

| Inventaris Wob-verzoek W17-17 | | wordt verstrekt | | | | weigeringsgronden | | | |
|-------------------------------|------------------------------------|-----------------|------|--------|-------|-------------------|--------|--------|------|
| nr. | Documenten 20171287 | reeds openbaar | niet | geheel | deels | 10.1.c | 10.2.e | 10.2.g | 11.1 |
| 1 | Aanvraagformulier | | | | x | | x | | |
| 2 | Projectvoorstel | | | x | | | | | |
| 3 | Niet-technische samenvatting oud | | | x | | | | | |
| 4 | Bijlage dierproeven oud | | | x | | | | | |
| 5 | DEC-advies | | | | x | | x | | |
| 6 | Ontvangstbevestiging | | | | x | | x | | |
| 7 | Verzoek aanvulling aanvraag | | | | x | | x | | |
| 8 | Niet-technische samenvatting nieuw | x | | | | | | | |
| 9 | Bijlage dierproeven nieuw | | | x | | | | | |
| 10 | Adviesnota CCD | | x | | | | | | x |
| 11 | Beschikking en vergunning | | | | x | | x | | |

1287



Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

11 JULI 2017

- 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 11800 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen | |
| 1.2 | Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt. | Naam instelling of organisatie | Academisch Medisch Centrum, Amsterdam |
| | | Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde | [REDACTED] |
| | | KvK-nummer | 343362777 |
| | | Straat en huisnummer | Meibergdreef [REDACTED] |
| | | Postbus | |
| | | Postcode en plaats | 1105AZ Amsterdam |
| | | IBAN | NL68RABO0136166741 |
| | | Tenaamstelling van het rekeningnummer | Zie bijgesloten procedure voor betaling AMC |
| 1.3 | Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i> | | |
| 1.4 | Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker. | (Titel) Naam en voorletters | [REDACTED] [REDACTED] |
| | | Functie | [REDACTED] |
| | | Afdeling | [REDACTED] |
| | | Telefoonnummer | [REDACTED] |
| | | E-mailadres | [REDACTED] |
| 1.5 | <i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker. | (Titel) Naam en voorletters | <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
| | | Functie | |
| | | Afdeling | |
| | | Telefoonnummer | |
| | | E-mailadres | |

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- | | |
|------------|----------------|
| Startdatum | 1 - 1 - 2018 |
| Einddatum | 31 - 12 - 2022 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Generation, cryopreservation, re-derivation and sanitation of genetically modified mouse strains
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Het genereren, saneren en invriezen van genetisch gemodificeerde muizenlijnen ten behoeve van biomedisch onderzoek
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|-----------------|
| Naam DEC | DEC AMC |
| Postadres | Meibergdreef 31 |
| E-mailadres | |

4 Betaalgegevens

4.1 Om welk type aanvraag gaat het?

Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1035,00 Lege

Wijziging € Lege

4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.

Via een eenmalige incasso

Na ontvangst van de factuur

Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.

5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

Projectvoorstel

Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen, indien van toepassing

Melding Machtiging

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

[REDACTED]

Functie

[REDACTED]

Plaats

Amsterdam

Datum

10 - 07 - 2017

Handtekening

[REDACTED]



Form Project proposal

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

1 General information

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

2 Categories

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

3 General description of the project

3.1 Background

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

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

The mouse has proved to be an important animal model for studying the role of genetic and environmental factors in human disease and development in an intact organism. In the last decades, disease modeling in genetically modified (GM) mice has become increasingly important and has resulted

in major steps forward in our understanding of the molecular basis of a broad array of human diseases and development. Many researchers in our institute depend on the availability of novel genetically engineered mouse models (GEMMs) to address the important questions in their field. Therefore, in 1996, our Transgenic Facility was established that nowadays has matured into a facility that has the skills and know-how to efficiently generate custom-made GM mice using the latest technologies. The AMC Transgenic Facility serves only internal clients.

The AMC Transgenic Facility provides three key services:

- Generation of GM mouse strains.
- Cryopreservation of GM mouse strains via freezing of sperm or embryos.
- Sanitation of GM mouse strains (starting from either life stock or frozen embryos or sperm) that are required in our institute but were already established elsewhere.

The AMC Transgenic Facility has over twenty years of experience in these three main services and has experienced personnel that is able to perform all procedures in the most efficient manner using the lowest number of animals. It applies state-of-the-art techniques that allow for the generation of genetically modified mouse strains that are optimally suited to address the research questions of the client. Also, the facility has a focus on process optimization and new technologies, particularly those that can lead to a reduction in the number of experimental animals or a reduction in the level of discomfort to the animals. These are tested and when successful implemented in the production process.

Historical perspective

During 2015 and 2016 the animal research institute that houses the AMC Transgenic Facility was temporarily closed for reconstruction and modernization. Currently the facility is fully operational again.

From 2012 – 2014:

The AMC Transgenic Facility generated on average 17 new GM strains each year, obtained by on average 42 embryo manipulation sessions per year.

There were 67 mouse strains frozen as sperm and 19 mouse strains were frozen as pre-implantation embryo. Cryo-preservation omits breeding of a mouse strain once a project is finished and prevents loss of a mouse strain due to breeding failure or genetic drift. In 2014 cryo-preservation of sperm became the standard method and freezing of embryos will only be performed for mouse lines carrying mutations on multiple alleles. After generation of a GM mouse strain we strongly encourage the investigator to cryopreserve the strain.

Fifty GM mouse strains that were required in our institute but were already established elsewhere were imported in the AMC via sanitation using embryo-transfer. Sanitation is the elimination of pathogen contamination resulting in a clean health status (e.g. specific pathogen free (SPF) according to FELASA). Experimental data obtained from healthy mice is less susceptible to variation between individuals leading to smaller experimental groups and thus to *Reduction*.

3.2 Purpose

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

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

The objective of this proposal is first to ensure accessibility to custom-designed GM mice for researchers at the AMC. Second, the AMC Transgenic Facility strongly encourages investigators to cryopreserve all newly generated GM strains at an early generation to secure the mouse strain, ensure easy distribution, prevent unnecessary breeding of mice and re-derive the mouse strain upon request. Third, GM mouse strains that are required in our institute but were already established elsewhere will not be generated

again but are imported into the facility via embryo transfer (sanitation). Fourth, the facility aims to stay up-to-date with advances that either improve the production process of GM mice or provide improvements to the 3R's in animal testing. Our track record, as is illustrated in section 3.1, shows that we have all the expertise needed to meet the goals that have been set in this project proposal.

3.3 Relevance

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

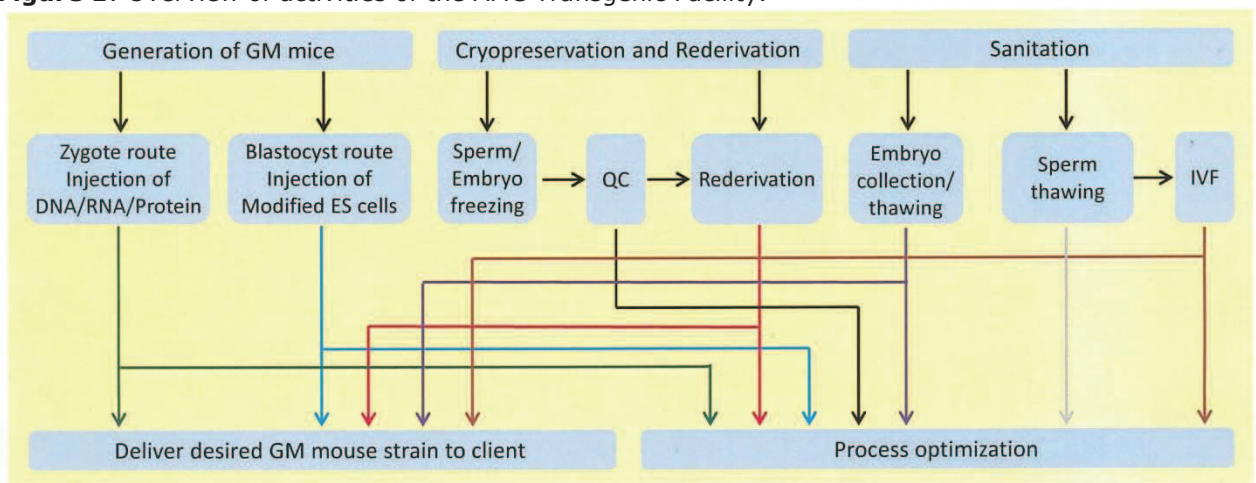
GM mice are essential to biomedical research. Specific alteration of the genome enables us to study gene function, a specific protein or cell type in a mouse in both normal and diseased state and is crucial to advancing knowledge in both basic and translational science. Mouse models of human disease can provide pivotal information on disease progression and treatment options that can ultimately benefit patients. Before a new GM mouse strain is generated approval of the AMC ethical review committee (DEC) is required. This warrants the scientific and/or social relevance of the new strain.

3.4 Research strategy

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

The strategy of the AMC Transgenic Facility is outlined in Figure 1. The facility aims to generate GM mice and provide the cryopreservation, re-derivation and sanitation services to researchers at the AMC. Approximately 5-10% of the total activities are focused on the implementation of improved technologies.

Figure 1: Overview of activities of the AMC Transgenic Facility.



QC: Quality Control; IVF: In Vitro Fertilization.

Generation of GM mice

The prime activity is the generation of GM mice. Two basic routes are currently applied for the generation of GM mice:

The zygote route - This route is based on genetic engineering in fertilized oocytes (zygotes). DNA, RNA or protein is injected into zygotes to modify the genome. After treatment embryos are surgically implanted in the oviduct of a foster mother. The foster mother brings the embryos to term and then suckles and weans the pups. At three weeks of age this 1st generation of mice (F0, founders) is delivered to the customer.

The blastocyst route - This route is based on genetic engineering in cultured Embryonic Stem Cells (ESCs). The genetically modified ESCs are injected into blastocysts, i.e. 3.5 day embryos. The injected blastocysts are implanted in the uterus of a foster mouse. The foster mother brings the embryos to term and then suckles and weans the chimeric pups. At three weeks of age this 1st generation of mice (chimeras) is delivered to the customer.

Cryopreservation program

The cryopreservation program consists of freezing and long-term storage of sperm and embryos and the subsequent re-derivation of mouse strains upon request of the researcher. The cryopreservation program has two branches:

Sperm freezing, quality control (QC) and re-derivation – Sperm of two male mice of the same genotype is collected, frozen in straws and stored in liquid nitrogen. One straw is used to verify the quality of the batch by performing *In Vitro Fertilization (IVF)*. The resulting embryos can be transferred to the oviduct of a foster mother to confirm pregnancy and live birth or to re-derive the strain for delivery to a client.

IVF – Oocytes are harvested from female donor mice, counted, and incubated overnight with thawed sperm.

Embryo freezing, quality control and re-derivation – Early pre-implantation embryos are harvested from female donor mice, frozen in straws and stored in liquid nitrogen. One straw is used to test the batch by verifying the viability of the embryos upon thawing. Thawed embryos can be cultured *in vitro* and implanted in a foster mother to re-derive the mouse strain.

Sanitation program

The sanitation program consists of obtaining pre-implantation embryos that are washed thoroughly to eliminate pathogens and the subsequent implantation into foster mice. The sanitation program has two branches:

Sanitation starting from embryos – Embryos can be obtained by thawing frozen stock or freshly isolated from female donor mice.

Sanitation starting from frozen sperm – Sperm is thawed and IVF is performed to obtain embryos.

Process optimization

The generation of GM mice is a highly complex and specialized activity. In the transgenic facility this process is closely monitored by calculating the percentages after each experiment in order to identify dips in performance (e.g. plug yield, embryo yield, embryo survival, foster pregnancy, litter size, founders/chimeras). Performance issues are addressed by reviewing procedures, chemicals and equipment to restore and/or optimize the production process. In addition, new technologies are implemented with several goals in mind; to improve the production process, to reduce the number of mice required or to reduce the level of discomfort per mouse. Examples are the implementation of the CRISPR/Cas9 technology (fewer mice required to obtain the desired GM strain due to its efficiency) and the Non-Surgical Embryo Transfer (NSET).

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

AMC Transgenic Facility distinguishes 5 types of experimental mice:

- 1) Female donor mouse (for isolation of embryos or oocytes)
- 2) Fertile stud male
- 3) Infertile stud male
- 4) Foster mother
- 5) GM mouse

Table 1 provides an overview of the types of experimental mice that are required for each part of the strategy.

Table 1. Types of experimental mice required

| | Generation of GM mice | | Process optimization | Cryopreservation and re-derivation | | | | Sanitation | |
|--|-----------------------|------------------|----------------------|------------------------------------|---------------|-------------|---------------|----------------|------------------------------------|
| | Zygote route | Blastocyst route | | Sperm cryo | IVF | Embryo cryo | Re-derivation | From sperm IVF | From (frozen) Embryos [#] |
| Embryo donors | Yes | Yes | Yes | - | Yes (oocytes) | Yes | - | Yes (oocytes) | Yes |
| Fertile male studs | Yes | Yes | Yes | Yes | - | Yes | - | - | Yes |
| Infertile male studs | Yes | Yes | Yes | - | Yes | - | Yes | Yes | Yes |
| Foster mothers | Yes | Yes | Yes | - | Yes | - | Yes | Yes | Yes |
| GM mice 1st generation | Yes* | Yes* | Yes | - | Yes* | - | Yes* | Yes* | Yes* |

* GM mice of the 1st generation are transferred to the project license of the client at weaning

If sanitation is performed from frozen embryos fertile male studs and embryo donors are not required

The female donor mice, the fertile stud males, the infertile stud males and the foster mothers are at the core of all parts of the project, i.e. generation of GM mice, cryopreservation, IVF and re-derivation (sanitation). The newly generated GM mice are transferred to the project license of the client at weaning. Before weaning, at 5-7 days after birth, a toe clipping is performed to obtain a tissue sample for genotyping purposes.

The experimental procedures and related levels of discomfort for these mice are listed in Table 2. All procedures on these mice are standardized and approved standard operating procedures (SOPs) apply.

Table 2. Types of procedures and level of discomfort

| | Gender | Goal | Procedures | Discomfort |
|-----------------------------|--------|---------------------------------|--|------------------------------------|
| Donor mouse | F | Embryo isolation | Superovulate (2 hormone injections, SOP) / Mate with fertile stud / Plug check / Sacrifice mouse / Harvest embryos, i.e. zygotes, morulae or blastocysts | Mild |
| | | Oocyte isolation | Superovulate (2 hormone injections, SOP) / Sacrifice mouse / Harvest oocytes | Mild |
| Fertile male stud | M | Fertilization | Mate with female donor mouse (max. 3x per week, max 5 months active) | None |
| | | Sperm cryopreservation | Sacrifice mouse / Harvest sperm | Mild |
| Infertile male stud | M | Mock fertilization | Vasectomize under anesthesia and pain relief (SOP) / Mate with foster mother (6 months active) | Moderate |
| Foster mother | F | Morulae/blastocyst implantation | Mate with infertile male stud / Plug check next day / Surgical embryo implantation under anesthesia and pain relief (SOP) or non surgical with NSET / Birth of GM pups / Wean litter / Sacrifice mouse | Mild (NSET) to Moderate (surgical) |
| | | 2-cell embryo implantation | Mate with infertile male stud / Plug check next day / Surgical embryo implantation under anesthesia and pain relief (SOP) / Birth of GM pups / Wean litter / Sacrifice mouse | Moderate |
| GM mice – genotyping | M & F | DNA extraction and analysis | Distal phalanx clipping of mouse at 5-7 days after birth (SOP) / In exceptional cases, an additional clipping of the ears is needed | Mild |

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

The coherence of the activities of the AMC Transgenic Facility is graphically shown in Figure 1. The facility has three main deliverables:

- Generation of the requested GM mouse strain for the client
- Cryopreservation and re-derivation of GM mouse strains
- Sanitation of GM mouse strains

For all deliverables prior conditions apply, which are specified below. The deliverables are generated under a full-service model, allowing for maximum control over the production process.

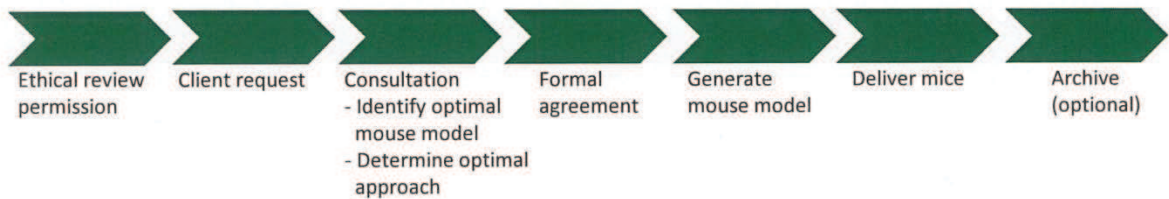
Conditions for services of the AMC Transgenic Facility

The AMC Transgenic Facility generates mice exclusively for AMC researchers, but not before a literature and database search (e.g. www.findmice.org) is performed to ensure the requested GM mouse is not already available. We will not start generating mice without prior ethical review permission for the requested GM strain. The client is responsible for obtaining ethical permission to perform animal experiments on the new GM strain. All generated GM mice strains are bred, genotyped and phenotyped under separate project licenses that describe the study and characterization of the new mouse strain.

The service model of the AMC Transgenic Facility

The AMC Transgenic Facility operates under a full-service model. After the client has obtained ethical permission to perform animal experiments on the new GM strain the independent steps as shown in Figure 2 are followed. In some cases, the procedures will be unsuccessful due to the biological nature of the experiments, at which point parts of procedures are repeated or an alternative strategy is devised. Once the GM mice are generated they are delivered to the client. The clients are offered to cryopreserve the early generations of the new mouse strain from F1 onwards to minimize breeding of GM mice. In principle all new GM mouse strains for AMC clients are cryopreserved.

Figure 2: Full-service model.



3.4.4 List the different types of animal procedures. Use a different appendix 'description animal procedures' for each type of animal procedure.

| Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|---|
| 1 | Generation, cryopreservation, re-derivation and sanitation of genetically modified mouse strains. |
| 2 | |
| 3 | |
| 4 | |
| 5 | |
| 6 | |
| 7 | |
| 8 | |
| 9 | |
| 10 | |



Format

Niet-technische samenvatting

- Dit format gebruikt u om uw niet-technische samenvatting te schrijven
- Meer informatie over de niet-technische samenvatting vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.

Of neem telefonisch contact op: (0900 380038)

1 Algemene gegevens

- 1.1 Titel van het project | Het maken en invriezen van genetisch gemodificeerde muizenlijnen (diermodellen) ten behoeve van biomedisch onderzoek |
- 1.2 Looptijd van het project | 5 jaar |
- 1.3 Trefwoorden (maximaal 5) | Muis, genetische modificatie, biomedisch onderzoek |

2 Categorie van het project

- 2.1 In welke categorie valt het project.
- U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.*
- Fundamenteel onderzoek
- Translationeel of toegepast onderzoek
- Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
- Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid
- 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 Projectbeschrijving

- 3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)
- Voor (biomedisch) onderzoek naar bijvoorbeeld de ontwikkeling van de mens en ziektebeelden bij de mens zijn diermodellen waarbij de functie van een of meerdere genen is veranderd onmisbaar. Deze genetisch gemodificeerde modellen kunnen zeer efficiënt worden gemaakt in de muis. Muismodellen van menselijke ziektebeelden kunnen essentiële informatie leveren over het ziekteverloop en behandelingsmethoden die uiteindelijk de patiënt ten goede komen. Dit project heeft als doel om voor onderzoekers zulke muismodellen te maken. Daarnaast wordt gestimuleerd om muismodellen als sperma in te vriezen, zodat het model voor de toekomst beschikbaar blijft en onnodig fokken en dus fokoverschotten worden voorkomen.
- 3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?
- Van dit project worden diermodellen verwacht die cruciaal zijn voor de voortgang in zowel fundamenteel als toegepast onderzoek. De grote kracht van deze modellen is dat er onderzoek kan worden gedaan in het intacte dier waardoor unieke informatie beschikbaar kan komen die niet kan worden verkregen met proefdiervrije alternatieven.
- 3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?
- In het project zal de huismuis *Mus Musculus* worden gebruikt. Naar schatting zullen 16250 muizen worden gebruikt.

Deze kunnen worden onderverdeeld in embryo/eicel-donoren (11800), fertiele dekmannen (spermadonoren) (500), gesteriliseerde dekmannen (450) en draagmoeders die wel (2900) of geen (600) chirurgische ingreep ondergaan..

- 3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?
- Het ene deel van de vrouwelijke muizen krijgt een hormoonbehandeling bestaande uit twee maal een injectie met een tussenpoos van 46-48 uur. Vervolgens wordt de muis bevrucht. De volgende ochtend of tot 2 dagen daarna wordt de muis gedood en worden de embryo's verzameld. Het andere deel van de vrouwelijke muizen wordt als draagmoeder voor embryo's gebruikt. Operatief worden via de flank van de muis embryo's in de eileider en/of in de baarmoeder geplaatst. Een deel van de mannelijke muizen wordt gesteriliseerd. De draagmoeders worden schijnzwanger gemaakt doordat ze door de gesteriliseerde mannen worden gedekt. Hierdoor worden ze ontvankelijk voor de embryo's. Van elk nieuw gemaakt diermodel wordt van enkele mannen het sperma ingevroren. Hiervoor wordt de muis gedood en wordt het sperma verzameld.
- 3.5 Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?
- De hormoonbehandeling is licht ongerief (72,6 % van de dieren). Voor de dieren die een operatie ondergaan (gesteriliseerde mannen en draagmoeders) is het ongerief matig (20,6 % van de dieren). Bij draagmoeders die niet-chirurgisch worden behandeld is er licht ongerief (3,7 % van de dieren). De classificatie voor de spermadonoren is licht (3,1 % van de dieren).
- 3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?
- De gesteriliseerde mannen worden vaker gebruikt en gedood als ze oud zijn geworden en daar leed van kunnen gaan ondervinden. De draagmoeders worden na grootbrengen van de jongen gedood en niet hergebruikt om zo het ongerief voor deze dieren te beperken. De jongen worden als ze volwassen zijn in fok gezet om muizen te verkrijgen voor het onderzoek.

4 Drie V's

- 4.1 **Vervanging**
Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.
- Het project is erop gericht diermodellen te maken voor de bestudering van ziekten die voorkomen bij de mens. Het effect van behandelingsmethoden kan worden gemeten alsook de werkingsmechanismen van genen, eiwitten en cellen. De beschikbaarheid van een intact genetisch gemodificeerd dier maakt in deze gevallen gericht onderzoek mogelijk. Voordat het diermodel wordt gemaakt, is er voor het onderzoek dat met de muizen gaat worden gedaan een vergunning afgegeven door de CCD. Er is dus een afweging gemaakt over het gebruik van vervangende alternatieven.
- 4.2 **Vermindering**
Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.
- Alle procedures worden uitgevoerd door ervaren personeel waardoor efficiënt en met optimaal resultaat en met zo min mogelijk dieren kan worden gewerkt. Bij elk experiment wordt van elk onderdeel de efficiëntie en het slagingspercentage berekend zodat procedures waar mogelijk direct kunnen worden verbeterd. Daarnaast is er een open

oog voor nieuwe technologieën, die leiden tot betere methoden en vermindering in het aantal benodigde dieren of het leed. Deze technologieën worden getest en, indien succesvol, ingepast in het productieproces. Bij elke nieuwe aanvraag wordt bekeken of het diermodel niet al bestaat middels het doorzoeken van literatuur en online databanken. Een reeds bestaande lijn zal niet opnieuw worden gemaakt.

4.3 **Verfijning**

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

De muis heeft zich bewezen als soort die bij uitstek model kan staan voor bestudering van genetische factoren, eiwitten en celtypen die een rol spelen bij ziekte en ontwikkeling van de mens. Fundamenteel wetenschappelijke resultaten afkomstig uit de muis zijn in de meeste gevallen goed te vertalen naar de mens. Bovendien zijn alleen van de muis embryonale stamcellen te kweken die, afhankelijk van de vereiste methode, cruciaal zijn voor het aanbrengen van de genetische modificatie.

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

Operaties worden uitgevoerd onder volledige anesthesie en pijnstilling. Momenteel zijn wij bezig met het inpassen van een methode om embryo's in de baarmoeder te kunnen plaatsen zonder operatie. Hiermee wordt de welzijnsaantasting teruggebracht van matig naar licht.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen



1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 11800
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. Academisch Medisch Centrum (AMC), Amsterdam
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|---|
| 3.4.4.1 | Generation, cryopreservation, re-derivation and sanitation of genetically modified mouse strains. |
- Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

Two basic routes are used for the generation of GM mice:

The zygote route - This route is based on genetic engineering in fertilized oocytes (zygotes) micro-injected with DNA, RNA or protein. Zygotes are harvested from a superovulated female donor mouse that has mated with a fertile stud male. Following injection the zygotes are surgically implanted (under full anesthesia) in the oviduct of a pseudopregnant foster mother that was time-mated with a sterile stud male. The foster mother brings the embryos to term, and suckles and weans the pups.

The blastocyst route - This route is based on genetically engineered embryonic stem cells that are injected into blastocysts (3.5 day embryos). Blastocysts are harvested from a superovulated female donor mouse that has mated with a fertile stud male. The injected blastocysts are implanted (surgically under full anesthesia or non-surgically) in the uterus of a pseudopregnant foster mother that was time-mated with a sterile stud male. The foster mother brings the embryos to term, and suckles and weans the pups.

The cryopreservation program consists of two routes:

Sperm freezing, quality control and re-derivation - Male mice are sacrificed and sperm is collected, frozen in straws and stored in liquid nitrogen. One straw is used to verify the quality of the batch by performing *In Vitro Fertilization* (IVF, see below). The number of 2-cell stage embryos is scored and projected against the total of starting oocytes. This score should be >40%. The 2-cell embryos can then be implanted in a foster mother to rederive the strain for delivery to a client or to confirm the birth of pups.

IVF - Female donor mice are superovulated and oocytes are harvested. The oocytes are counted and incubated overnight with the thawed sperm.

Embryo freezing, quality control and re-derivation - Female donor mice are superovulated and mated with male stud mice. Early pre-implantation embryos are harvested, frozen in straws and stored in liquid nitrogen. The aim is to freeze 150 - 200 embryos per mouse strain. One straw is used for quality control by verifying the viability of the embryos upon thawing. Thawed and viable embryos can be implanted in a foster mother to re-derive the mouse strain or to confirm the birth of pups.

The Sanitation program:

The sanitation program consists of obtaining pre-implantation embryos that are washed thoroughly to eliminate pathogens and the subsequent implantation into foster mice. The sanitation program has two branches:

Sanitation starting from embryos – Embryos can be obtained by thawing frozen stock or freshly harvested from female donor mice. In the latter case the female donor mice are superovulated and mated with male stud mice.

Sanitation starting from frozen sperm – Sperm is thawed and IVF is performed as described above. Resulting 2-cell embryos are then transferred to the oviduct of foster mice.

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

Four different mice are required to generate new GM strains, cryopreserve and re-derive strains or sanitize strains: 1) donor mice, 2) fertile stud males, 3) infertile stud males and 4) foster mothers. And three procedures involve treatment of the mice: 1) superovulation, 2) vasectomy and 3) embryo implantation. How the proposed animal procedures relate to each different type of mouse and the level of discomfort is depicted in Table 2 of the Project Proposal. In addition:

Superovulation – Pre-puberal female mice receive 2 hormone treatments via injection 46- 48h apart. After the second treatment, the female is mated with a stud male. Next day a plug check is performed. All female mice are sacrificed 0.5-3.5 days post mating and embryos are collected. In case of oocyte isolation, the female donor mice are superovulated with the same protocol, but the timed mating is omitted. Mice are sacrificed 14-16 hours after the second hormone treatment and oocytes are collected.

Vasectomy – Vasectomy is performed on 6-8 week old male mice following our SOP “vasectomy” and takes on average 15 minutes per mouse. Mice are anesthetized and pain relief is administered (detailed and approved SOPs apply). In brief, an incision is made through the skin and the abdomen wall. The vasa deferentia are located and a small piece is removed using cautery. The 5-7 mm incision in the muscle layer is closed with sutures. Next, sutures are used to close the skin. Following surgery there is a recovery period of two weeks.

Embryo implantation – Embryos are implanted in 7 – 16 week old foster mothers (weighing 18-30 g). For surgery mice are anesthetized and pain relief is administered (detailed and approved SOPs apply). Two types of implantation are performed depending on the developmental stage of the embryos. 1) implantation in the oviduct. 2) implantation in the uterus.

- 1) Implantation in the oviduct is performed following our SOP “embryo implantation in the oviduct” and takes on average 15 minutes per mouse. In brief, a 5 mm incision is made through the body wall to expose the oviduct. The infundibulum is located and using a fine needle pipet the embryos are inserted. The muscle layer is closed with sutures, followed by the sutures to close the skin.
- 2) Embryos are implanted non-surgically in the uterus of a recipient foster mouse via a tapered catheter in the vagina using our SOP “NSET”. The procedure takes 1-2 minutes and is performed without anesthesia or pain relief. Alternatively surgical implantation is performed following our SOP “embryo implantation in the uterus”. Surgery is the same as described for oviduct except for the implantation step. After making the incision the beginning of the uterus is located, a puncture is made using a fine injection needle and through the puncture the embryos are inserted using a fine needle pipet.

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

Statistical methods are less applicable to these activities. Production numbers seem more applicable. We constantly monitor our achieved efficiencies and success rates, and optimize procedures where needed, thereby minimizing the number of animals.

B. The animals

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

Species – House mouse (*Mus Musculus*).

Origin – In house breeding or commercial breeder. In house breeding will in the future be performed for infertile male studs and foster mothers at SOPF level. This enables us to generate GM mouse strains with a SOPF health status. Maintenance of a SOPF status in the animal unit is not agreeable with regular import of animals from external sources.

Estimated numbers – The lowest number of mice required to achieve the goals of the different components of the project is known from our historical production numbers. In Table 2.1, the number of each type of experimental mouse involved in this project is specified. We foresee a demand of 50 GM strains per year, which we can generate in 120 injection sessions (Table 2.1). In general, the majority of the injection sessions will result in the birth of a GM mouse however for a proper analysis of the genetic modification several independent individuals carrying the mutation are required. Compared to our production numbers over the years 2012-2014 (see subsection 3.1 of the project proposal) there is a large increase in the demand for GM strains. This increase is based on: 1) the current work load. 2) a granted project of one of the research groups in the AMC that involves an additional 50 manipulation sessions per year for several years. 3) the rise of the CRISPR/Cas9 technology that allows one-step generation of GM strains. With the anticipated increase in the generation of GM mouse strains we also foresee an increase in our cryo-preservation activities. Upon our advice it is almost standard procedure for investigators to freeze sperm of all new GM strains. On top of that we expect to freeze embryos of 5 strains with complex genotypes. Freezing of sperm will in all cases be followed by quality control via IVF (50 sessions + 10 additional sessions in case of low fertility rate). In 10-20% of the cases the client chooses to have the embryos implanted into foster mothers and brought to term. Based on previous years we expect that 15 strains need to be re-derived from our cryo-archive per year. When a client requires a GM strain that already exists elsewhere the strain will not be generated again but will be imported into our institute via a sanitation procedure. We foresee the import of 30 GM strains per year (sperm 20 strains, embryos 10 strains).

We estimate that 16250 mice will be used: embryo/egg cell-donors (11800), fertile males (sperm-donors) (500), sterilized males (450) and foster mothers with (2900) or without (600) surgical procedures.

Table 2.1. Types and numbers of experimental mice required

| | Generation of GM mice | | Process optimization * | Cryopreservation and re-derivation | | | | Sanitation | |
|----------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|------------------------|------------------------------------|---|------------------------------------|--|---|------------------------------------|
| | Zygote route | Blastocyst route | | Sperm cryo | IVF (QC) | Embryo cryo | Re-derivation ^Ω | From sperm IVF | From (frozen) embryos ^Σ |
| Sessions/year | 90 | 30 | | | | | | | |
| Strains/year | | | | 50 | 60 | 5 | 15 | 20 | 10 |
| Embryo donors | $90 \times 15^{\$} =$ 1350 | $30 \times 15^{\$} =$ 450 | n.a. | - | $60 \times 2^{\$} =$ 120 (oocytes) | $5 \times 40^{\$} =$ 200 | $10 \times 6^{\$} =$ 60 (oocytes) | $20 \times 6^{\$} =$ 120 (oocytes) | $10 \times 6^{\$} =$ 60 |
| Fertile male studs | - | - | - | $50 \times 2^{\$} =$ 100 | - | - | - | - | - |
| Infertile male studs | $90^{\#\} \Rightarrow$ | \Rightarrow | \Rightarrow | - | \Rightarrow | - | \Rightarrow | \Rightarrow | \Rightarrow |
| Foster mothers | $90 \times 4^{\$} =$ 360 | $30 \times 4^{\$} =$ 120 | n.a. | - | $10 \times 4^{\$} =$ 40 | - | $15 \times 4^{\$} =$ 60 | $20 \times 4^{\$} =$ 80 | $10 \times 4^{\$} =$ 40 |
| Total/1 year | 1800 | 570 | | 100 | 160 | 200 | 120 | 200 | 100 |
| Total/5 year | 9000 | 2850 | | 500 | 800 | 1000 | 600 | 1000 | 500 |

* Optimization attempts (such as subtle changes in media, concentrations and incubation times) are performed during regular sessions of Generation, Cryopreservation and Sanitation and do not require

additional animals. (Approximately 5-10% of the cases)..

\$ Numbers of mice required are based on the average of our 2012-2014 production numbers.

The same infertile male studs are used in different branches of the project (90/year total).

Σ If sanitation is performed from frozen embryos, embryo donors are not required.

Ω It is anticipated that re-derivation will be performed 10 times from frozen sperm and 5 times from frozen embryos.

n.a. not applicable, these mice are accounted for in the other columns.

QC, Quality Control

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

The 3R's in animal testing are an important theme in the AMC Transgenic Facility. They are implemented as follows:

Reduction – 1) Upon request for the generation of a new mouse strain a search is performed in online databases to check whether that strain already exists. An already existing strain will not be generated again but will be imported into the facility. **2)** New GM strains will be created directly on the desired strain background. The latest technological advances, such as Crispr/Cas9 gene editing, make this feasible. This prevents backcrossing to another strain background, typically for 10 generations, leading to a considerable reduction in mice. **3)** AMC Transgenic Facility aims to optimize and standardize procedures to be able to more efficiently generate GM mice, thereby reducing repeat injections due to lack of success. An example of an optimization is using the best suited mouse strain for embryo donation. The yield of high-quality embryos varies between mouse strains and identifying the optimal strain can reduce the number of embryo donor mice required. An example of standardization is the age and weight of the donor and stud mice. To maximize fertility we exclusively select female donor mice of 3-8 weeks old and male studs of 2 months, which are repeatedly used to a maximum of 5 months. **4)** After generation of a GM mouse strain we strongly encourage the investigator to cryopreserve the strain at an early generation. Cryopreservation ensures the availability of the strain in the future and eliminates breeding.

Refinement – In the production process, the non-surgical embryo transfer (NSET) method is starting to replace the surgical implantation method for ESC-injected blastocysts. This reduces the discomfort level in foster mothers from moderate to mild. This technique is in the process of being implemented. In most cases NSET will be used, but for validation purposes we will occasionally choose surgical implantation.

Replacement - A client that requests a new mouse model is made aware of alternative methods to answer their scientific question that do not require experimental animals, for instance using in vitro organoid models.

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

All surgical procedures are performed under full anesthesia and pain relief is applied. When applicable, embryo implantations are performed with the non-surgical embryo transfer (uterus, NSET) with minimal discomfort to the foster mother. Unfortunately, the NSET method is not effective for injected zygotes.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

Not applicable

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Within the AMC, we have standard operation protocols for each (surgical) procedure. Together with the animal welfare officer of the AMC we developed protocols for the most appropriate / suitable methods for anaesthesia and analgesia. These may be subjected to change when new concepts or ideas about optimal anaesthesia/analgesia evolve.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Adverse effects on the animals' welfare other than those already mentioned are not expected.

Explain why these effects may emerge.

In Table 2 of the project proposal, the level of discomfort is provided for each procedure. All are mild, except for the surgical procedures, i.e. vasectomy and surgical implantation of embryos, that are considered to be moderate. Besides the fertile male stud mice used for sperm cryopreservation undergoing terminal discomfort, all other fertile male studs have no discomfort and are not registered as experimental animals in this project proposal.

Procedures with mild discomfort:

Timed mating - Female mice are handled to verify a vaginal plug the morning after the mating (plug check). This procedure applies to 100% of the embryo donors and 100% of the foster mothers.

Superovulation - Female mice receive two hormone treatments via injection 46-48h apart. This procedure applies to 100% of the embryo (and oocyte) donors.

Non-surgical embryo implantation - Embryos are implanted in a time-mated foster mother using a tapered catheter in the vagina. The procedure applies in principle to all the foster mothers in the blastocyst route. See "Surgical embryo implantation" below.

Surgical procedures with moderate discomfort:

Vasectomy - Vasectomize under anesthesia and pain relief. A SOP is in place for both the procedure and the pain relief regime. This procedure applies to 100% of the infertile stud males.

Surgical embryo implantation - Surgical embryo implantation under anesthesia and pain relief. Foster mothers in the blastocyst route are scheduled to receive embryos non-surgically via the vagina into the uterus using the NSET. In few cases blastocysts will be implanted surgically for validation purposes of the NSET technique. This will occur when there are no or unusually small litters born to discriminate between embryonic lethality due to the introduced mutation or the use of NSET which is in the process of being implemented. All other foster mothers in the project receive embryos from an earlier developmental stage via surgical implantation. These embryos must be placed in the oviduct which is not accessible through the vagina. A SOP is in place for both the procedure and the pain relief regime.

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

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

Two surgical procedures are performed, i.e. vasectomy and surgical embryo implantation. When a complication arises during or after surgery, the mouse will be euthanized. Apart from possible experimental complications a SOP "Clinical symptoms" is in place that applies to all mice and describes the criteria to identify humane endpoints.

Indicate the likely incidence.

< 3%

K. Classification of severity of procedures

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

Embryo donors (10300): mild

Oocyte donors (1500): mild

Fertile male studs, sperm donors (500): mild

Infertile male studs (450): moderate

Foster mothers, surgical (600): moderate

Foster mothers, non-surgical (2900): mild

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

1. Embryo donors – mice are killed to collect the embryos.
2. Fertile stud males – two male mice of each new GM strain are killed to collect sperm.
3. Infertile stud males – male mice are repeatedly used, up to 4-6 months. Maximum age of infertile stud mice is between 8-9 months. Their libido diminishes after this age and therefore the aged mice are not suitable anymore.
4. Foster mothers – mice are killed after weaning of the pups.

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

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



Yes

Format DEC-advies

Maak bij de toepassing van dit format gebruik van de Praktische Handreiking: Ethisch Toetsingskader voor proefdiergebruik. Voor voorbeelden, zie bijlage I.

Herhaling van antwoorden is niet nodig. Indien van toepassing kan verwezen worden naar een bij een eerdere vraag verstrekt antwoord.

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer
2. Titel van het project *Generation, cryopreservation, re-derivation and sanitation of genetically modified mouse strains*
3. Titel van de NTS *Het maken en invriezen van genetisch gemodificeerde muizenlijnen (diermodellen) ten behoeve van biomedisch onderzoek*
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
 - wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC *DEC-AMC*
 - telefoonnummer contactpersoon 
 - e-mailadres contactpersoon 
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken *4 mei 2017*
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van / tot
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag
 - advies aan CCD
7. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.

De relevante onderdelen van de vergunningaanvraag (projectvoorstel en bijlagen) zijn in een traject voorafgaand aan de indiening ervan bij de DEC in overleg met de IvD tot stand gekomen.

Bij de punten 8 t/m 10 kan worden volstaan met 'n.v.t.' wanneer de betreffende acties niet aan de orde zijn geweest. Bij vragen die gericht zijn op het compleet maken van de aanvraag (aanvullingen achtergrond informatie etc) kan bij punten 8 en 9 worden volstaan met de vermelding van het type vragen en de vermelding dat de aanvraag op de desbetreffende onderdelen is aangepast of dat de antwoorden in de aanvraag zijn verwerkt. Bij vragen die gericht zijn op het verkrijgen van verklaringen voor keuzes die door de aanvrager gemaakt worden, kan niet worden volstaan met het weergeven van de strekking van de antwoorden tenzij de antwoorden volledig in de aanvraag zijn

opgenomen. Als dat het geval is, moet dat in het DEC advies worden benoemd en in de aanvraag inzichtelijk worden gemaakt.

8. Eventueel horen van aanvrager nvt
 - Datum
 - Plaats
 - Aantal aanwezige DEC-leden
 - Aanwezige (namens) aanvrager
 - Gestelde vraag / vragen
 - Verstrekt(e) antwoord(en)
 - Het horen van de aanvrager heeft wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag

9. Correspondentie met de aanvrager nvt
 - Datum
 - Gestelde vraag/vragen.
 - Datum antwoord
 - Verstrekt(e) antwoord(en)
 - De antwoorden hebben wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag

10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC) nvt
 - Aard expertise
 - Deskundigheid expert
 - Datum verzoek
 - Strekking van het verzoek
 - Datum expert advies
 - Advies expert

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Is het project vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)? Indien van toepassing, licht toe waarom het project niet vergunningplichtig is en of daar discussie over geweest is.
Indien niet vergunningplichtig, ga verder met onderdeel E. Advies.
>ja
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag ~~/een wijziging op een bestaande vergunning.~~
3. Is de DEC competent om hierover te adviseren?
>ja
4. Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom.
>Nee, er waren geen DEC leden uitgesloten.

C. Beoordeling (inhoud)

1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft (*Zie handreiking 'Invulling definitie project'; zie bijlage I voor toelichting en voorbeeld*).

Deze aanvraag heeft een concrete hoofddoelstelling (het beschikbaar stellen van speciaal gemaakte genetisch gemodificeerde muislijnen voor onderzoekers van het AMC, de mogelijkheid te bieden om deze lijnen te bewaren door sperma in te vriezen in vloeibare

stikstof voor later gebruik, het opschonen van al bestaande genetisch gemodificeerde muizen via embryo transplantatie). De verschillende doelen dragen allen bij aan de voorziening voor onderzoekers om genetisch gemodificeerde diermodellen te kunnen gebruiken.

2. Signaleer of er mogelijk tegenstrijdige wetgeving is die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan. Het gaat hier om wetgeving die gericht is op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort (bijvoorbeeld Wet dieren en Wet Natuurbescherming).

>nvt

3. Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Nevendoelstellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel.

De aangekruiste doelcategorieën "basic research" en "translational or applied research" sluiten aan bij het uiteindelijke doel waarvoor de muizen gemaakt/bewaard/opgeschoond worden. Deze projectaanvraag lijkt beter te passen onder "regulatory use or routine production", aangezien dit project toestemming vraagt om muizen te maken, te bewaren of op te schonen, maar die binnen dit project nog niet gebruikt zullen worden voor biomedisch fundamenteel of toegepast onderzoek', al zal dit wel het uiteindelijke doel zijn.

Belangen en waarden

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen. Beoordeel of het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C4; zie bijlage I voor voorbeeld*).

Het directe doel (het maken/bewaren/opschonen van genetisch gemodificeerde muizen met inachtneming van nieuwe ontwikkelingen) zal bijdragen aan het uiteindelijke doel: het beschikbaar stellen van speciaal gemaakte genetisch gemodificeerde muizen voor biomedisch onderzoek door het AMC. Het directe doel is gerechtvaardigd binnen de context van het uiteindelijke doel. Dit wordt geborgd doordat de betreffende muislijn enkel vervaardigd/bewaard/opgeschoond zal worden voor reeds ethisch getoetst en goedgekeurd biomedisch onderzoek.

5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 2.B en tabel 1; zie bijlage I voor voorbeeld*)

De belangrijkste belanghebbenden in dit project dat gericht is op het vervaardigen/bewaren/opschonen van genetisch gemodificeerde muizen zijn de proefdieren, de medewerkers van de faciliteit en uiteindelijk de onderzoekers van het AMC die gebruik maken van diermodellen met genetisch gemodificeerde muizen. Deze faciliteit creëert een toegang tot dit soort modellen voor AMC onderzoekers, door hun specifieke expertise en voorzieningen. De toegang tot deze modellen kan bijdragen aan hoogwaardig kwalitatief onderzoek wat uiteindelijk kan leiden tot grote maatschappelijke belangen en in mindere mate het AMC die profiteert van de status van een goed presterend onderzoeksinstituut.

6. Is er aanleiding voor de DEC om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken?

Er is geen aanleiding om te twifelen aan het afwezig zijn van effecten op het milieu, zoals beschreven in de aanvraag.

Proefopzet en haalbaarheid

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw beoordeling toe. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C5*).

De IvD ziet er op toe dat alle personen die betrokken zijn bij het vervaardigen/bewaren/opschonen van GM muislijnen voldoen aan de wettelijke eisen van kennis en deskundigheid.

De kwaliteit en kundigheid van de medewerkers zijn geborgd door meerdere jaren aan ervaring met deze technieken en de reeds bestaande faciliteit. De DEC acht de kwaliteit door de opzet van deze genetische muislijnen voldoende gewaarborgd.

8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw beoordeling toe. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C6*).

Het voorstel geeft een duidelijke omschrijving van de verschillende doelen die allen bijdragen aan het bieden van een toegang aan onderzoekers naar diermodellen op basis van genetisch gemodificeerde muislijnen. De verschillende doelen worden duidelijk omschreven in de aanvraag. De verschillende routes waarop genetisch gemodificeerde muizen gemaakt worden (zygote route of blastocyst route), het bewaren van muislijnen d.m.v. sperma/eicellen/embryo's in vloeibaar stikstof in te vriezen en het opschonen van dieren (uitgaande van embryo's of sperma). Daarnaast worden voorbeelden gegeven van de "nieuwe" ontwikkelingen zoals een transplantatie methode via de vagina zonder de noodzaak van een operatie en de opkomst van CRISPR/cas9. De DEC is van mening dat de beschreven aanpak logisch aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling.

Welzijn dieren

9. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. Beoordeel of de keuze hiervoor voldoende wetenschappelijk is onderbouwd en of de aanvrager voldoet aan de in de Wet op de Dierproeven (Wod). voor de desbetreffende categorie genoemde beperkende voorwaarden. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C1; zie bijlage I voor toelichting en voorbeelden*).

- Bedreigde diersoort(en) (10e, lid 4)
- Niet-menselijke primaten (10e)
- Dieren in/uit het wild (10f)
- Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn)
- Zwerfdieren (10h)
- Hergebruik (1e, lid 2)
- Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
- Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
- Dodingsmethode niet volgens bijlage IV richtlijn (13c, lid 3)

Er is geen sprake van bijzondere dieren, omstandigheden of behandelingen.

10. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan, omdat het, om redenen van dierenwelzijn of diergezondheid of om wetenschappelijke redenen, noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe.

Er wordt voldaan aan bijlage III.

11. Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*).

De ongeriefinschatting is stand gekomen met gebruikmaking van de Toelichting Codering Ongerief en op advies van de IvD. Het ongerief is per handeling realistisch ingeschat. De DEC meent dat de inschattingen van ongerief juist zijn.

12. Het uitvoeren van dierproeven zal naast het ongerief vaak gepaard gaan met aantasting van de integriteit van het dier. Beschrijf op welke wijze er sprake is van aantasting van integriteit. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*). (*zie bijlage I voor voorbeeld*).

Bij het vervaardigen van genetisch gemanipuleerde muislijnen wordt de integriteit aangetast omdat het genoom gemodificeerd wordt. Er wordt niet verwacht dat deze ingreep de "heelheid" van het dier zodanig aantast dat er sprake is van vermindering of ontneming van soort-specifieke eigenschappen. Het herstellen van een operatie (vasectomie en operatieve plaatsing van een embryo) kan pijn en stress veroorzaken waardoor hun natuurlijke gedrag beïnvloed kan worden. Dit wordt (getracht te) voorkomen door het toepassen van pijnstilling.

13. Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

Het humane eindpunt is als volgt gedefinieerd: indien er complicaties optreden tijdens of na het verrichten van een operatie, De DEC is van mening dat dieren hierdoor goed beschermd worden tegen onvoorziene ongerief.

3V's

14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

De doelstelling van dit project is niet verenigbaar met een geschikt proefdiervrij alternatief. Buiten dit project is het gebruik van de genetisch gemodificeerde muislijnen al eerder getoetst of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn voor het betreffende muismodel.

15. Beoordeel of het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en of er een heldere strategie is om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

De berekening van het aantal dieren is navolgbaar. Het aantal dieren dat nodig is om een succesvol een genetisch gemodificeerde muis te maken/te bewaren/op te

schonen is op ervaring berekend. Er wordt voorzien dat er een stijging in het aantal opdrachten zal komen, vergeleken met het verleden. Er worden drie redenen gegeven: de huidige werkdruk, de goedkeuring van een AMC project waarin voorzien wordt dat er 50 manipulatie sessies/jaar zullen plaatsvinden voor meerdere jaren, de opkomst van de CRISPR/cas9 technologie waardoor het minder tijdrovend is om een genetische manipulatie uit te voeren. De DEC schat deze verwachte stijging naar 50 GM lijnen (waar 120 injectie sessies voor nodig zouden zijn) realistisch in. De DEC vindt de inschatting dat het aantal lijnen die ingevroren zullen worden hierdoor ook mee zullen stijgen, logisch.

16. Beoordeel of het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project zodanig is opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

De DEC oordeelt dat het project in overeenstemming is met de vereisten van verfijning van dierproeven en dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd omdat:

- 1) de operatieve embryo terugplaatsing in de baarmoeder wordt vervangen door een niet-operatieve plaatsing via de vagina (nu nog in de implementatie fase);
- 2) de operaties (vasectomie en operatieve terugplaatsing embryo) worden uitgevoerd onder algehele verdoving en met geschikte post-operatieve pijnbestrijding;
- 3) de medewerkers allemaal zeer ervaren zijn in de betreffende technieken en daardoor onnodig ongerief voorkomen wordt bij de proefdieren.

De humane eindpunten zijn daarnaast duidelijk geformuleerd, waarmee de mate van verfijning verder is geborgd.

17. Beoordeel, indien het wettelijk vereist onderzoek betreft, of voldoende aannemelijk is gemaakt dat er geen duplicatie plaats zal vinden en of de aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om tijdens de uitvoering van het project te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt. Licht uw beoordeling toe.
nvt

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3; zie bijlage I voor voorbeeld*).

Deze voorwaarde is niet van toepassing op dit project, aangezien het verzamelen van eicellen, embryo's en sperma sekse gebonden is.

19. Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef). Indien dieren gedood worden, geef aan of en waarom dit noodzakelijk is voor het behalen van de doelstellingen van het project. Indien dieren gedood worden, geef aan of er een voor de diersoort passende dodingsmethode gebruikt wordt die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Zo niet, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. Indien van toepassing, geeft ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

Ja, voor de verschillende handelingen wordt aangegeven waarom de muizen worden gedood. De muizen worden gedood om embryo's, eicellen of sperma te verzamelen. De draagmoeders worden na het verspenen gedood. De onvruchtbare mannetjes muizen worden herhaaldelijk ingezet totdat ze 8-9 maanden worden. Op deze leeftijd zakt het libido en zijn ze niet meer geschikt om een schijnzwangerschap te

veroorzaken bij de draagmoeders. De dieren zullen volgens de richtlijn gedood worden.

20. Indien niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren worden gedood om niet-wetenschappelijke redenen, is herplaatsing of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is.

nvt

NTS

21. Is de niet-technische samenvatting een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd?

Ja, deze is in overleg met de afdeling communicatie van de vergunninghouder bewerkt met het oog op de begrijpelijkheid. De NTS is een evenwichtige weergave van het project.

D. Ethische afweging

1. Benoem de centrale morele vraag (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.A*).

Rechtvaardigt het verkrijgen, bewaren en opschonen van genetisch gemodificeerde muislijnen, het lichte tot matige ongerief dat de muizen tijdens deze handelingen zullen ervaren?

2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn, ten opzichte van elkaar af. Om dit proces te vergemakkelijken, kunt u de belangrijkste belanghebbenden en de belangrijkste waarden die in het geding zijn waarderen. U kunt dit verwoorden in termen van gering, matig of veel/ernstig voordeel of nadeel. Geef aan waarom de DEC bevordering van waarden (baten) voor de ene belanghebbende prevaleert boven de aantasting van waarden (kosten) voor de andere belanghebbende (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.B; zie bijlage I voor voorbeelden*).

De belangrijkste belanghebbenden in dit project dat tot doel heeft om onderzoekers van het AMC te voorzien in genetisch gemodificeerde muislijnen voor biomedisch onderzoek, zijn de proefdieren en de medewerkers van de faciliteit, en in mindere mate de onderzoekers van het AMC die genetisch gemodificeerde muizen gebruiken voor hun onderzoek en het AMC zelf.

De muizen worden in dit project geschaad omdat ze stress en mogelijk pijn zullen ondervinden. Het getimedede paren, de superovulatie (hormoonbehandelingen), het plaatsen van een embryo via de vagina kan stress veroorzaken bij de muizen en de operaties (vasectomie of transplanteren van een embryo of eicel in baarmoeder/eileiders) kan eventueel pijn en stress veroorzaken. In het grootste gedeelte van de dieren zal het ongerief geclassificeerd kunnen worden als licht. In een klein gedeelte (20%) van de dieren zal het ongerief maximaal matig kunnen worden doordat de dieren bijkomen uit de narcose en moeten herstellen van een operatie. Indien nodig zal er pijnstilling gegeven worden na de operatie.

De andere groep belanghebbenden, namelijk de medewerkers van de faciliteit hebben een financieel belang bij deze vergunning doordat de faciliteit arbeidsgelegenheid biedt. De onderzoekers van het AMC wordt de mogelijkheid geboden om biomedisch onderzoek te doen met genetisch gemanipuleerde muislijnen wat bijdraagt aan de kwaliteit van hun onderzoek. Het AMC heeft er belang bij dat hun onderzoekers toegang hebben tot

onderzoek waarin genetisch gemanipuleerde muislijnen gebruikt worden. De geboden faciliteiten door een instituut kunnen bijdragen aan de keus van (goede) onderzoekers om bij die instelling te gaan werken, daarnaast heeft het AMC belang bij het publiceren in toptijdschriften door hun onderzoekers, waar deze faciliteit aan bij kan dragen.

Maximaal 16250 muizen zullen gering tot matig ongerief ondergaan. De DEC acht dit gerechtvaardigd door de verwachte gunstige gevolgen van het verkrijgen van genetisch gemanipuleerde muislijnen, maar ook het bewaren en opschonen met inachtneming van nieuwe ontwikkelingen, omdat het hier enkel lijnen betreft waarvan de toepassing in biomedisch onderzoek al getoetst is op haalbaarheid en opbrengst ten opzichte van het geschatte ongerief. De DEC weegt het uiteindelijke wetenschappelijke en maatschappelijke belang, dat buiten dit project ligt, mee in het afwegen van de belangen.

3. Beantwoord de centrale morele vraag. Maak voor het beantwoorden van deze vraag gebruik van bovenstaande afweging van morele waarden. Maak daarnaast gebruik van de volgende moreel relevante feiten: belang onderzoek (C4), kennis en kunde van betrokkenen (C7), haalbaarheid doelstellingen (C8), categorieën en herkomst dieren (C9), 3V's (C14-C18), ongerief (C10-13 en C19) en relevante wet en regelgeving (C2). Onderbouw hoe al deze elementen zijn meegewogen bij de beantwoording van de centrale morele vraag, zodanig dat het navolgbaar is zonder gedetailleerde kennis te hebben van het projectvoorstel (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.C; zie bijlage I voor voorbeeld*).

Het maken en invriezen van genetisch gemodificeerde muizenlijnen (diermodellen) ten behoeve van biomedisch onderzoek

De DEC is van mening dat het belang van het maken van en beschikbaar stellen van genetisch gemanipuleerde muislijnen (alsmede het bewaren van deze lijnen en het opschonen ervan) voor reeds goedgekeurd biomedisch onderzoek, het geringe (80%) tot matige (20%) ongerief dat de muizen zullen ondergaan, rechtvaardigt.

De DEC acht het aannemelijk dat de doelstelling behaald zal worden. Het belang van de doelstelling is duidelijk geformuleerd. In deze vergunning worden voornamelijk genetisch gemanipuleerde muizen op verzoek van onderzoekers gemaakt voor reeds ethisch goedgekeurd biomedisch onderzoek, vervolgens wordt de mogelijkheid geboden om de muislijn te bewaren door middel van cryo preservatie of indien de lijn al elders is gecreëerd te worden opgeschoond tot een gespecificeerde pathogeen vrije status, dit alles met inachtneming van nieuwe ontwikkelingen. Het feit dat de muislijnen alleen geproduceerd worden voor reeds goedgekeurd onderzoek borgt indirect het maatschappelijk of wetenschappelijk belang van het genereren van deze muislijnen. De faciliteit draait al meerdere jaren en de medewerkers hebben ruime ervaring in de beschreven handelingen, er is daarnaast genoeg kennis en kunde in huis om de 3V's te kunnen toepassen. De meeste dieren zullen gering ongerief ondergaan door de voorgestelde handelingen, welke uitgevoerd zullen worden door ervaren medewerkers. Het matige ongerief zal veroorzaakt worden doordat dieren geopereerd worden en daarvan moeten herstellen. In het geval van embryo transplantatie wordt de methode verfijnd doordat er momenteel een niet-operatieve methode via de vagina geïmplementeerd wordt. De DEC erkent dat het verkrijgen van genetisch gemodificeerde muizen noodzakelijk kan zijn om bepaalde vraagstellingen te beantwoorden en dat het genereren van deze muislijnen daarom gerechtvaardigd is ten opzichte van het ongerief dat de muizen in dit "productie proces" ondergaan.

De DEC is bovendien van mening dat de voorgestelde opzet van dit project waarin ook muislijnen ingevroren worden zodat een nieuwe ronde van de genetische manipulatie voorkomen kan worden, alsmede het opschonen van reeds bestaande lijnen bijdraagt

aan een vermindering van het aantal proefdieren dat gebruikt wordt tijdens het genereren. De gekozen aanpak van het project kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen de kaders van het project. De DEC is er verder van overtuigd dat de aanvrager voldoende toegang heeft tot kennis en kunde met betrekking tot de voorgestelde handelingen om de doelstelling te behalen. Tevens verwacht de DEC op basis van deze aanvraag dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om zowel het ongerief van de dieren alsmede het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken doordat er veel ervaring is met het aantal dieren dat nodig is voor iedere methode. Dit projectvoorstel is inherent aan proefdiergebruik, er kunnen immers geen proefdieren verkregen worden met een proefdiervrij alternatief.

Gezien het bovenstaande is de DEC van mening dat dit project het gebruik van proefdieren rechtvaardigt.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden

Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.

Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist

Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...

De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen:...

De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...

De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...

2. Het uitgebrachte advies kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt in de DEC. Indien gebaseerd op een meerderheidsstandpunt, specificeer het minderheidsstandpunt op het niveau van verschillende belanghebbenden en de waarden die in het geding zijn (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.A; zie bijlage I voor voorbeeld*).

Dit DEC advies is unaniem tot stand gekomen.

3. Omschrijf de knelpunten/dilemma's die naar voren zijn gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies zowel binnen als buiten de context van het project (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.B*).

Er zijn geen knelpunten of dilemma's naar voren gekomen bij dit projectvoorstel.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academisch Medisch Centrum

Meibergdreef
1105 AZ AMSTERDAM

**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD1180020171287

Bijlagen

2

Datum 11 juli 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 10 juli 2017. Het gaat om uw project "Generation, cryopreservation, re-derivation and sanitation of genetically modified mouse strains". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1180020171287. 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).

Datum:

11 juli 2017

Aanvraagnummer:

AVD1180020171287

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
11 juli 2017
Aanvraagnummer:
AVD1180020171287

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 11800
Naam instelling of organisatie: Academisch Medisch Centrum
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: [REDACTED]
Straat en huisnummer: Meibergdreef 31
Postcode en plaats: 1105 AZ AMSTERDAM
IBAN: NL68RABO0136166741
Tenaamstelling van het rekeningnummer: AMC

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: Principal Investigator/ Onderzoeker
Afdeling: Genetically Engineered Mouse Models
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

Datum:

11 juli 2017

Aanvraagnummer:

DE180020171287

Over uw project

Geplande startdatum:

1 januari 2018

Geplande einddatum:

31 december 2022

Titel project:

Generation, cryopreservation, re-derivation and sanitation of genetically modified mouse strains

Titel niet-technische samenvatting:

Het genereren, saneren en invriezen van genetisch gemodificeerde muizenlijnen ten behoeve van biomedisch onderzoek

Naam DEC:

DEC AMC

Postadres DEC:

Meibergdreef 31, 1105 AZ Amsterdam

E-mailadres DEC:

[REDACTED]

Betaalgegevens

De leges bedragen:

€ 35,-

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:

Amsterdam

Datum:

10 juli 2017



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academisch Medisch Centrum

Meibergdreef
1105 AZ AMSTERDAM

**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD1180020171287

Datum 14 juli 2017
Betreft aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 10 juli 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Generation, cryopreservation, re-derivation and sanitation of genetically modified mouse strains" met aanvraagnummer AVD1180020171287. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

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

Onduidelijkheden

In de NTS staat dat 2900 draagmoeders wel en 600 geen chirurgische ingreep zullen ondergaan en dat in totaal 79,4% licht en 20,6% matig ongerief zal ondergaan. Uit de Bijlage Dierproeven blijkt uit de tabel onder K dat 600 draagmoeders wel en 2900 geen chirurgische ingreep zullen ondergaan, waarmee het ongerief ook anders uitkomt. Overigens komen de gegevens van de Bijlage Dierproeven onder B overeen met de NTS. Kunt u aangeven welke van deze cijfers juist zijn en een nieuw document (NTS of Bijlage Dierproeven) sturen met de juiste gegevens?

Kunt u daarnaast een nieuwe NTS sturen, waarin u onder 3.3 'huismuis' wijzigt in bijvoorbeeld 'muis'. Dit omdat 'huismuis' bij de doelgroep van de NTS niet overeenkomt met het beeld van de laboratoriummuizen.

Leges

De leges die u verschuldigd bent zijn nog niet door ons ontvangen of de betaling is nog niet verwerkt. Uw aanvraag is niet compleet als de leges niet zijn ontvangen.

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

Datum:

14 juli 2017

Aanvraagnummer:

AVD1180020171287

Opsturen binnen veertien dagen

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

Wanneer een beslissing

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

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



Melding bijlagen

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

1 Uw Gegevens

Naam instelling: Academisch Medisch Centrum

Adres:

Postcode en plaats:

Aanvraagnummer: AVD1180020171287

2 Bijlagen

Welke bijlagen stuurt u mee?

Vink de bijlagen aan of vul de naam of omschrijving in.

Projectvoorstel

Beschrijving Dierproeven

Niet-technische samenvatting

Melding Machtiging

Aanvraagformulier

.....

.....

.....

Datum:

14 juli 2017

Aanvraagnummer:

AVD1180020171287

3 Ondertekening

Naam:

Datum: - -

Handtekening:

Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:
Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag



1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 11800
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. Academisch Medisch Centrum (AMC), Amsterdam
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|---|
| 3.4.4.1 | Generation, cryopreservation, re-derivation and sanitation of genetically modified mouse strains. |
- Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

Two basic routes are used for the generation of GM mice:

The zygote route - This route is based on genetic engineering in fertilized oocytes (zygotes) micro-injected with DNA, RNA or protein. Zygotes are harvested from a superovulated female donor mouse that has mated with a fertile stud male. Following injection the zygotes are surgically implanted (under full anesthesia) in the oviduct of a pseudopregnant foster mother that was time-mated with a sterile stud male. The foster mother brings the embryos to term, and suckles and weans the pups.

The blastocyst route - This route is based on genetically engineered embryonic stem cells that are injected into blastocysts (3.5 day embryos). Blastocysts are harvested from a superovulated female donor mouse that has mated with a fertile stud male. The injected blastocysts are implanted (surgically under full anesthesia or non-surgically) in the uterus of a pseudopregnant foster mother that was time-mated with a sterile stud male. The foster mother brings the embryos to term, and suckles and weans the pups.

The cryopreservation program consists of two routes:

Sperm freezing, quality control and re-derivation - Male mice are sacrificed and sperm is collected, frozen in straws and stored in liquid nitrogen. One straw is used to verify the quality of the batch by performing *In Vitro Fertilization* (IVF, see below). The number of 2-cell stage embryos is scored and projected against the total of starting oocytes. This score should be >40%. The 2-cell embryos can then be implanted in a foster mother to rederive the strain for delivery to a client or to confirm the birth of pups.

IVF - Female donor mice are superovulated and oocytes are harvested. The oocytes are counted and incubated overnight with the thawed sperm.

Embryo freezing, quality control and re-derivation - Female donor mice are superovulated and mated with male stud mice. Early pre-implantation embryos are harvested, frozen in straws and stored in liquid nitrogen. The aim is to freeze 150 - 200 embryos per mouse strain. One straw is used for quality control by verifying the viability of the embryos upon thawing. Thawed and viable embryos can be implanted in a foster mother to re-derive the mouse strain or to confirm the birth of pups.

The Sanitation program:

The sanitation program consists of obtaining pre-implantation embryos that are washed thoroughly to eliminate pathogens and the subsequent implantation into foster mice. The sanitation program has two branches:

Sanitation starting from embryos – Embryos can be obtained by thawing frozen stock or freshly harvested from female donor mice. In the latter case the female donor mice are superovulated and mated with male stud mice.

Sanitation starting from frozen sperm – Sperm is thawed and IVF is performed as described above. Resulting 2-cell embryos are then transferred to the oviduct of foster mice.

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

Four different mice are required to generate new GM strains, cryopreserve and re-derive strains or sanitize strains: 1) donor mice, 2) fertile stud males, 3) infertile stud males and 4) foster mothers. And three procedures involve treatment of the mice: 1) superovulation, 2) vasectomy and 3) embryo implantation. How the proposed animal procedures relate to each different type of mouse and the level of discomfort is depicted in Table 2 of the Project Proposal. In addition:

Superovulation – Pre-puberal female mice receive 2 hormone treatments via injection 46- 48h apart. After the second treatment, the female is mated with a stud male. Next day a plug check is performed. All female mice are sacrificed 0.5-3.5 days post mating and embryos are collected. In case of oocyte isolation, the female donor mice are superovulated with the same protocol, but the timed mating is omitted. Mice are sacrificed 14-16 hours after the second hormone treatment and oocytes are collected.

Vasectomy – Vasectomy is performed on 6-8 week old male mice following our SOP “vasectomy” and takes on average 15 minutes per mouse. Mice are anesthetized and pain relief is administered (detailed and approved SOPs apply). In brief, an incision is made through the skin and the abdomen wall. The vasa deferentia are located and a small piece is removed using cautery. The 5-7 mm incision in the muscle layer is closed with sutures. Next, sutures are used to close the skin. Following surgery there is a recovery period of two weeks.

Embryo implantation – Embryos are implanted in 7 – 16 week old foster mothers (weighing 18-30 g). For surgery mice are anesthetized and pain relief is administered (detailed and approved SOPs apply). Two types of implantation are performed depending on the developmental stage of the embryos. 1) implantation in the oviduct. 2) implantation in the uterus.

- 1) Implantation in the oviduct is performed following our SOP “embryo implantation in the oviduct” and takes on average 15 minutes per mouse. In brief, a 5 mm incision is made through the body wall to expose the oviduct. The infundibulum is located and using a fine needle pipet the embryos are inserted. The muscle layer is closed with sutures, followed by the sutures to close the skin.
- 2) Embryos are implanted non-surgically in the uterus of a recipient foster mouse via a tapered catheter in the vagina using our SOP “NSET”. The procedure takes 1-2 minutes and is performed without anesthesia or pain relief. Alternatively surgical implantation is performed following our SOP “embryo implantation in the uterus”. Surgery is the same as described for oviduct except for the implantation step. After making the incision the beginning of the uterus is located, a puncture is made using a fine injection needle and through the puncture the embryos are inserted using a fine needle pipet.

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

Statistical methods are less applicable to these activities. Production numbers seem more applicable. We constantly monitor our achieved efficiencies and success rates, and optimize procedures where needed, thereby minimizing the number of animals.

B. The animals

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

Species – House mouse (*Mus Musculus*).

Origin – In house breeding or commercial breeder. In house breeding will in the future be performed for infertile male studs and foster mothers at SOPF level. This enables us to generate GM mouse strains with a SOPF health status. Maintenance of a SOPF status in the animal unit is not agreeable with regular import of animals from external sources.

Estimated numbers – The lowest number of mice required to achieve the goals of the different components of the project is known from our historical production numbers. In Table 2.1, the number of each type of experimental mouse involved in this project is specified. We foresee a demand of 50 GM strains per year, which we can generate in 120 injection sessions (Table 2.1). In general, the majority of the injection sessions will result in the birth of a GM mouse however for a proper analysis of the genetic modification several independent individuals carrying the mutation are required. Compared to our production numbers over the years 2012-2014 (see subsection 3.1 of the project proposal) there is a large increase in the demand for GM strains. This increase is based on: 1) the current work load. 2) a granted project of one of the research groups in the AMC that involves an additional 50 manipulation sessions per year for several years. 3) the rise of the CRISPR/Cas9 technology that allows one-step generation of GM strains. With the anticipated increase in the generation of GM mouse strains we also foresee an increase in our cryo-preservation activities. Upon our advice it is almost standard procedure for investigators to freeze sperm of all new GM strains. On top of that we expect to freeze embryos of 5 strains with complex genotypes. Freezing of sperm will in all cases be followed by quality control via IVF (50 sessions + 10 additional sessions in case of low fertility rate). In 10-20% of the cases the client chooses to have the embryos implanted into foster mothers and brought to term. Based on previous years we expect that 15 strains need to be re-derived from our cryo-archive per year. When a client requires a GM strain that already exists elsewhere the strain will not be generated again but will be imported into our institute via a sanitation procedure. We foresee the import of 30 GM strains per year (sperm 20 strains, embryos 10 strains).

We estimate that 16250 mice will be used: embryo/egg cell-donors (11800), fertile males (sperm-donors) (500), sterilized males (450) and foster mothers with (2900) or without (600) surgical procedures.

Table 2.1. Types and numbers of experimental mice required

| | Generation of GM mice | | Process optimization * | Cryopreservation and re-derivation | | | | Sanitation | |
|----------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|------------------------|------------------------------------|---|------------------------------------|--|---|------------------------------------|
| | Zygote route | Blastocyst route | | Sperm cryo | IVF (QC) | Embryo cryo | Re-derivation ^Ω | From sperm IVF | From (frozen) embryos ^Σ |
| Sessions/year | 90 | 30 | | | | | | | |
| Strains/year | | | | 50 | 60 | 5 | 15 | 20 | 10 |
| Embryo donors | $90 \times 15^{\$} =$ 1350 | $30 \times 15^{\$} =$ 450 | n.a. | - | $60 \times 2^{\$} =$ 120 (oocytes) | $5 \times 40^{\$} =$ 200 | $10 \times 6^{\$} =$ 60 (oocytes) | $20 \times 6^{\$} =$ 120 (oocytes) | $10 \times 6^{\$} =$ 60 |
| Fertile male studs | - | - | - | $50 \times 2^{\$} =$ 100 | - | - | - | - | - |
| Infertile male studs | $90^{\#\} \Rightarrow$ | \Rightarrow | \Rightarrow | - | \Rightarrow | - | \Rightarrow | \Rightarrow | \Rightarrow |
| Foster mothers | $90 \times 4^{\$} =$ 360 | $30 \times 4^{\$} =$ 120 | n.a. | - | $10 \times 4^{\$} =$ 40 | - | $15 \times 4^{\$} =$ 60 | $20 \times 4^{\$} =$ 80 | $10 \times 4^{\$} =$ 40 |
| Total/1 year | 1800 | 570 | | 100 | 160 | 200 | 120 | 200 | 100 |
| Total/5 year | 9000 | 2850 | | 500 | 800 | 1000 | 600 | 1000 | 500 |

* Optimization attempts (such as subtle changes in media, concentrations and incubation times) are performed during regular sessions of Generation, Cryopreservation and Sanitation and do not require

additional animals. (Approximately 5-10% of the cases)..

\$ Numbers of mice required are based on the average of our 2012-2014 production numbers.

The same infertile male studs are used in different branches of the project (90/year total).

Σ If sanitation is performed from frozen embryos, embryo donors are not required.

Ω It is anticipated that re-derivation will be performed 10 times from frozen sperm and 5 times from frozen embryos.

n.a. not applicable, these mice are accounted for in the other columns.

QC, Quality Control

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

The 3R's in animal testing are an important theme in the AMC Transgenic Facility. They are implemented as follows:

Reduction – 1) Upon request for the generation of a new mouse strain a search is performed in online databases to check whether that strain already exists. An already existing strain will not be generated again but will be imported into the facility. **2)** New GM strains will be created directly on the desired strain background. The latest technological advances, such as Crispr/Cas9 gene editing, make this feasible. This prevents backcrossing to another strain background, typically for 10 generations, leading to a considerable reduction in mice. **3)** AMC Transgenic Facility aims to optimize and standardize procedures to be able to more efficiently generate GM mice, thereby reducing repeat injections due to lack of success. An example of an optimization is using the best suited mouse strain for embryo donation. The yield of high-quality embryos varies between mouse strains and identifying the optimal strain can reduce the number of embryo donor mice required. An example of standardization is the age and weight of the donor and stud mice. To maximize fertility we exclusively select female donor mice of 3-8 weeks old and male studs of 2 months, which are repeatedly used to a maximum of 5 months. **4)** After generation of a GM mouse strain we strongly encourage the investigator to cryopreserve the strain at an early generation. Cryopreservation ensures the availability of the strain in the future and eliminates breeding.

Refinement – In the production process, the non-surgical embryo transfer (NSET) method is starting to replace the surgical implantation method for ESC-injected blastocysts. This reduces the discomfort level in foster mothers from moderate to mild. This technique is in the process of being implemented. In most cases NSET will be used, but for validation purposes we will occasionally choose surgical implantation.

Replacement - A client that requests a new mouse model is made aware of alternative methods to answer their scientific question that do not require experimental animals, for instance using in vitro organoid models.

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

All surgical procedures are performed under full anesthesia and pain relief is applied. When applicable, embryo implantations are performed with the non-surgical embryo transfer (uterus, NSET) with minimal discomfort to the foster mother. Unfortunately, the NSET method is not effective for injected zygotes.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

Not applicable

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Within the AMC, we have standard operation protocols for each (surgical) procedure. Together with the animal welfare officer of the AMC we developed protocols for the most appropriate / suitable methods for anaesthesia and analgesia. These may be subjected to change when new concepts or ideas about optimal anaesthesia/analgesia evolve.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Adverse effects on the animals' welfare other than those already mentioned are not expected.

Explain why these effects may emerge.

In Table 2 of the project proposal, the level of discomfort is provided for each procedure. All are mild, except for the surgical procedures, i.e. vasectomy and surgical implantation of embryos, that are considered to be moderate. Besides the fertile male stud mice used for sperm cryopreservation undergoing terminal discomfort, all other fertile male studs have no discomfort and are not registered as experimental animals in this project proposal.

Procedures with mild discomfort:

Timed mating - Female mice are handled to verify a vaginal plug the morning after the mating (plug check). This procedure applies to 100% of the embryo donors and 100% of the foster mothers.

Superovulation - Female mice receive two hormone treatments via injection 46-48h apart. This procedure applies to 100% of the embryo (and oocyte) donors.

Non-surgical embryo implantation - Embryos are implanted in a time-mated foster mother using a tapered catheter in the vagina. The procedure applies in principle to all the foster mothers in the blastocyst route. See "Surgical embryo implantation" below.

Surgical procedures with moderate discomfort:

Vasectomy - Vasectomize under anesthesia and pain relief. A SOP is in place for both the procedure and the pain relief regime. This procedure applies to 100% of the infertile stud males.

Surgical embryo implantation - Surgical embryo implantation under anesthesia and pain relief. Foster mothers in the blastocyst route are scheduled to receive embryos non-surgically via the vagina into the uterus using the NSET. In few cases blastocysts will be implanted surgically for validation purposes of the NSET technique. This will occur when there are no or unusually small litters born to discriminate between embryonic lethality due to the introduced mutation or the use of NSET which is in the process of being implemented. All other foster mothers in the project receive embryos from an earlier developmental stage via surgical implantation. These embryos must be placed in the oviduct which is not accessible through the vagina. A SOP is in place for both the procedure and the pain relief regime.

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

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

Two surgical procedures are performed, i.e. vasectomy and surgical embryo implantation. When a complication arises during or after surgery, the mouse will be euthanized. Apart from possible experimental complications a SOP "Clinical symptoms" is in place that applies to all mice and describes the criteria to identify humane endpoints.

Indicate the likely incidence.

< 3%

K. Classification of severity of procedures

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

Embryo donors (10300): mild

Oocyte donors (1500): mild

Fertile male studs, sperm donors (500): mild

Infertile male studs (450): moderate

Foster mothers, surgical (2900): moderate

Foster mothers, non-surgical (600): mild

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

1. Embryo donors – mice are killed to collect the embryos.
2. Fertile stud males – two male mice of each new GM strain are killed to collect sperm.
3. Infertile stud males – male mice are repeatedly used, up to 4-6 months. Maximum age of infertile stud mice is between 8-9 months. Their libido diminishes after this age and therefore the aged mice are not suitable anymore.
4. Foster mothers – mice are killed after weaning of the pups.

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

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

Yes



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academisch Medisch Centrum

Meibergdreef
1105 AZ AMSTERDAM



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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD1180020171287
Bijlagen
1

Datum 12 september 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 10 juli 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Generation, cryopreservation, re-derivation and sanitation of genetically modified mouse strains" met aanvraagnummer AVD1180020171287. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 17 juli 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Dit betrof een nieuwe NTS en verduidelijking van het aantal dieren dat een chirurgische ingreep zal ondergaan.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning.

De algemene voorwaarde(n) zijn opgenomen op grond van artikel 1d lid 4, artikel 10a1 lid 2, artikel 10 lid 2 en/of artikel 10a3 van de wet.

De voorwaarde betreffende de rapportage geldt omdat de CCD hiermee vorm geeft aan de maatregelen die volgen uit het advies van het NCad; 'genetisch gemodificeerde dieren in voorraad gedood' en de oproep van de Staatssecretaris die volgt uit de voortgangsrapportage van 1 november 2015.

U kunt met uw project "Generation, cryopreservation, re-derivation and sanitation of genetically modified mouse strains" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 januari 2018 tot en met 31 december 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC AMC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 10 juli 2017. 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. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

Bezwaar

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

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

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

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:


M. G. de Boer
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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

Datum:
12 september 2017
Aanvraagnummer:
AVD1180020171287



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Academisch Medisch Centrum

Adres: Meibergdreef 31

Postcode en plaats: 1105 AZ AMSTERDAM

Deelnemersnummer: 11800

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 januari 2018 tot en met 31 december 2022, voor het project "Generation, cryopreservation, re-derivation and sanitation of genetically modified mouse strains" met aanvraagnummer AVD1180020171287, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC AMC. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Principal Investigator/ Onderzoeker.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 10 juli 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 10 juli 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 17 juli 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 10 juli 2017, ontvangen op 10 juli 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 17 juli 2017

| Naam proef | Diersoort/ Stam | Aantal dieren | Ernst | Opmerkingen |
|---|-------------------------|---------------|------------------------------|-------------|
| 3.4.4.1 Generation, cryopreservation, re-derivation and sanitation of genetically modified mouse strains | | | | |
| | Muizen (Mus musculus) / | 16.250 | 21% Matig 79% Licht | |

Voorwaarden

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

In artikel 10, lid 1 sub a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van

Aanvraagnummer:
AVD1180020171287

het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in afstemming met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarde wijzigen of intrekken.

Elk jaar, voor 1 april, wordt op basis van de getallen benodigd voor de registratie voor de NVWA een rapportage gedaan betreffende de fok; het aanhouden van lijnen met ongerief. U beschrijft hierbij welke aantallen dieren in de fok zijn ingezet, voor het aantal dieren dat is gefokt beschrijft u hoeveel dieren in de experimenten zijn ingezet, hoeveel dieren in voorraad zijn gedood wegens ongeschikt genotype of in voorraad zijn gedood wegens overtollig. U licht hierbij ook toe welke maatregelen u neemt om het aantal dieren in voorraad gedood terug te dringen.



Aanvraagnummer:

AVD1180020171287

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

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

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

Verzorging

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

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

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

Pijnbestrijding en verdoving

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

Aanvraagnummer:
AVD1180020171287

kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

Einde van een dierproef

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

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

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

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

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