in mild and severe models for allergic airway inflammation in mice. Front Pharmacol. 2014, 5:190-196

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

Muizen worden blootgesteld aan lucht of sigarettenrook voor maximaal 20-35 min, 2 maal per dag met 5 uur rust, gedurende 5 dagen, 10 dagen, of 6 weken (5 dagen per week). In de 6 maanden model worden muizen slecht 1 keer per dag berookt en behandeld. De beroking duurt wederom 20-35 min. De sigaretten zijn standaard onderzoeks-sigaretten (Kentucky) die door onze groep en andere onderzoeksgroepen al jaren wordt gebruikt (<http://www2.ca.uky.edu/refcig/>). In de 10 dagen model worden na 5 dagen rook blootstelling GCS ongevoeligheid ontwikkeld. Vanaf dag 6 tot en met dag 10 worden de muizen behandeld met een GCS alleen of in combinatie met een prolyl endopeptidase remmer. De prolyl endopeptidase remmers zullen bij voorkeur oraal toegediend. Dit zal bij elk teststof in overleg met ██████ afgesproken worden. Een mogelijk andere route kan zijn een intratracheale route. Indien er wordt gekozen voor een intratracheale toediening, wordt de muis alvorens de toediening onder een kort roesje gebracht (5% isofluraan). De GCS wordt intraperitoneaal toegediend. 1 dag na de beindiging van de dierproeven worden de dieren opgeofferd en wordt de mate van luchtwegontsteking gekwantificeerd.

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

Alle genoemde muizen modellen zijn al vaak gebruikt en daar hebben wij dus veel ervaring mee (1). Door deze ervaring weten we het aantal muizen dat uitvalt zoveel mogelijk te beperken. Het aantal muizen per groep is per experiment anders en zal altijd gebaseerd zijn op een power analyse. Statistisch significantie van de resultaten na een experiment wordt berekend door gebruik te maken van een one-way ANOVA test met een post hoc test.

We proberen zoveel mogelijk teststoffen tegelijk te testen om zo het aantal benodigde muizen laag te houden: controle groepen hoeven niet dubbel te worden gebruikt.

De uitval van dieren wordt onder andere minimaal gehouden door tijdens het roken van de muizen de zuurstof en koolstof monooxide te meten. Door toediening van extra lucht wordt voorkomen dat de muizen verstikken.

Het is de bedoeling alleen stoffen te testen waar we als onderzoekers voldoende vertrouwen in hebben dat deze zullen slagen om zo onnodig ongerief voor de muizen te voorkomen. Door onze aanpak waarbij een teststof alleen in een lange diermodel wordt gebruikt nadat deze effectief is gebleken in kortere diermodellen, wordt niet onnodig veel muizen gebruikt. Hierdoor wordt het aantal dieren beperkt.

(1) Thesis: The matrikine PGP in lung diseases: a translational study. M. Abdul Roda, 2015.

B. De dieren

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

De dierproeven zullen gedaan worden met balb/c muizen van 8-10 weken oud. Deze keuze is gebaseerd op eerder werk van ons welk positieve resultaten opgeleverd heeft (1). Balb/c muizen vertonen hoge neutrofiële influx in de longen na blootstelling aan sigarettenrook (1,2). In het onderzoek van Morris et al.

Uit 2008, zijn Balb/c, C57BL/6, A/J en 129/Sv met elkaar vergeleken op ontstekingsparameters na blootstelling aan sigaretten rook. Uit dat onderzoek is naar voren gekomen dat de Balb/c muizen een hogere neutrofielen influx vertonen vergeleken met de andere muis soorten. Neutrofielen influx is een van de belangrijkste parameters voor onze onderzoek en speelt bij COPD patienten een grote rol. Daarom willen we ook in onze experimenten gebruik maken van de Balb/c muis. Het gebruik van rookmodellen in muizen kan van grote waarde zijn voor het selecteren van compounds die in mensen ook effectief kunnen zijn (3).

Verder wordt er gekozen om met vrouwtjes muizen en mannetjes muizen te werken. Hierdoor wordt in beide geslachten het effect gemeten. In de kort durende modellen (5 en 10 dagen lang) zal er met mannetjes gewerkt worden. In de langere modellen (6 weken en 6 maanden) zal er met vrouwtjes gewerkt worden. De voornaamste reden hiervoor is dat in een 6 weekse of 6 maandse model mannetjes agressief tegen elkaar zullen zijn. Hierdoor kan extra uitval ontstaan. Uit eerder experimenten hebben we gezien dat bij langere huisvesting van mannetjes muizen er veel agressie onderling ontstaat. Deze problematiek is niet bij vrouwtjes muizen teruggezien.

Het aantal muizen per groep is per experiment anders en zal altijd gebaseerd zijn op een power analyse op basis van de meest recente en relevante data. Het aantal voorgestelde muizen in de onderstaande dierexperimenten zijn berekend op basis van de beschikbare data op dit moment.

Er wordt gestreeft om meerdere compounds per experiment te testen om het aantal dieren te verminderen (minder vaak een controle groep). De compounds zijn remmers van het enzyme prolyl endopeptidase. Ze verschillen echter van elkaar op moleculair niveau waardoor de bindingsaffiniteit met het enzyme kan verschillen.

Alvorens de compounds aanlevert, zullen wij ten alle tijden in discussie gaan met waarom deze compounds gekozen zijn. Als er voldoende in vitro bewijs is dat een compound een mogelijk anti inflammatoire effect heeft in vivo, zal deze in de diermodellen ingezet worden. Er wordt o.a. gekeken naar remmings constante van de remmer op prolyl endopeptidase en naar dosis response curves.

5 dagen model

Door onze lange ervaring met de muizenmodellen, is een minimale uitval te verwachten. **Bij de korte modellen (5 en 10 dagen model) verwachten we geen uitval.** Hierdoor hebben we bij de 5 dagen model genoeg aan 7 muizen met groep. De reden om 7 muizen per groep te gebruiken is dat voor de PGP bepalingen er 7 samples nodig zijn ivm variatie. Indien er gestart wordt met 4 verschillende remmers, dan zijn er in totaal 6 groepen (2 controle groepen: lucht en rook) en dus 42 muizen nodig.

10 dagen dose finding model

Door onze lange ervaring met de muizenmodellen, is een minimale uitval te verwachten. **Bij de korte modellen (5 en 10 dagen model) verwachten we geen uitval.** Hierdoor hebben we bij deze 10 dagen model genoeg aan 7 muizen met groep. De reden om 7 muizen per groep te gebruiken is dat voor de PGP bepalingen er 7 samples nodig zijn ivm variatie. Er zullen maximaal 4 verschillende doseringen getest worden, dus 4 groepen. Verder zijn er nog 2 controle groepen (2 controle groepen: lucht en rook). Met in totaal 6 groepen komt het totaal op 42 muizen.

6 weken model

Indien er een positief effect (zoals eerder beschreven in sectie 3.4.3) gevonden wordt in een kort model, wordt een 6 weekse model gedaan. Dit gebeurt met maximaal 2 remmers. Uit ervaring weten we dat we hiervoor 16 dieren nodig hebben per groep. **De reden hiervoor is dat er voor de longfunctie meting met de EMKA er minimaal 9 muizen per groep nodig zijn. Verder moet er ook naar de structuur gekeken worden van de longen (histologie). Hiervoor zijn minimaal 6 muizen per groep nodig. Verschillen in histologie zullen dmv. microscopie en software gekwantificeerd worden. Omdat het 6 weken roken en behandelen van muizen betreft, is er een uitval van 1 muis per groep denkbaar. $9+6+1=16$ muizen per groep. Hierbij zijn 4 groepen nodig: 1 rook, 1 lucht, 2 rook+behandeling met remmers. $4 \times 16=64$ muizen per experiment.**

6 maanden model

De 6 maanden experiment zal 20 muizen per groep moeten bevatten. De reden hiervoor is dat er voor longfunctie ($n=9$) en histologie ($n=6$) minimaal 15 muizen nodig zijn. Verder is er kans op uitval tussendoor gedurende 6 maanden behandelen en roken. Eerder hebben we in de VS ook een 6 maanden rook

experiment gedaan waarbij we uitgingen van 20 muizen per groep. Dat bleek voldoende te zijn maar zeker niet te veel te zijn. **In dat experiment zagen we een uitval van 25% in de aan rook blootgestelde groep dat niet behandeld werd.** We verwachten dat de uitval gerelateerd was aan de effecten van rook zoals het vormen van emfyseem. Omdat in de groep die aan lucht wordt blootgesteld minder uitval wordt verwacht, worden daarin 17 muizen ingedeeld. **Een uitval van 10% in de lucht groepen is wat we in het verleden hebben gezien in een 6 maanden experiment.** De preciese oorzaak voor de dood van deze muizen was niet duidelijk.

De groepen uit de 6 maanden rookmodel bestaan uit het volgende:

1 lucht groep met controle behandeling (oplosmiddel compound) (n=17)

1 rook groep met controle behandeling (oplosmiddel compound) (n=20)

1 rook groep dat na 10 weken behandeld wordt met remmer en gelijktijdig door gaat met roken. (n=20)

1 rook groep dat gedurende de 6 maanden behandeld zal worden met remmer. (n=20)

Voor deze 4 groepen zijn er 77 dieren nodig.

10 dagen model (combinatie model)

Bij de 10 dagen experiment zijn er naar ervaring 10 muizen per groep nodig. **Bij de korte modellen (5 en 10 dagen model) verwachten we geen uitval.** De groepen hiervoor zijn als volgt:

- geen behandeling (lucht vs rook = 2 groepen),

- GCS behandeling (rook = 1 groepen)

- maximaal 4 verschillende prolyl endopeptidase-remmers (rook = 4 groepen)

- combinatie GCS + 4 verschillende prolyl endopeptidase-remmers (rook = 4 groepen)

Bij 10 dieren per groep en 11 groepen per experiment hebben wij 110 dieren per experiment nodig.

Totaal

In totaal is het volgende totale aantal muizen nodig: $42 + 42 + 110 + 64 + 77 = 335$ muizen.

335 muizen zijn nodig indien elke dierproef 1 keer uitgevoerd zal worden. We verwachten dat ons meerdere compounds zal vragen te testen en wij grofweg elk experiment 2 keer zullen uitvoeren. $2 \times 335 = 670$ muizen zullen gedurende de komende jaren nodig zijn. Voor elke proef zal een nieuwe power analyse uitgevoerd worden.

(1) Thesis: The matrikine PGP in lung diseases: a translational study. M. Abdul Roda, 2015.

(2) Morris A, Kinnear G, Wan WY, Wyss D, Bahra P and Stevenson CS. Comparison of cigarette smoke-induced acute inflammation in multiple strains of mice and the effect of a matrix metalloproteinase inhibitor on these responses. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 327: 3: 851-862, 2008.

(3) Vlahos R, Bozinovski S. Recent advances in pre-clinical mouse models of COPD. *Clin Sci (Lond)* 2014;126:253-265.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

keuzes daarbij zijn gemaakt.

Vervanging:

Helaas is vervanging niet mogelijk. Het effect van de medicatie kan niet anders onderzocht worden dan in het intacte proefdier omdat voor de werking van van deze prolyl endopeptidase remmers een intacte immuunsysteem nodig is. Verder is de interactie tussen longen, rook en het immuunsysteem nodig. Wel wordt door █████ een compound eerst intensief in vitro getest tot we niet verder kunnen behalve door in vivo te testen.

Vermindering:

Binnen de afdeling is ruim 20 jaar ervaring met de beschreven experimenten waardoor er tijdens het experiment de dieren optimaal behandeld zullen worden en uitval zoveel mogelijk wordt voorkomen. Verder proberen we zoveel mogelijk om meerdere compounds tegelijk te testen en hierdoor niet onnodig veel controle groepen te hebben. Dit zal leiden tot een minder aantal muizen. Bij elke experiment die we opzetten zullen we een power analyse doen om niet onnodig grote groepen muizen nodig te hebben. Verder zullen we minder muizen nodig hebben in de lucht groep tijdens het 6 maanden model in vergelijking met de rook groepen.

Verfijning:

De rookblootstelling wordt zeer nauwgezet geregeld. De CO en O2 concentraties worden continue gemonitord en aangepast indien nodig (CO dose = 150-300 ppm en O2 concentratie = 20 %). De blootstelling aan de sigarettenrook (20-25 min) vindt per dag oplopend plaats (dag 1, 4 tot 6 sigaretten, dag 2, 8-10 sigaretten, dag 3, 12-14 sigaretten, vanaf dag 4, 14 sigaretten). Dit is gedaan om de muizen te laten wennen aan de rook en om stress en uitval te voorkomen. We gebruiken de laatste paar jaren een door ons gestandaardiseerde rookopstelling, waarbij de dieren en het rook evenwichtig over de ruimte verdeeld worden. De muizen worden alleen of met 2 muizen in compartimenten gezet gedurende de rooksessie waardoor niet alle muizen in een hoekje samen gaan zitten en hierdoor een verschillende blootstelling aan rook krijgen. Hierdoor kunnen wij bij elk experiment eenzelfde sigarettenrook blootstelling creëren.

Een andere voorbeeld van verfijning is dat we een 10 daagse dose finding studie hebben in een vroege stadium in onze beslisboom. Hierdoor kunnen we in de rookmodellen daaropvolgend werken met een optimale dosering van de teststof. Dit vergroot de kans op het slagen van het experiment en hierdoor is het niet nodig dat in een 6 maanden model meerder doseringen getest wordt en dus veel meer muizen nodig zijn.

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

De blootstellingen aan rook zijn zo kort mogelijk gehouden om ongerief te voorkomen (zoals gewichtsverlies, verandering in ademhalingsfrequentie, suf worden). De CO wordt nauwkeurig binnen de perken gehouden (150-300 ppm) en het O2 gehalte wordt gehandhaafd op 20%. Het lichaamsgewicht wordt meerdere malen gemeten en mag niet meer dan 15% dalen in 2 dagen in de 5 dagen en 10 dagen combinatie model. In de 6 weken en 6 maanden model mag het gewicht niet meer dan 20% dalen in 2 dagen.

Er wordt ook naar afwijkend gedrag gekeken van de muizen (alleen zitten in een hoekje) en naar pilo erectie. Indien de laatst genoemde verschijnselen voorkomen zal in overleg met dierverzorgers/dierenarts besloten worden of het muisje uit de proef gehaald moet worden.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Er kan eventuele kortademigheid optreden gedurende het model, net zoals bij COPD patienten.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Dit komt door het blootstellen aan sigarettenrook, dit veroorzaakt een luchtwegontsteking waardoor de ademprequentie kan toenemen.

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

De blootstellingen aan rook zijn zo kort mogelijk gehouden om onnodig ongerief te voorkomen. De CO wordt nauwkeurig binnen de perken gehouden (150-300 ppm) en het O2 gehalte wordt gemonitord op 20%. Het lichaamsgewicht wordt dagelijks gemeten.

J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Gewichtsverlies. Wij nemen dieren uit het experiment wanneer het gewichtsverlies groter is dan 15% binnen een periode van 2 dagen in de 5 daagse en 10 daagse modellen. In de 6 weken en 6 maanden modellen wordt een muis uit het experiment genomen indien er sprake is van meer dan 20% gewichtsverlies binnen 2 dagen. Ademhalingsfrequentie, obstructie van de luchtwegen en cyanose wordt in de gaten gehouden maar daar zijn in het verleden nooit problemen mee ontstaan. Muizen zullen op elke dag dat ze gerookt moeten worden allemaal goed geobserveerd worden op afwijkend gedrag wat op lijden kan wijzen.

Indien een muis verdacht wordt van extra lijden (bijvoorbeeld pilo erectie) zal deze uit de proef gehaald worden en opgeofferd worden.

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

Een totale uitval van ongeveer 6% is te verwachten.

In de 5 daagse model en 10 daagse dose fiding model verwachten we 0% uitval. In de 6 weekse model wordt een uitval van 4 muizen op een totaal van 64 muizen verwacht, dat is 6%. In de 6 maanden studie verwachten we 10% uitval in de luchtgroepen en 25% uitval in de rook groepen. Op een totaal van 77 muizen verwachten we een dus totale uitval van 17 muizen, dat is 22%. In de 10 dagen model verwachten we geen uitval, dus 0%.

Opgeteld vallen $0+0+4+17+0 = 21$ muizen uit op een totaal van 335 muizen. Dat is een totale uitval van 6% indien alle modellen 1 keer uitgevoerd worden.

Op basis van de afgelopen 20 jaar werken met dit rookmodel, weten we dat er incidenteel een dier kan uitvallen door niet proef gerelateerde zaken, dat is het risico van het werken met levende dieren. Een niet proef gerelateerde oorzaak kan zijn dat een muis om onduidelijke redenen ziek wordt. Proef gerelateerde uitval kan zijn dat muizen door de ontstekingen d.t.v. het roken ziek worden en een humane eindpunt bereiken. Dit gebeurt echter zelden en zal voornamelijk in de controle groepen plaatsvinden.

K. Classificatie van ongerief

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

In de korte modellen (5 en 10 dagen) verwachten we dat de muizen licht ongerief zullen hebben. Dit vanwege de korte blootstellings periode aan rook en weinig schade aan de longen. In de 6 weken en 6 maanden model verwachten we wel dat de muizen blootgesteld worden aan matig ongerief. Hierbij speelt de factor tijd een belangrijke rol. Ook de longemfyseem dat bij de muizen kan ontstaan leidt tot een classering van matig ongerief. In alle experimenten echter zie je aan een muis niet dat deze leidt aan de rookexperiment. Post mortem zijn de effecten van rook pas waar te nemen.

Tijdens eerdere muis experimenten met sigarettenrook, is een proefdierdeskundige aanwezig geweest om de ongerief te schatten. Ook hier werd matig ongerief vastgesteld.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee

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

Orgaan isolatie en post mortem onderzoek. Daarmee kunnen wij essentiële metingen doen, namelijk de ontstekingscellen in de longen (BAL), en naar ontstekings-eiwitten in het bloed kijken.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer : 2015.II.243.039
2. Titel van het project : Nieuwe medicatie voor COPD
3. Titel van de NTS : Nieuwe medicatie voor COPD

4. Type aanvraag:

- nieuwe aanvraag projectvergunning
 wijziging van vergunning met nummer :

5. Contactgegevens DEC

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

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

- ontvangen door DEC: 22-10-2015
 aanvraag compleet:
 in vergadering besproken: 18-11-2015
 anderszins behandeld: Voor behandeld: 26-10-2015 per mail: 24-11-2015
 termijnonderbreking(en) van / tot : 20-11-2015 tot 24-11-2015
 besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
 aanpassing aanvraag:
 advies aan CCD: 12-01-2016

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: 09-11-2015
- Strekking van de vragen:

Algemeen buiten de context

- De DEC constateert een dilemma: het ontwikkelen van een geneesmiddel dat één aspect van de negatieve gevolgen van roken tegen gaat, terwijl stoppen met roken hetzelfde effect heeft versus 'verslaving is een ziekte.'
- Er ontstaan mogelijk negatieve gevolgen voor het anti-rook beleid: 'Er is een geneesmiddel tegen de negatieve gevolgen van roken' (of verslaafde patiënten doorhebben dat het maar over één aspect gaat is maar de vraag).
- Hoe duur wordt het middel? Als het een biological is die €10.000 per jaar kost, dan wordt een toepassing in de derde wereld te kostbaar, en zou in Nederland weleens een pittige discussie kunnen ontstaan over vergoeding door de verzekeraar.
- Hoe kijkt u aan tegen het mogelijke imago: 'UU ontwikkelt middel waarmee rokers kunnen blijven roken'?

Algemeen binnen de context

- Er is recent een groot onderzoek gepubliceerd (zie attachment) waaruit blijkt dat er een complex aan genen een rol speelt bij COPD. Dit onderzoek richt zich op één aangrijpingspunt. Kent de onderzoeker deze publicatie en heeft de info daaruit invloed op zijn onderzoek?
- Is het gevaar niet dat er in proefdieren één aanpak wordt ontwikkeld die in de complexe werkelijkheid van de patiënt niet blijkt te werken?
- Wat is de translatiestrategie bij dit onderzoek? Wordt er met de kliniek samengewerkt, wordt er tijdig bij patiënten gekeken of de aanpak daar wel kans van slagen heeft?
- Klopt het dat dit middel op één facet van copd aangrijpt (stopt, niet geneest) namelijk emfyseem?
- Op verschillende plaatsen in uw aanvraag geeft u aan dat [REDACTED] de experimentele middelen test op affiniteit voor prolyl endopeptidase en dat u inzage krijgt in de gegevens zodat u in feite meepraat over de selectie van de te testen stoffen. De DEC vraagt zich af of deze procedure voldoende onafhankelijkheid waarborgt en heeft voorkeur voor een echte onafhankelijke beoordeling door een buitenstaander. Ook is niet duidelijk of andere criteria worden aangelegd voor de selectie zoals bijvoorbeeld toxiciteit.

Projectvoorstel

- Onder 3. 4 schrijft u dat tegelijkertijd de rol van PGP in patiënten met COPD wordt onderzocht . Wat houdt dit onderzoek precies in en wat is de rol van de resultaten in het voorliggende project?
- 3.4.1 en 3.4.3 : is het wel nodig om alle (3 of 4) rookmodellen in te zetten voor het testen van de middelen? Er is een betere motivatie nodig. Bovendien vraagt de DEC zich af of uw opzet om een soort van voorscreening te doen in het korte rook model verantwoord is. Is het in dit verband denkbaar dat sommige van de experimentele middelen die u gaat testen pas later in het ziekteproces hun werking uitoefenen? Als dat zo is dan dient u uw beslisboom drastisch wijzigen.

- 3.4.2. Hoe haalbaar is de voorkeur voor een middel dat oraal kan worden toegediend? Indien de kans daarop klein is vraagt de DEC zich af, gezien uw doelstelling een nieuw middel voor grootschalig gebruik in de opkomende economieën te ontwikkelen, of het wel gerechtvaardigd is daar proefdieren aan op te offeren.

Bijlage 1

- B. U wilt met vrouwelijke muizen werken 'omdat u ...bang bent dat....' Hier is een andere en sterkere argumentatie nodig.
- J. U spreekt hier over uitval. Gaarne nader specificeren wat u daaronder verstaat. Ziet de DEC het goed dat u voor de verwachte uitval geen extra dieren aanvraagt?

- Datum antwoord: 15-11-2015
- Strekking van de antwoorden:

Algemeen buiten de context

- Wij hebben dit dilemma regelmatig besproken met de DEC, met [REDACTED] (hoogleraar ethiek) en het is een punt van discussie op congressen zoals de European Respiratory Society en de American Thoracic Society. Hoe zeer longartsen ook tegen roken zijn, zijn bijna alle specialisten toch van mening dat niets doen absoluut geen optie is gezien de grote impact op de patiënten en de maatschappij. Als er voor gekozen wordt om geen medicijnen te ontwikkelen voor de self-inflicted rokersgroep, dan zal dat mogelijk uitbreiden naar andere self-inflicted ziektes veroorzaakt door alcohol, drugs, geen veilige sex, vet eten en niet sporten, depressies door verslavingen zoals aan de computer etcetera.
- Daar bestaat geen twijfel over denk wij. Rokers die geholpen worden aan longkanker begrijpen nu ook wel dat met de operatie niet hun longemfyseem verholpen zal worden. Als de patiënt bij de dokter komt en er wordt longemfyseem geconstateerd en de patiënt krijgt een medicijn om het verdere verloop van de longemfyseem stop te zetten, dan zal hij begrijpen dat dit middel niet werkt tegen longkanker.
- Het medicijn is geen biological. Als het op de markt komt dan zijn wij ervan overtuigd dat het kosten besparend zal zijn omdat COPD patiënten de maatschappij heel veel geld kosten. De kosten die bespaard worden zouden weer ingezet kunnen worden voor non-selfinflicted diseases. Win win situatie dus.
- Indien iemand een medicijn uitvindt dat de ontwikkeling van longemfyseem kan stopzetten dan wordt diegene waarschijnlijk genomineerd voor de Nobelprijs. Dit is goed voor het imago van de UU. Is er ook een imago problem dat de UU hartkleppen ontwikkelt voor obesitas patiënten die waarschijnlijk hun hele leven te veel vet hebben gegeten en niet sporten? Bovendien heeft de UU geen moeite met de Heineken-prijs, terwijl de schade door alcohol voor de maatschappij vele malen groter is dan die veroorzaakt wordt door tabak. De UU heeft kennelijk geen moeite met onderzoek naar self-inflicted ziekten.

Algemeen binnen de context

- Wij kennen dat onderzoek en een aantal van de genen die ontdekt zijn kunnen een link hebben met ons onderzoek omdat ze gerelateerd zijn aan ontsteking. Hieronder een citaat en de conclusie van het onderzoek dat gepubliceerd is in the Lancet. In het eerste gedeelte wordt aangegeven dat ontsteking niet los gezien kan worden van weefselschade en herstel. In het tweede gedeelte moedigen de onderzoekers andere onderzoekers aan om hypothesen te ontwikkelen voor verder in vitro en in vivo onderzoek. Dit is het onderwerp van de huidige projectaanvraag. *Inflammation is inextricably linked to tissue remodelling and repair processes, which can affect the lung independently of each other, it is also feasible that the two processes interact. Inflammation may lead to activation of tissue repair and remodelling processes that reactivate genes involved in lung development and growth. Alternatively, genetically determined variation in lung development and growth could alter lung structure to affect particle deposition and the inflammatory response to toxic inhalants, such as tobacco smoke. In summary, the systems genetics approach identified genes and molecular mechanisms that underlie the variation in lung function measures, generating hypotheses for future in-vitro and in-vivo studies. This study emphasises the importance of lung development and inflammatory pathways for lung function variation in adults. The finding that existing drugs can reverse the lung tissue gene signature associated with airflow obstruction suggests attractive candidates for interfering with the pathogenesis of COPD.*
- Dat klopt: 30% van de medicijnen die in proefdieren zijn ontwikkeld werken niet in de mens. Echter 70% werkt wel. Er is ook veel aandacht voor het optimaliseren van proefdiermodellen. Het grote voordeel van ons proefdiermodel is dat de trigger die bij de mens de problemen veroorzaakt, namelijk sigarettenrook, ook als trigger gebruikt wordt in deze projectaanvraag. Dit verhoogt het translationele karakter van het onderzoek. Verder is het bekend dat 50% van de patiënten met longziekten na diagnose doorgaan met het roken van sigaretten.
- Dit is een belangrijk punt wat niet beschreven staat in de aanvraag. Er zijn al literatuur gegevens in patiënten aanwezig die onze hypothese bevestigen. Dat is ook de rede waarom een groot farmaceutisch bedrijf geïnteresseerd is geraakt in het onderzoek. Farmaceutische bedrijven zijn alleen maar geïnteresseerd in wetenschappelijk onderzoek, als ze daarna hun product op de markt kunnen zetten. Naast het project met proefdieronderzoek loopt er parallel ook basal wetenschappelijk onderzoek in patiëntenmateriaal waarin wij metingen verichten om het proefdierwerk te ondersteunen. Echter, het uittesten van medicijnen dient altijd eerst in het proefdier gedaan te worden om goedkeuring te verkrijgen door de FDA. In 3.1 is een alinea toegevoegd die het klinische onderzoek beschrijft.
- Ja, net zoals vele andere medicijnen (success van de monoclonal antibodies), grijpt het medicijn aan op 1 aspect. Dit is echter wel een facet die een vicieuze cirkel doet doorbreken. Wij zullen dat beter uitleggen in de aanvraag. Wij richten ons inderdaad op het stopzetten van het proces maar kunnen niet uitsluiten dat er ook nog een deel herstel optreedt. Herstel zou het mooiste zijn maar men dient eerst naar de maan te vliegen voordat een vlucht naar mars ondernomen kan worden.

- Wij begrijpen dat er bij sommige mensen een wat negatief beeld is gevormd rond de farmaceutische industrie. Daarom zijn er strikte regels binnen en buiten de farmaceutische industrie en UU samengesteld. Het is niet zo dat iemand even zomaar even iets kan doen. Om een product op de markt te krijgen moet het bedrijf de regels volgen die de Food and Drug Administration heeft samengesteld. Eerst moet de new chemical entities (NDA) in een cel vrije omgeving getest worden, dan worden ze op cellen getest, dan op organen en vervolgens in proefdieren. Dit is een kostbare aangelegenheid dus in een zeer vroeg stadium worden alle NCEs getest op toxiciteit (vereiste van FDA) want als je daar op het einde achter komt dan kost dat tijd en geld. De meeste farmaceutische bedrijven hebben ook een onafhankelijke wetenschappelijke adviescommissie die bestaat uit experts vanuit de hele wereld en die niet verbonden zijn aan het bedrijf. Dit is ook weer kosten besparend voor het bedrijf omdat de experts zullen aangeven wanneer het bedrijf een weg in slaat die niet succesvol is. Bij de Universiteit zijn ook weer check points waaronder de DEC. Maar ook zijn wij zelf specialisten op het gebied die de uitkomsten van de experimenten weer presenteren en toetsen op wetenschappelijke vergaderingen en congressen. Zoals boven aangegeven, werken wij samen met een ziekenhuis die ons de klinische monsters leveren. Ook zij vormen weer een checkpoint want als zij niet in de hypothese geloven dan geven zij niet het kostbare patiëntenmateriaal af. Kortom, het bedrijf wil een product op de markt brengen en gaat daar zelf zorgvuldig, omdat er geld mee gemoeid is en ze geen tijd willen verliezen. Bovendien moeten ze de richtlijnen volgen van de FDA die veel strenger zijn dan de richtlijnen van de DEC.

Projectvoorstel

- 3.4: Wat wij als onderzoekers belangrijk vinden, maar de farmaceutische industrie ook, is de translationele waarde van de dierexperimenten. Dus waar het mogelijk is gaan wij in de spaarzame monsters van patiënten onderzoeken of bevindingen in de mens overeenkomen met die in de muis en die van de muis in de mens.
- 3.4.1 en 3.4.3 : Bedankt voor het advies. Wij zullen dit beter uitleggen. Vaak is het zo dat een farmaceutisch bedrijf meerdere NCEs heeft en die wil testen in meerdere doseringen en toedieningswegen en tijdstippen. Het screenen kan dus gedaan worden in een kort rookmodel. Daarna wordt er gewerkt aan verfijning en zal er gewerkt worden met minder stoffen, doseringen en tijdstippen van toediening in een wat langer rook model. Vervolgens werken wij toe naar nog verdere verfijning in modellen die langer duren en waarin longemfyseem gemeten kan worden, wat meer belastend is voor de dieren maar ook arbeidsintensiever en daardoor duurder. Het zou niet ethisch zijn om meerdere stoffen, met verschillende concentraties op verschillende tijdstippen en toedingsroutes te testen in een 6 maanden experiment. Door deze goede opmerking van de DEC realiseerden wij ons dat we geen model hebben beschreven dat de optimale dosering van een teststof moet uitzoeken. Daarom is een nieuw model beschreven: een 10 daags dose-finding rookmodel.

Door deze vorm van verfijning zal een optimale dosering gezocht worden van een teststof waarmee gewerkt kan worden in de 6 weken en 6 maanden studies. Hierdoor is de totale benodigde aantal muizen iets groter geworden. Dit is in alle bestanden verder doorberekend. Verder is 3.4.3 een alinea toegevoegd om de noodzaak uit te leggen om de beschreven experimenten uit de beslisboom te volgen.

- 3.4.1. en 3.4.3: De werking van deze remmers is gebaseerd op de remming van de aanmaak van PGP. We weten uit ervaring dat PGP in een 5 daagse rookmodel al verhoogd is na rookblootstelling. Het remmen van de verantwoordelijke enzyme prolyl endopeptidase leidt tot lagere PGP levels en minder ontstekingen in de longen. Dit hebben we ook gepubliceerd (Abdul Roda et al. Plos One 2014). Indien een remmer in een kort model de PGP waardes en ontstekingen al niet kan remmen, zal dat in een langer model ook zeker niet lukken. Verder is het nut van een lang model (6 maanden) om het effect van de remmer te zien op longemfyseem. Longemfyseem is het gevolg van de aanhoudende ontstekingen in de longen gedurende 6 maanden rookblootstelling in muizen. Indien de ontstekingen niet voldoende geremd worden zal dus longemfyseem ontstaan. Het zou dus niet realistisch zijn de beslisboom te wijzigen en bijvoorbeeld een remmer meteen in een 6 maanden model te testen zonder eerst het effect ervan te zien in een 6 weken model.
- 3.4.2. Wij hebben al in een pilot aangetoond dat orale toediening effectief was, maar zien ook geen probleem in het toedienen van inhalatie in opkomende economieën.

Bijlage 1

- B. Bedankt voor uw advies. We hebben het nu als volgt neergezet: Verder wordt er gekozen om met vrouwtjes muizen en mannetjes muizen te werken. Hierdoor wordt in beide geslachten het effect gemeten. In de kort durende modellen (5 en 10 dagen lang) zal er met mannetjes gewerkt worden. In de langere modellen (6 weken en 6 maanden) zal er met vrouwtjes gewerkt worden. De voornaamste reden hiervoor is dat in een 6 weekse of 6 maandse model mannetjes agressief tegen elkaar zullen zijn. Hierdoor kan extra uitval ontstaan. Uit eerder experimenten hebben we gezien dat bij langere huisvesting van mannetjes muizen er veel agressie onderling ontstaat. Deze problematiek is niet bij vrouwtjes muizen teruggezien.
- J. Op basis van de afgelopen 20 jaar werken met dit rookmodel, weten we dat er incidenteel een dier kan uitvallen door niet proef gerelateerde zaken, dat is het risico van het werken met levende dieren. Een niet proef gerelateerde oorzaak kan zijn dat een muis om onduidelijke redenen ziek wordt. Proef gerelateerde uitval kan zijn dat muizen door de ontstekingen d.t.v. het roken ziek worden en een humane eindpunt bereiken. Dit gebeurt echter zelden en zal voornamelijk in de controle groepen plaatsvinden. De extra dieren t.g.v. uitval zijn al ingecalculeerd in de groepsgroottes.
- Datum: 20-11-2015
- Strekking van de vragen:

- Vraag 2 van de voorgaande correspondentie: Naar zover de DEC bekend zijn de percentages omgedraaid. (70/30%)
- J. Uw antwoord over uitval (ingecalculeerd in de groepsgrootte) suggereert dat u een te hoge power heeft gebruikt. U dient de power toe te passen die past bij uw onderzoeksvraag. Aan de berekende groepsgrootte kunnen dan dieren toegevoegd worden in verband met geschatte uitval. Graag aanpassen.
- Datum antwoord: 24-11-2015
- Strekking van de antwoorden:
- De 30% en 70% zijn gebaseerd op het volgende artikel in Nature Reviews: Nature Reviews Drug Discovery 3, 711-716 (August 2004) | doi:10.1038/nrd1470. Deze is als bijlage toegevoegd. Hierin wordt aangehaald dat 30% van de geneesmiddelen op effectiviteit wordt afgekeurd tijdens klinisch onderzoek door onvertaalbaarheid van dier op mens (figuur 3 in het artikel). Dat wil zeggen dat 70% effectief is. Er kunnen ook andere redenen zijn voor het niet slagen van een geneesmiddel, maar wij hebben het puur over werkzaamheid (effectiviteit).
- We begrijpen dat onze antwoord met betrekking tot de uitval enige verwarring scheidt. De groepsgroottes die we in onze DEC aanvraag hebben beschreven bestaan uit de groepsgrootte die nodig is om een hypothese te onderzoeken (power afhankelijk) en uit eventuele extra dieren ivm uitval (power onafhankelijk). Bij elke proef wordt een ander aantal uitval verwacht op basis van onze ervaring met eerdere experimenten. Dit staat ook beschreven onder punt B van Bijlage 1. Bij elk diermodel wordt aangegeven hoeveel dieren per groep nodig zijn en hoeveel dieren we i.v.m. uitval eraan toe willen voegen. Er zijn bij de korte modellen (5 dagen en 10 dagen) geen extra dieren aangevraagd, omdat we geen uitval verwachten. Alleen bij de 6 weken en 6 maanden model zijn er extra dieren ivm uitval berekend. In de tekst staat dat ook duidelijk vermeld. Verder hebben we ook steeds gespecificeerd waar de groep uit bestaat. Bijvoorbeeld het 6 weken model: elk groep heeft 9 muizen voor een EMKA meting, 6 muizen voor hystologie meting en 1 muis extra ivm uitval. We hebben de relevante delen in het rood gezet.
- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag: Ja

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

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

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

C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:

- uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord.
- uit onderwijskundig oogpunt verantwoord.
- uit het oogpunt van productiedoelinden verantwoord.
- wettelijk vereist.

2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën zijn in overeenstemming met de hoofddoelstellingen.
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Het wordt ingeschat als een substantieel belang. COPD (chronic obstructive pulmonary disease) is een longziekte die gekenmerkt wordt door een chronisch en hevig ontstekingsproces in de longen. Deze aandoening heeft verschillende oorzaken, waaronder roken en luchtvervuiling, en heeft grote invloed op het dagelijks leven en de levensverwachting van patiënten. Tot op heden kan COPD slechts symptomatisch behandeld worden met luchtwegverwijders en glucocorticoïden. Het nadeel van deze therapie is dat met name de ontstekingsremmers verschillende bijwerkingen hebben, en soms niet werkzaam zijn door ongevoeligheid van de patiënt. Er is daarom grote behoefte aan nieuwe strategieën om het chronisch ontstekingsproces bij COPD tegen te gaan. Er zijn duidelijke aanwijzingen dat het eiwit proline-glycine-proline (PGP), dat een belangrijke rol speelt bij het ontstaan en in stand houden van de hevige ontstekingsreactie, een geschikt targeteiwit is. Eerder uitgevoerd dierexperimenteel onderzoek heeft uitgewezen dat prolyl endopeptidase remmers, die de vrijzetting van PGP tegengaan, het ontstekingsproces in de longen kunnen remmen. De aanvrager wil met het voorliggende project in verschillende rookmodellen in muizen de werking en de effectiviteit van verschillende prolyl endopeptidase remmers nader onderzoeken. Daarmee kan het project een waardevolle bijdrage leveren aan de ontwikkeling van een nieuwe therapie voor patiënten met COPD.
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. In dit project worden de prolyl endopeptidase remmers in verschillende en logisch op elkaar volgende rookmodellen onderzocht: gedurende 5 dagen (kort model), 10 dagen (kort model), 6 weken (sub-chronisch model) en 6 maanden (chronisch model). Na afloop van elk model is sprake van een go/no-go moment; alleen wanneer een remmer effectief blijkt te zijn wordt deze ook in het daaropvolgende model onderzocht. De DEC is ervan overtuigd dat de aanvrager over voldoende expertise en

voorzieningen beschikt om de projectdoelstelling met de gekozen strategie/aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren.

5. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
- Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
 - Niet-menselijke primaten (10e)
 - Dieren in/uit het wild (10f)
 - Gefokt voor dierproeven (11)
 - Zwerfdieren (10h)
 - Hergebruik (1e lid 2)
 - Huisvesting en verzorging
 - Locatie: instelling vergunninghouder (10g)
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Voor 58% van de dieren wordt het ongerief ingeschat als licht, omdat zij gedurende een korte periode herhaaldelijk blootgesteld worden aan rook. 42% van de dieren zal ten gevolge van een langere periode van herhaaldelijke blootstelling aan rook (6 weken of 6 maanden) matig ongerief ondervinden. Voor alle dieren geldt dat gedurende het experiment geen negatieve effecten van de rookblootstelling waar te nemen zijn. Deze worden pas zichtbaar bij histologisch onderzoek van longweefsel. Er wordt rekening gehouden met een totale uitval van 6% van de dieren. Het kan bij de langdurige modellen namelijk voorkomen dat muizen ten gevolge van de blootstelling aan rook zichtbaar ziek worden en het humane eindpunt bereiken. Het is niet mogelijk om dit door verdere verfijning van de modellen te voorkomen (zie punt 9). Een enkele keer kunnen dieren uitvallen, omdat deze door niet-proef gerelateerde zaken ziek worden.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen vervangen. De interacties tussen de longen, de rook en het immuunsysteem - en de invloed van medicatie daarop – zijn dusdanig complex, dat deze niet in hun volledigheid *in vitro* of *in silico* nagebootst kunnen worden. *In vivo* experimenten in het intacte dier zijn dus noodzakelijk. Voorafgaand aan de voorgestelde dierproeven worden *in vitro* experimenten uitgevoerd om een voorselectie te maken van veelbelovende prolyl endopeptidase remmers. In verband met de aard van de benodigde gegevens (onder andere histologische analyse van longweefsel) is het niet mogelijk om het onderzoek in mensen uit te voeren. Wel worden *in vitro* experimenten uitgevoerd met patiëntmateriaal om na te gaan of de verkregen resultaten overeenkomen met de situatie in de mens.
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. Voorafgaand aan elk experiment wordt met behulp van de meest recente en relevante data een powerberekeningen uitgevoerd, zodat het optimale aantal dieren per groep vooraf bepaald kan

worden. Om onnodig proefdiergebruik te voorkomen wordt ernaar gestreefd meerdere remmers binnen één experiment te onderzoeken, waardoor met een minimaal aantal controlegroepen kan worden volstaan. Op verzoek van de DEC heeft de aanvrager een 10 daags dose-finding experiment aan het project toegevoegd, zodat alleen de optimale doses van de te testen remmers in de langdurige modellen (6 weken en 6 maanden) gebruikt worden.

9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. De onderzoeksgroep heeft veel ervaring met de rookmodellen in muizen, en heeft deze in de loop der tijd kunnen verfijnen. De duur van de blootstelling aan rook wordt zo kort mogelijk gehouden, en de hoeveelheid rook wordt rustig opgevoerd, zodat stress en uitval voorkomen worden. Er wordt gewerkt met een gestandaardiseerde en nauwkeurig te reguleren rookopstelling, waarbij de dieren en de rook evenwichtig over de ruimte verdeeld worden. Gezondheid en welzijn van de dieren worden intensief gemonitord, zodat tijdig ingegrepen kan worden bij onverwacht ongerief. Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke muizen ingezet in de experimenten. Op verzoek van de DEC hebben proefdierdeskundigen bij eerder uitgevoerde experimenten met langdurige rookmodellen meegekeken en de mate van ongerief beoordeeld. Zij gaven aan dat de inschatting van het ongerief juist is (matig ongerief) en dat verdere verfijning ter vermindering van het ongerief niet mogelijk is zonder de bruikbaarheid van het onderzoek in gevaar te brengen. Immers, de ontwikkeling van licht longemfyseem is een belangrijk aspect van een COPD model.
10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

Op grond van de onder C, punt 3, genoemde overwegingen is de DEC unaniem van mening dat het belang van de doelstelling – onderzoeken wat de werking en de effectiviteit is van verschillende prolyl endopeptidase remmers bij de behandeling van COPD – substantieel is. De DEC heeft wel voor een dilemma gestaan: is het gerechtvaardigd een geneesmiddel te ontwikkelen – en de daartoe vereiste dierexperimenten uit te voeren – waarmee slechts één negatief effect van roken kan worden bestreden (in dit geval de ontwikkeling van COPD), terwijl het stoppen met roken alle negatieve effecten (bijvoorbeeld ook het ontstaan van longkanker) voorkomt? Dit dilemma, dat zich buiten de context van deze projectaanvraag bevindt, is bij de beoordeling uitvoerig door de commissie besproken. De DEC is tot de conclusie gekomen dat de zaak genuanceerder ligt, en dat er voldoende argumenten zijn die de voorgestelde dierexperimenten rechtvaardigen. Roken is een verslavingsziekte, waardoor patiënten niet eenvoudigweg kunnen stoppen met roken. Ook voor andere verslavingsziekten worden geneesmiddelen ontwikkeld. Daarnaast is roken slechts een van de oorzaken van COPD. Meerroken, luchtvervuiling en koken op biomassa in slecht geventileerde ruimtes kunnen ook leiden tot de ontwikkeling van COPD.

De DEC is van mening dat de juiste onderzoeksstrategie gekozen is. Het is niet mogelijk om dit onderzoek uit te voeren in mensen, en er zijn evenmin volwaardige *in silico* of *in vitro* alternatieven beschikbaar. Er is voldaan aan de vereisten van vermindering en verfijning. Dit alles brengt de DEC tot het oordeel dat het belang van de doelstelling opweegt tegen het matige ongerief dat de dieren in dit project zullen ondervinden, en dat het gebruik van de dieren ethisch aanvaardbaar is.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

Dierexperimentencommissie Utrecht



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

CURAX BV



**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
AVD243002016408

Bijlagen

2

Datum 2 februari 2016

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 1 februari 2016.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD243002016408. 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. 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: 24300
Naam instelling of organisatie: ██████████
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: ██████████
KvK-nummer: 30183378
Straat en huisnummer: ██████████
Postcode en plaats: ██████████
IBAN: NL0FTSB0844302087
Tenaamstelling van het rekeningnummer: Curax BV.

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Over uw aanvraag

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

Over uw project

Geplande startdatum: 1 november 2015
Geplande einddatum: 1 december 2019
Titel project: Nieuwe medicatie voor COPD
Titel niet-technische samenvatting: Nieuwe medicatie voor COPD
Naam DEC: De dierexperimentencommissie Utrecht
Postadres DEC: Bureau van de DEC Utrecht
E-mailadres DEC: dec-utrecht@umcutrecht.nl

Betaalgegevens

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

Checklist bijlagen

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

Ondertekening

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Plaats: Utrecht
Datum: 1 februari 2016



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

CURAX BV



**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
AVD243002016408
Bijlagen
2

Datum 2 februari 2016
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 2 februari 2016
Vervaldatum: 3 maart 2016
Factuurnummer: 16700408

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD243002016408	€ 935,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL41RBOS0569996317 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

CURAX BV



**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
AVD243002016408
Bijlagen

1

Datum 14 maart 2016
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 

Op 1 februari 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Nieuwe medicatie voor COPD" met aanvraagnummer AVD243002016408. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning. U kunt met uw project "Nieuwe medicatie voor COPD" starten. De vergunning wordt afgegeven van 15 maart 2016 tot en met 1 november 2019. Deze termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat de aanvraagdatum in het verleden ligt. Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie De dierexperimentencommissie Utrecht gevoegd. Dit advies is opgesteld op 12 januari 2016. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de

Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie, nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Aanvullend daarop stelt de CCD aanvullende voorwaarden. Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

Bezwaar

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

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

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


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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



Ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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

Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: CURAX BV

Adres: [REDACTED]

Postcode en plaats: [REDACTED]

Deelnemersnummer: 24300

deze projectvergunning voor het tijdvak 15 maart 2016 tot en met 1 november 2019, voor het project "Nieuwe medicatie voor COPD" met aanvraagnummer AVD243002016408, volgens advies van Dierexperimentencommissie De dierexperimentencommissie Utrecht. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 1 februari 2016
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 1 februari 2016;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 1 februari 2016;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 12 januari 2016, ontvangen op 1 februari 2016.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
1: Rookmodel	Muizen (Mus musculus) / diverse stammen	670	Matig	nvt

Voorwaarden

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

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.

Voorschriften

In uw projectvoorstel beoogt u het gebruik van ongelijke aantallen mannelijke en vrouwelijke dieren. Met het oog op het terugdringen van onnodig in voorraad gedode dieren stelt de CCD als voorwaarde dat u in uw kortdurende experimenten ook vrouwelijke dieren meeneemt, om zo veel als mogelijk gelijke hoeveelheden mannelijke en vrouwelijke dieren in uw project te gebruiken.

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

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

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

Uit artikel 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.