

Inventaris Wob-verzoek W17-11										
nr.	document NTS 20171744	wordt verstrekt				weigeringsgronden				
		reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1	
1	Origineel aanvraagformulier				x		x			
2	NTS	x								
3	Projectvoorstel				x	x	x	x		
4	Bijlage beschrijving dierproeven initieel				x	x			x	
5	DEC advies			x						
6	Ontvangstbevestiging en factuur				x		x			
7	Verzoek om aanvullende informatie				x		x			
8	Bijlage beschrijving dierproeven aangepast				x	x			x	
9	Adviesnota CCD		x							x
10	Beschikking en vergunning				x		x			



## Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

- U bent van plan om één of meerdere dierproeven uit te voeren.
- Met dit formulier vraagt u een vergunning aan voor het project dat u wilt uitvoeren. Of u geeft aan wat u in het vergunde project wilt wijzigen.
- Meer informatie over de voorwaarden vindt u op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://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   11514 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen																
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table><tr><td>Naam instelling of organisatie</td><td>UMC Utrecht</td></tr><tr><td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td><td>[REDACTED]</td></tr><tr><td>KvK-nummer</td><td>30244197</td></tr><tr><td>Straat en huisnummer</td><td>Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht</td></tr><tr><td>Postbus</td><td>12007</td></tr><tr><td>Postcode en plaats</td><td>3501AA   Utrecht</td></tr><tr><td>IBAN</td><td>NL27INGB0000425267</td></tr><tr><td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td><td>Universiteit Utrecht</td></tr></table>	Naam instelling of organisatie	UMC Utrecht	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]	KvK-nummer	30244197	Straat en huisnummer	Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht	Postbus	12007	Postcode en plaats	3501AA   Utrecht	IBAN	NL27INGB0000425267	Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Utrecht
Naam instelling of organisatie	UMC Utrecht																	
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]																	
KvK-nummer	30244197																	
Straat en huisnummer	Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht																	
Postbus	12007																	
Postcode en plaats	3501AA   Utrecht																	
IBAN	NL27INGB0000425267																	
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Utrecht																	
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[REDACTED]</td></tr><tr><td>Functie</td><td>Senior Scientist</td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>[REDACTED]</td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>[REDACTED]</td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>[REDACTED]</td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	Functie	Senior Scientist	Afdeling	[REDACTED]	Telefoonnummer	[REDACTED]	E-mailadres	[REDACTED]						
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]																	
Functie	Senior Scientist																	
Afdeling	[REDACTED]																	
Telefoonnummer	[REDACTED]																	
E-mailadres	[REDACTED]																	
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[REDACTED]</td><td><input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td></td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td></td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td></td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td></td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie			Afdeling			Telefoonnummer			E-mailadres			
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.																
Functie																		
Afdeling																		
Telefoonnummer																		
E-mailadres																		
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td></td><td><input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td></td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td></td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td></td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td></td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters		<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie			Afdeling			Telefoonnummer			E-mailadres			
(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 - 7 - 2017 |
| Einddatum  | 1 - 7 - 2022 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Synerkines: platform for potential novel anti-inflammatory drugs
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Synerkines: een platform voor potentieel nieuwe medicijnen tegen ontsteking
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- |             |                               |
|-------------|-------------------------------|
| Naam DEC    | DEC Utrecht                   |
| Postadres   | Postbus 85500 3508 GA Utrecht |
| E-mailadres | dec-utrecht@umcutrecht.nl     |

## 4 Betaalgegevens

4.1 Om welk type aanvraag gaat het?  Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 568 Lege

Wijziging € Lege

4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.  Via een eenmalige incasso

Na ontvangst van de factuur

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

## 5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

Projectvoorstel

Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen, indien van toepassing

Melding Machtiging

## 6 Ondertekening

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

Centrale Commissie  
Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondergetekende verklaart:

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

Naam

Functie

Plaats

Datum

Handtekening



## 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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

### 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.
- 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.

Cytokines that control inflammation, such as interleukin-4 (IL-4) or interleukin-10 (IL-10) hold promise for clinical application since they turn off inflammatory cells and inhibit the release and production of multiple mediators such as cytokines, proteases, and oxygen radicals.

The regulatory role of cytokines in inflammation and their involvement in various pathogenic

inflammatory conditions is well described (Becher B et al, Wynn TA et al). More recently the role of cytokines in neuroinflammatory processes was revealed. These studies showed that pro-inflammatory cytokines play a role in persistent pain states and may represent potential therapeutic targets in these conditions (Eijkelkamp et al).

The potency of recombinant cytokines as therapeutics has also been tested before (Asadullah K et al). However, cytokines are, due to their relatively low molecular weight of <20 kDa, known for their limited bioavailability, since proteins smaller than 45 kDa, dependent on their molecular size, are rapidly cleared from the circulation by the kidneys. Besides that, cytokines used as stand-alone drug do not optimally inhibit inflammation; often synergy with other anti-inflammatory cytokines is required. Cytokine pathways are often redundant and the effect of two cytokines might be needed to target this, in order to retrieve the required biological effect. The potential offer by double targeting was recently shown by the promising results achieved with a bispecific monoclonal antibody dupilumab that inhibits both IL-4 and IL-13 (Vatrella A et al).

██████████ a technology platform to solve the limitations of regulatory cytokines, and designed a prototype of a new class of cytokines, called synerkines. Synerkines are ██████████ resulting in improved anti-inflammatory properties and improved bioavailability.

As proof of concept ██████████ an IL4-10 synerkine, and demonstrated that it has full IL-4 and IL-10 activity. It is expected that increasing the molecular weight of the cytokines IL-4 (15 kDa) and IL-10 (a non-covalently linked homo-dimer of 37 kDa) by linking them to each other, will significantly improve bioavailability, since a dimer of the IL4-10 synerkine has a theoretical molecular weight of at least 67 kDa, preventing the synerkine from clearance by the kidney.

The IL4-10 synerkine has been evaluated in several disease models, both *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo*. IL4-10 was shown to inhibit blood-induced cartilage damage *in vitro* showing promise for the treatment for bleeding-associated cartilage damage (van Vulpen et al). Furthermore, IL4-10 demonstrated to exert therapeutic effect in a mouse model of persistent pain, which was shown to be superior as compared to the combination of the single cytokines (Eijelkamp et al). In conclusion, the IL4-10 synerkine has therapeutic potential for the treatment of ██████████ chronic pain, inflammatory diseases or disorders, and related diseases and disorders.

██████████ the synerkine ██████████

Cytokine networks in neuroinflammation.

Becher B, Spath S, Goverman J.

Nat Rev Immunol. 2017 Jan;17(1):49-59. doi: 10.1038/nri.2016.123. Review.

Type 2 cytokines: mechanisms and therapeutic strategies.

Wynn TA.

Nat Rev Immunol. 2015 May;15(5):271-82. doi: 10.1038/nri3831. Review.

IL4-10 Fusion Protein Is a Novel Drug to Treat Persistent Inflammatory Pain.

Eijkelkamp N, Steen-Louws C, Hartgring SA, Willems HL, Prado J, Lafeber FP, Heijnen CJ, Hack CE, van Roon JA, Kavelaars A.

J Neurosci. 2016 Jul 13;36(28):7353-63. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0092-16.2016.

Interleukin-10 Therapy—Review of a New Approach

K. Asadullah, W. Sterry, and H. D. Volk

Pharmacological Reviews June 2003, 55 (2) 241-269.

Dupilumab: a novel treatment for asthma.

Vatrella A, Fabozzi I, Calabrese C, Maselli R, Pelaia G.

J Asthma Allergy. 2014 Sep 4;7:123-30. doi: 10.2147/JAA.S52387. eCollection 2014.

A fusion protein of IL4 and IL10 (IL4-10 synerkine), is very effective in protecting cartilage from blood-induced damage

L.F. van Vulpen, M.E. van Meegeren, C. Steen-Louws, C.E. Hack, S.C. Mastbergen, F.P. Lafeber

Osteoarthritis and Cartilage, April 2014 Volume 22, Supplement, Page S483

### 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 project is to assess the bioavailability of [REDACTED] synerkines, such as IL4-10, compared to the respective cytokines alone, such as recombinant IL-4 and IL-10.

[REDACTED] synerkine [REDACTED] synerkines. [REDACTED] synerkine [REDACTED]

Determination of the plasma half-life of a macromolecule in rats can be considered standard practice and is rather straightforward. In the past we have performed pilot experiments, where we were able to specifically detect human synerkines and the individual cytokines in rat plasma.

The development of synerkines within our institute is being led by an expert immunologist with an outstanding academic track record in the field of inflammation who has also gathered ample experience in development of therapeutic proteins. We have extensive diverse collaborations with researchers within and outside the UMCU. Via these researchers we have access to a network of clinicians.

### 3.3 Relevance

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

Existing drugs are not always effective in patients suffering from auto-immune or inflammatory diseases indicating the medical need to develop novel, potent and safe anti-inflammatory drugs. A group of patients with e.g. inflammatory pain or neurological persistent pain, currently receives treatment for pain-relief, since no treatment options for the underlying disease are available. Synerkines, based on endogenous natural anti-inflammatory molecules, may represent those novel drugs. Scientifically it will also add to our knowledge. [REDACTED] synerkine [REDACTED]

### 3.4 Research strategy

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

#### A. Generation and *in vitro* characterisation of the synerkines

Cytokines with a well-defined biological function are combined in a novel format using a linker sequence, termed synerkines. Synerkines are produced in recombinant expression systems and are extensively characterized biochemically as well as in a variety of *in vitro* functional assays using (isolated) human cells or tissue (for instance using blood from healthy donors). The biological activity of the individual cytokines within the synerkines will be assessed and compared to combinations of equal amounts of the cytokines. [REDACTED] synerkines [REDACTED]

#### B. Bioavailability of synerkines in rats

The bioavailability of the [REDACTED] synerkines and [REDACTED] will be tested in rats. To this end rats will be injected with synerkines using different routes of administration and the concentration of synerkines will be determined in serial plasma samples. The bioavailability of synerkines will directly be compared to individual cytokines making up the synerkine. It is expected that the increase of molecular

size will translate to a better bioavailability because of decreased filtration via the kidney. In pilot experiments using single injection we will test the effect of different administration routes. Next, we will test repeated injection of synerkines.

[redacted] synerkines [redacted]

Whenever possible we will test the cross-reactivity of the human cytokines with rat cytokine receptors. It is expected that binding to cellular receptors will only have a minor effect on the bioavailability.

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.

**A. Generation and *in vitro* characterisation of the synerkines**

No animal procedures will be involved.

**B. Bioavailability of synerkines in rats**

Injection of pre-treatment and/or withdrawal of blood samples (time point zero). Single or multiple injection of synerkines (i.v., i.p., s.c., intraarticular, intracranial, intrathecal), repeated blood withdrawal at multiple time points to assess circulating synerkine levels. In case of repeated blood withdrawal within a short period of time rats will be cannulated and anesthetized. At the end of the experiment organs will be collected to analyse distribution of cytokines in the different compartments.

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.

We plan to study the bioavailability of the IL4-10 synerkine [redacted] synerkines [redacted]. Generation and *in vitro* characterization of the biological activity of [redacted] synerkine (described in part A) is a prerequisite to proceed with the *in vivo* studies. Only synerkines that show biological activity *in vitro* will be tested bioavailability studies (part B).

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	Bioavailability of synerkines
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	





## Appendix

### Description animal procedures

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

#### 1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	11500	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	UMC Utrecht	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
	1	Bioavailability of synerkines

*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.

The aim of these experiments is to assess the bioavailability of [REDACTED] synerkines in rats. The primary outcome parameter will be concentration of synerkine and individual cytokines measured in rat plasma.

The bioavailability of synerkines will be compared to the bioavailability of the individual cytokines. [REDACTED] synerkine [REDACTED] will be injected in wild type rats using different routes. At different time points after injection, blood will be withdrawn, plasma or serum will be isolated and the concentration of the synerkine or cytokines will be measured. The pore size of the filtration barrier in the kidneys of humans and rats is compatible, therefore the bioavailability of synerkines in rats can be used to predict their behavior in humans. However, [REDACTED], and the contribution of this to the clearance pattern depends on how strongly human synerkines bind to the respective rat cytokine receptors. To test the involvement of receptors that are involved in clearance of synerkines [REDACTED], some animals will be pre-treated with [REDACTED]

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

Blood withdrawal to collect pre-sample, injection of pre-treatment (optional). Injection of [REDACTED] synerkines [REDACTED] or individual cytokines (subcutaneous, intravenous, intraperitoneal, intrathecal, intra-articular). Blood withdrawal (max 150ul / time point) will be carried out at different time points, but in total max 8 times. Three rats will be used per time point. Alternated rats will be used to avoid too frequent blood withdrawal. The maximal amount of blood withdrawn will always

remain below 8mL/kg in a period of 2 weeks. At the end of the experiment rats will be euthanized and organs will be removed for analysis of the biodistribution of synerkines.

Depending on the plasma half-life of the synerkine the time points for blood withdrawal vary. For example the optimal time points to determine the plasma half-life of synerkines with [REDACTED] would be 5', 10', 15', 20', 30', 1h and 2h. For such short term experiments (less than 2 hours) involving repeated blood withdrawal, rats will be anesthetized with 2.5% isoflurane and the tail vein will be cannulated (using Abocath).

To study the bioavailability of synerkines [REDACTED], rats will be followed for a longer period (up to 4 weeks) and blood will be collected. In case of less frequent sampling time points we will consider using a recently described blood withdrawal technique (using a "vlindernaald", see link below). <http://www.ivd-utrecht.nl/nl/goede-voorbeelden/bloedafnametechniek-verfijnt-dierproef-rat/#%20Bloedafnametechniek%20verfijnt%20dierproef%20rat>.

The optimal time points for blood withdrawal for [REDACTED] synerkine will be determined in pilot experiments. Usually the distribution of proteins is characterised by a distribution phase ( $t_{1/2\alpha}$ ) and an elimination phase ( $t_{1/2\beta}$ ). Based on the pilot experiments for [REDACTED] synerkine we will adjust blood withdrawal in the subsequent experiments so that sufficient sampling time points will fall in the expected phases enabling accurate determination of these values.

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

Statistical analysis is generally not used in PK studies. After each experiment we will critically evaluate the variation, the optimal time points for blood withdrawal and the group sizes in order to gather meaningful results with the least amount of rats possible. Previous experiments using IL4-10 synerkine suggest that at least three animals per time point is needed for reliable results.

## **B. The animals**

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

Wistar Crl:WI rats (male or female) obtained from Charles River (or other registered commercial breeder within the EU) will be used. Adult rats will be used (between 8 and 20 weeks). Three rats will be bled per time point, so at least 6 animals will be used per group, this is based on our previous experience. Rats are generally accepted as models for PK studies in humans. The reason for this is that the rats are large enough for repeated blood withdrawal and the biodistribution of most drugs in rats accurately predicts their characteristics in humans.

We plan to test [REDACTED] synerkines: IL4-10 [REDACTED] synerkines. [REDACTED] synerkine [REDACTED]. Additionally, mouse, rat and canine variants of the synerkines could be tested to complement efficacy studies in the respective animal models.

The approximate design of a typical series of experiments for one synerkine would look as follows.

### **Experiment 1**

#### Aim

To test improved bioavailability of IL4-10 compared to individual cytokines after i.v. injection.

#### Setup

Group A: recombinant IL-4

Group B: recombinant IL-10

Group C: IL4-10 (dose 1)

Group D: IL4-10 (dose 2)

Three rats per time point, 6 rats per group, 24 rats per experiment.

#### Expected outcomes

→ Improved bioavailability by synerkine compared to individual cytokines.

→ Optimal dose and sampling time points will be determined.

## Experiment 2

### Aim

To test bioavailability of [redacted] and bioavailability after s.c. injection.

### Setup

Group A: IL4-10 i.v.

Group B: IL4-10 ([redacted])

Group C: IL4-10 ([redacted])

Group D: IL4-10 s.c.

Three rats per time point, 6 rats per group, 24 rats per experiment.

### Expected outcomes

→ Detection of [redacted] bioavailability by [redacted] synerkines [redacted] synerkine.

→ Bioavailability after s.c. injection.

## Experiment 3

### Aim

To provide evidence for altered clearance rates. [redacted] that thought to be involved in clearance of synerkines [redacted] before the experiment (pre-treatment).

### Setup

Group A: IL4-10 [redacted] i.v.

Group B: IL4-10 [redacted] i.v. + pretreatment

Group C: IL4-10 [redacted] i.v.

Group D: IL4-10 [redacted] i.v. + pretreatment

Three rats per time point, 6 rats per group, 24 rats per experiment.

### Expected outcomes

→ The mechanism underlying altered bioavailability by [redacted] synerkines is unravelled.

## Experiments 4-7

Additional experiments using altered time points for blood withdrawal, different route of administration, different dose, using [redacted]. Based on the outcome of experiments 1-3, we will consult with the IvD about the exact design of these follow up experiments and these will be described in detail in the work protocol.

We would like to stress that we do not expect that for [redacted] synerkine variant after each experiment it will be evaluated whether further studies are necessary. [redacted]

[redacted] synerkine [redacted]

We expect that we will perform maximal 8 experiments per year (192 rats per year).

Therefore we expect that we will use maximally 960 rats in the coming 5 years.

## C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

## D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement: The bioavailability of macromolecules is influenced by a wide range of factors, including but not limited to size of the molecule, charge, [redacted] etc.

Therefore it is not possible to accurately predict the behaviour [REDACTED] synerkines *in vivo* based on only *in vitro* studies. We will perform extensive analysis *in vitro* on [REDACTED] synerkine before proceeding to the *in vivo* experiments. To be able to perform human studies a clean synerkine batch should be produced which is out of scope of the current study.

**Reduction:** Based on our previous experience we expect that three animals per time point is sufficient to obtain reliable results. Nevertheless, after each experiment we will evaluate the group sizes. We will also critically look at the data and in case of no improvement by [REDACTED] synerkine [REDACTED] compared to the individual cytokines the experiment will not be repeated.

**Refinement:** The pharmacokinetics of proteins in rats is well accepted and yield relatively robust data. All experiments will be carried out by experienced technicians or researchers.

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

Animals will be kept in groups wherever possible. For short term experiment, animals will be anesthetized during the entire experiment. All handlings will be performed by experienced animal technicians or researchers.

## 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.

For short term experiments (less than 2 hours) involving repeated blood withdrawal, rats will be anesthetized with 2.5% isoflurane and the tail vein will be cannulated (using Abocath)

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

### **I. Other aspects compromising the welfare of the animals**

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

We do not expect any adverse effect on the animals' welfare based on some limited previous experiments.

Explain why these effects may emerge.

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.

It is not likely but we cannot rule out that in studies after the injection of synerkines antibodies are formed against the synerkines, which upon repeated injection may cause anaphylactic reaction. We will assess the generation of antibodies after single injection. When repeated injection of synerkines will be applied, animals will be carefully monitored for signs of anaphylaxis (e.g. fast breathing). Such reaction will be considered a humane end point.

Indicate the likely incidence.

Less than 5%.

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

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

Injection of synerkines represents mild discomfort. Repeated blood withdrawal represents mild discomfort.

We expect that most animals (80%) will experience mild discomfort despite the combination of procedures. In the rest of the rats, e.g. when pretreatment will be applied or when animals are bled for the assessment of antibody titers, the cumulative discomfort may be moderate.

## **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.

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

#### **A. Algemene gegevens over de procedure**

1. Aanvraagnummer : DEC 2017.II.514.013
2. Titel van het project : Synerkines: novel anti-inflammatory drugs to inhibit immunopathology and (inflammatory) pain.
3. Titel van de NTS : Synerkines: een platform voor potentieel nieuwe medicijnen tegen ontsteking.

4. Type aanvraag:

- nieuwe aanvraag projectvergunning
- wijziging van vergunning met nummer :

5. Contactgegevens DEC

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

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

- ontvangen door DEC: 07-04-2017
- aanvraag compleet:
- in vergadering besproken: 19-4-2017
- anderszins behandeld:
- termijnonderbreking(en) van / tot : 25-04-2017 / 05-05-2017
- besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
- aanpassing aanvraag:
- advies aan CCD: 08-05-2017

7. De aanvraag is afgestemd met de IvD en deze is hiermee akkoord.

8. Eventueel horen van aanvrager

- niet van toepassing

9. Correspondentie met de aanvrager

- Datum vragen: 25-04-2017
- Datum antwoord: 05-05-2017
- Gestelde vragen en antwoorden:

Projectvoorstel

- 3.2 Doel: Het is de DEC niet helder waarop de keuze berust voor het testen van de biologische beschikbaarheid van ██████████ synerkines. Is dat op basis van capaciteit?

*The IL4-10 synerkine, which is in detail discussed in our application, is the furthest developed synerkine variant. Based on the promising results with this molecule we have initiated development of [REDACTED]. These are either being developed or will be developed. The [REDACTED] synerkine is indeed mainly based on the [REDACTED] of our group to [REDACTED] [REDACTED] and in vitro characterize the different synerkine variants in the coming 5 years.*

- 3.4 Onderzoeksstrategie: Wat is het criterium voor de biologische activiteit van het gemaakte synerkine op grond waarvan u beslist tot het doen van de in vivo proeven?  
*All the synerkines were and will be extensively tested in vitro in different potency assays before being used in in vivo experiments. Any given synerkine should demonstrate biological activity in vitro of both cytokines and this activity should at least be comparable to the activity of one of the individual cytokines alone. The reason for this criteria is that by expressing two individual cytokines in the form of a fusion protein (synerkine) it is possible that the [REDACTED] [REDACTED]. Likewise, the [REDACTED] binding to the responsible [REDACTED] may be affected. This could result in a decreased biological functions of one of the cytokines in the synerkine. However even when the biological effect of a given synerkine in vitro is comparable to one of the single cytokines, better in vivo efficacy is expected due to the improved bioavailability caused by the increase of the molecular weight.*

#### Bijlage 1:

- Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Het is de DEC niet helder hoe u aan de aantallen komt. De DEC zou graag meer inzicht krijgen in de berekening van het aantal benodigde dieren. Ook mist de ratio voor de factor 3 en vraagt de DEC zich af of u niet te weinig dieren aanvraagt.  
*What we provided in Attachment 1 are example experiments to illustrate the approach we plan to use to systematically assess the bioavailability of the generated synerkines. The setup of experiments 1 to 3 are provided and the following experiments will be designed based on the outcome of these studies. We may decide to omit or include groups. Should any given synerkine variant show no improved bioavailability compared to the individual cytokine, the in vivo experiments with that variant will be terminated.*

#### Niet Technische Samenvatting

- 4.1 Vervanging: De zin: "Bovendien zouden we daarvoor over zeer schone preparaten van het synerkine moeten beschikken en dat is niet praktisch haalbaar voor de verschillende varianten". Deze formulering suggereert dat je in dieren wel vieze preparaten kunt gebruiken. Graag herformuleren.  
*We apologize for the unfortunate formulation. Generally the quality of candidate drugs which are injected into healthy human volunteers is substantially higher than the quality of compounds used for preclinical mouse studies. For humans GMP-compatible production of the synerkine would be required which is way out of the scope of this proof-of-concept study (especially*

considering [REDACTED]). Obviously, all the synerkines will be produced aseptically in [REDACTED], sterile filtered and subjected to extensive quality control (i.e. SDS-PAGE, HPLC, stress test, activity assays). The text is adjusted in the NTS.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

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

- nvt

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

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

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

1. De aanvraag is toetsbaar en heeft voldoende samenhang. Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en een helder geformuleerd resultaat, waarbij de projectbeschrijving en de bijlage beschouwd kunnen worden als één projectaanvraag. De voorgestelde experimenten zijn naar de mening van de commissie logisch en helder opgeschreven en beargumenteerd en zijn nodig om het beoogde concrete resultaat te bereiken. Alle stappen in het project zijn voldoende uitgewerkt, met duidelijke uitkomstparameters en bevatten geen onzekerheden. Gezien bovenstaande is de DEC van oordeel dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft. De aanvraag komt qua structuur overeen met voorbeeld 4B uit de "Handreiking Invulling Definitie Project".
2. Voor zover de DEC bekend, is er geen tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de dierexperimenten in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie sluit aan bij de hoofddoelstelling.

#### *Belangen en waarden*

4. De DEC is daarom van mening dat er in voldoende mate een relatie is tussen het directe doel en het uiteindelijke doel.
5. De belangrijkste belanghebbenden in dit onderzoeksproject zijn: de proefdieren, het onderzoeksveld, patiënten die leiden aan onstekings ziekten en de samenleving. De morele waarden die voor proefdieren in het geding zijn: de integriteit van de ratten zal worden aangetast omdat stoffen worden toegediend, bloed wordt afgenomen en uiteindelijk het dier zal worden gedood. Het onderzoeksveld zal meer kennis verkrijgen in de biobeschikbaarheid en



het werkingsmechanisme van synerkines (twee aan elkaar gekoppelde cytokines) die uiteindelijk in de mens op werkzaamheid zullen worden onderzocht. De wetenschappelijke status is van belang voor het onderzoeksveld, maar dient naar de mening van de DEC geen rol te spelen in de ethische afweging over de toelaatbaarheid van het gebruik van proefdieren. De morele waarden die voor de patiënten leidend aan ontstekingsziekten zoals auto-immuunziekten bevorderd worden: op korte termijn kan hun gezondheid en lichamelijke conditie worden verbeterd en de pijn worden verminderd indien synerkines toepasbaar blijken te zijn. Deze therapie zal daardoor een significantie bijdrage kunnen leveren aan de morbiditeit en de kwaliteit van leven van de patiënten die leiden aan ontstekingsziekten zoals auto-immuunziekten. De samenleving heeft baat bij dit onderzoek omdat deze nieuwe behandelmethode de ziekte in de kern aanpakt en bij succesvolle behandeling enorme kosten bespaart op ziektekosten.

6. De aanvrager geeft niet aan nadelige effecten op het milieu te verwachten. De DEC ziet geen aanleiding om aan te nemen dat zich toch nadelige effecten zullen voordoen.

#### *Proefopzet en haalbaarheid*

7. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd en dragen eraan bij dat de doelstellingen behaald kunnen worden, dat aan de 3V-beginselen voldaan kan worden en dat voorkomen kan worden dat mens, dier en milieu negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven. De onderzoeksgroep heeft ruime ervaring met deze modellen en de beschreven read-out parameters en met significante publicaties op dit gebied. De groep heeft veel samenwerkingen met onderzoekers (zowel biomedici als clinici) binnen en buiten het UMCU op het gebied van ontstekingsziekten. De eerste 2 series experimenten moeten bio-beschikbaarheid via twee verschillende toedieningsroutes in de juiste dosering opleveren. Het laatste experiment zal het mechanisme achter het gebruik van de synerkines ontrafelen.
8. Het project is goed opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten logisch en helder aan bij de aangegeven doelstellingen en de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Daar dit een samenwerkingsproject betreft, geeft het voor de DEC aan dat het een haalbaar project is en er al een beoordeling over de haalbaarheid heeft plaatsgevonden.

#### *Welzijn dieren*

9. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
  - Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
  - Niet-menselijke primaten (10e)
  - Dieren in/uit het wild (10f)
  - Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I EU richtlijn)

- Zwerfdieren (10h)
- Hergebruik (1e lid 2)
- Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
- Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
- Dodingsmethode niet volgens bijlage IV EU richtlijn (13c lid 3)

Alle dieren worden betrokken van erkende fokkers of in huis gefokt, er is geen sprake van afwijkende huisvesting en/of hergebruik of gebruik van bedreigde diersoorten of in het wild gevangen dieren. De toegepaste methoden voor anesthesie en euthanasie zijn conform de richtlijn.

10. De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de EU richtlijn. De proefdierfaciliteiten voldoen aan het gestelde in de richtlijn en betrokken medewerkers (dierverzorgers, biotechnici en onderzoekers) zijn allen bevoegd en bekwaam.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. De experimentele dieren ontvangen een injectie met een synerkine of een controle middel waarna er op regelmatige tijden bloed wordt afgenomen al dan niet onder terminale anesthesie. De meerderheid van de dieren (80%) ondervindt daarbij mild ongerief en een klein deel (20%) matig. De DEC vindt de inschatting van het ongerief in overeenstemming met het ongerief zoals dat is ingeschat door de onderzoekers.
12. De integriteit van de dieren wordt fysiek aangetast door de handelingen die worden uitgevoerd, zoals het toedienen van de syberkines of vehicula als controle, het afnemen van bloedmonsters om het gehalte synerkine te bepalen en uiteindelijk de euthanasie voor het verkrijgen van weefsels.
13. De humane eindpunten zijn in de bijlage dierproeven goed gedefinieerd en het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt bereikt is goed ingeschat: wat eventueel aanleiding kan zijn tot dusdanig lijden van het dier dat verder lijden moet worden voorkomen door het toepassen van een humaan eindpunt, zoals onverwachte bijeffecten van de herhaald toedienen van een synerkine en het optreden van een anafylactische shock hetgeen overigens niet wordt verwacht. De humane eindpunten zijn helder beschreven en ook voor de biotechnici te interpreteren en toe te passen.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Een bio-beschikbaarheids onderzoek is in vitro niet na te bootsen evenmin als de farmaco-kinetiek en farmaco-dynamiek, waardoor het metabole systeem van een zoogdier noodzakelijk is. Het geheel van biologische systemen is nog niet in vitro na te bootsen.

15. Het aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en er is een heldere strategie om ervoor te zorgen dat tijdens het project met het kleinst mogelijke aantal dieren wordt gewerkt waarmee nog een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Voor alle bijlagen is een correcte berekening gemaakt en volgens gangbare statistische methoden berekend voor de experimenten.
16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project is zodanig opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. De onderzoekers beschikken over meer dan ruime ervaring met alle uit te voeren handelingen. Daar waar, tijdens de studie door voortschrijdend inzicht, experimentele condities kunnen worden geoptimaliseerd (bv. dosis, tijdschema, groepsgrootte), zal dat worden toegepast.
17. Er is geen sprake van wettelijk vereist onderzoek.

*Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef*

18. Dieren van beide geslachten zullen in gelijke mate worden ingezet voor alle experimenten. De aanvrager heeft dit in voldoende mate wetenschappelijk onderbouwd. De aantallen zijn gebaseerd op aantallen dieren waarvan in de tijd bloed moet worden afgenomen en gebaseerd op eerdere ervaringen. De DEC is er van overtuigd dat de aanvrager in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd dat het, om de doelstellingen te bereiken, noodzakelijk is om de proeven dieren uit te voeren waarbij beide geslachten kunnen worden gebruikt.
19. De dieren worden in het kader van het project gedood. De dieren die voor de experimenten worden gebruikt worden gedood omdat na afloop van het experiment de organen moeten worden uitgenomen voor verdere analyse. De dieren worden volgens een, bijlage IV van de EU richtlijn, passende methode gedood.
20. Omdat in het projectvoorstel de ratten moeten worden gedood is de vraag over herplaatsing/hergebruik niet van toepassing.

*NTS*

21. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd.

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

1. De morele vraag die de DEC dient te beantwoorden is: rechtvaardigt het onderzoek naar de bio-beschikbaarheid van synerkines (met als doel in humane patiënten gebruikt te kunnen worden bij ontstekingsziekten zoals auto-immuunziekten) het gebruik van proefdieren op een

manier die de onvermijdelijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de gebruikte proefdieren kan rechtvaardigen.

2. Er vindt voor 80% van de proefdieren een beperkte aantasting van welzijn en integriteit plaats, met maximaal licht ongerief en voor een kleiner deel van de proefdieren vindt een redelijke aantasting van welzijn en integriteit, met maximaal matig ongerief. Maar de waarde voor de doelgroep (de patiënten) is groot.

Indien de hierboven genoemde doelstellingen behaald worden, dan zal dit project er toe bijdragen dat een grote groep patiënten die nu nog leiden aan de gevolgen van auto-immuunziekten beter geholpen kunnen worden met specifiekere middelen met minder bijwerkingen. Het is aannemelijk dat de translationele doelstelling behaald zal worden, omdat bij het vaststellen van goede bio-beschikbaarheid in vivo in een zoogdier de overstap naar verder onderzoek in de mens in principe plaats kan vinden. Daarvoor is de inzet van proefdieren noodzakelijk, maar de onderzoekers doen al het mogelijke om het ongerief voor de dieren en het aantal dieren tot een minimum te beperken.

3. Op grond van het bovenstaande is de DEC van oordeel dat de doelstelling van dit project een essentieel belang vertegenwoordigt en dat dit essentiële belang opweegt tegen de beperkte aantasting van het welzijn en de integriteit van de proefdieren. Het project is helder beschreven en de DEC is van mening dat de voorgestelde experimenten en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstelling en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak zullen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van dit project. De DEC is verder van mening dat de onderzoeksgroep meer dan voldoende ervaring heeft om met dit project de doelstelling te behalen met in acht neming van de 3 V's. De DEC onderschrijft daarmee dat het gestelde doel niet zonder gebruik van proefdieren is te behalen. Het gebruik van de proefdieren zoals beschreven in de aanvraag is daarmee gerechtvaardigd.

## **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.

De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.
3. Er zijn geen knelpunten/dilemma's naar voren gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht  
Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht  
Postbus 12007  
3501 AA UTRECHT



**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  
AVD1150020171744  
**Bijlagen**  
2

Datum 17 mei 2017  
Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht ,

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 16 mei 2017. Het gaat om uw project "Synerkines: platform for potential novel anti-inflammatory drugs". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1150020171744. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

#### **Wacht met de uitvoering van uw project**

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

#### **Factuur**

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

**Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

**Datum:**

17 mei 2017

**Aanvraagnummer:**

AVD1150020171744

**Datum:**  
17 mei 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD1150020171744

### **Gegevens aanvrager**

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 11500  
Naam instelling of organisatie: UMC Utrecht  
KvK-nummer: 30244197  
Postbus: 12007  
Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT  
IBAN: NL27INGB0000425267  
Tenaamstelling van het rekeningnummer: Universiteit Utrecht

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam:   
Functie: Senior Scientist  
Afdeling:   
Telefoonnummer:   
E-mailadres: 

**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:**

17 mei 2017

**Aanvraagnummer:**

DEC150020171744

**Over uw project**

Geplande startdatum: 1 juli 2017

Geplande einddatum: 1 juli 2022

Titel project: Synerkines: platform for potential novel anti-inflammatory drugs

Titel niet-technische samenvatting: Synerkines: een platform voor potentieel nieuwe medicijnen tegen ontsteking

Naam DEC: DEC Utrecht

Postadres DEC: Postbus 85500 3508 GA Utrecht

E-mailadres DEC: dec-utrecht@umcutrecht.nl

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 1035,-

De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**Verplichte bijlagen:  Projectvoorstel  
 Beschrijving Dierproeven  
 Niet-technische samenvattingOverige bijlagen:  DEC-advies**Ondertekening**

Naam:

Functie: decaan

Plaats: Utrecht

Datum: 15 mei 2017





> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UU-ASC  
Instantie voor dierenwelzijn  
Postbus 80.011  
3508 Ta UTRECHT  


**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  
AVD1150020171744  
**Bijlagen**  
2

Datum 17 mei 2017  
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**  
Factuurdatum: 17 mei 2017  
Vervaldatum: 16 juni 2017  
Factuurnummer: 171744  
Ordernummer: CB. 841910.3.01.011

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD1150020171744	€ 1035,-

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL29INGB 070.500.1512 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93144, 2509 AC te 's Gravenhage.

**Van:** [REDACTED]  
**Verzonden:** maandag 29 mei 2017 10:46  
**Aan:** 'Info-zbo'  
**CC:** info@ivd-utrecht.nl  
**Onderwerp:** RE: vragen bij de behandeling van AVD11500201744  
**Bijlagen:** 2017 05 29 appendix-description-animal-procedures-1.3 synerkines (K).docx

**Categorieën:** Dossier: [REDACTED]

Geachte [REDACTED],  
 hierbij onze antwoorden op de vragen van de CCD  
 -naar mij weten is punt L volledig ingevuld in de bijlage. Echter, bij punt K ontbrak de tekst wegens een softwarefout in de document. Ik heb nu alle tekst naar een lege bijlage gekopieerd en punt K op z'n plek ingevuld.

[REDACTED] is nu verwijderd van de bijlage.

-Mannen en vrouwen zijn in principe beide geschikt voor deze experimenten, want we verwachten geen effect van het geslacht op de uitkomst parameters. Wij gaan binnen een experiment alleen mannen of vrouwtjes gebruiken om de variatie te verkleinen. Ik heb hierover een extra zin in de bijlage gezet (bij punt B).

-In silico modeling voordat de PK studies worden ingezet is geen onderdeel van onze onderzoekstrategie. De synerkines zijn nieuwe moleculaire entities en hun PK kan niet op voorhand worden voorgespeeld.

Met vriendelijke groeten,  
 [REDACTED]

---

**From:** Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]  
**Sent:** dinsdag 23 mei 2017 15:15  
**To:** [REDACTED].  
**Cc:** [info@ivd-utrecht.nl](mailto:info@ivd-utrecht.nl)  
**Subject:** vragen bij de behandeling van AVD11500201744

Geachte [REDACTED],

U heeft bij de CCD een aanvraag tot projectvergunning ingediend. Bij de behandeling hiervan hebben wij nog een aantal vragen. Het betreft uw project: 'Synerkines: platform for potential novel anti-inflammatory drugs' met aanvraagnummer AVD1150020171744.

Kunt u in de bijlage dierproeven de informatie onder punt L. volledig invullen?

In de bijlage dierproeven beschrijft u onder punt B, [REDACTED]. Kunt u de relevantie van deze opmerking toelichten in relatie tot de aangevraagde dierproeven of deze verwijderen?

Hoe gaat u om met het inzetten van beide geslachten dieren voor dit project? U beschrijft nu: mannen OF vrouwen.

Is in silico modelling voordat de PK studies worden ingezet een onderdeel van uw projectstrategie?

Uw aanvraag zal op 2 juni door de CCD in de vergadering besproken worden, het zou fijn zijn als we uw antwoorden dan hebben ontvangen,

Vriendelijke groet, [REDACTED]

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

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

T: 0900 2800028

E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl) (let op: nieuw emailadres!)

*Denk s.v.p aan het milieu voor u deze e-mail afdrukt.*

---

*This message may contain confidential information and is intended exclusively for the addressee. If you receive this message unintentionally, please do not use the contents but notify the sender immediately by return e-mail. University Medical Center Utrecht is a legal person by public law and is registered at the Chamber of Commerce for Midden-Nederland under no. 30244197.*

*Please consider the environment before printing this e-mail.*



## Appendix

### Description animal procedures

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

#### 1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	11500	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	UMC Utrecht	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
	1	Bioavailability of synerkines

*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.

The aim of these experiments is to assess the bioavailability of ██████████ synerkines in rats. The primary outcome parameter will be concentration of synerkine and individual cytokines measured in rat plasma.

The bioavailability of synerkines will be compared to the bioavailability of the individual cytokines. ██████████ synerkine ██████████ will be injected in wild type rats using different routes. At different time points after injection, blood will be withdrawn, plasma or serum will be isolated and the concentration of the synerkine or cytokines will be measured. The pore size of the filtration barrier in the kidneys of humans and rats is compatible, therefore the bioavailability of synerkines in rats can be used to predict their behavior in humans. However, bioavailability may also be influenced by ██████████, and the contribution of this to the clearance pattern depends on how strongly ██████████ synerkines bind to the ██████████. To test the involvement of receptors that are involved in clearance of synerkines ██████████, some animals will be pre-treated with agents that ██████████

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

Blood withdrawal to collect pre-sample, injection of pre-treatment (optional). Injection of ██████████ synerkines ██████████ or individual cytokines (subcutaneous, intravenous, intraperitoneal, intrathecal, intra-articular). Blood withdrawal (max 150ul / time point) will be carried out at different time points, but in total max 8 times. Three rats will be used per time point. Alternated rats will be used to avoid too frequent blood withdrawal. The maximal amount of blood withdrawn will always remain below 8mL/kg in a period of 2 weeks. At the end of the experiment rats will be euthanized and

organs will be removed for analysis of the biodistribution of synerkines.

Depending on the plasma half-life of the synerkine the time points for blood withdrawal vary. For example the optimal time points to determine the plasma half-life of synerkines with a [REDACTED] would be 5', 10', 15', 20', 30', 1h and 2h. For such short term experiments (less than 2 hours) involving repeated blood withdrawal, rats will be anesthetized with 2.5% isoflurane and the tail vein will be cannulated (using Abocath).

To study the bioavailability of synerkines [REDACTED], rats will be followed for a longer period (up to 4 weeks) and blood will be collected. In case of less frequent sampling time points we will consider using a recently described blood withdrawal technique (using a "vlindernaald", see link below). <http://www.ivd-utrecht.nl/nl/goede-voorbeelden/bloedafnametechniek-verfijnt-dierproef-rat/#%20Bloedafnametechniek%20verfijnt%20dierproef%20rat>.

The optimal time points for blood withdrawal for [REDACTED] synerkine will be determined in pilot experiments. Usually the distribution of proteins is characterised by a distribution phase ( $t_{1/2\alpha}$ ) and an elimination phase ( $t_{1/2\beta}$ ). Based on the pilot experiments for [REDACTED] synerkine we will adjust blood withdrawal in the subsequent experiments so that sufficient sampling time points will fall in the expected phases enabling accurate determination of these values.

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

Statistical analysis is generally not used in PK studies. After each experiment we will critically evaluate the variation, the optimal time points for blood withdrawal and the group sizes in order to gather meaningful results with the least amount of rats possible. Previous experiments using IL4-10 synerkine suggest that at least three animals per time point is needed for reliable results.

## **B. The animals**

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

Wistar Crl:WI rats (male or female) obtained from Charles River (or other registered commercial breeder within the EU) will be used. Either males or females only will be used for a single experiment to reduce variation. Adult rats will be used (between 8 and 20 weeks). Three rats will be bled per time point, so at least 6 animals will be used per group, this is based on our previous experience. Rats are generally accepted as models for PK studies in humans. The reason for this is that the rats are large enough for repeated blood withdrawal and the biodistribution of most drugs in rats accurately predicts their characteristics in humans.

We plan to test [REDACTED] synerkines: IL4-10 [REDACTED] synerkines. [REDACTED] synerkine [REDACTED].

The approximate design of a typical series of experiments for one synerkine would look as follows.

### **Experiment 1**

#### Aim

To test improved bioavailability of IL4-10 compared to individual cytokines after i.v. injection.

#### Setup

Group A: recombinant IL-4

Group B: recombinant IL-10

Group C: IL4-10 (dose 1)

Group D: IL4-10 (dose 2)

Three rats per time point, 6 rats per group, 24 rats per experiment.

#### Expected outcomes

→ Improved bioavailability by synerkine compared to individual cytokines.

→ Optimal dose and sampling time points will be determined.

### **Experiment 2**

#### Aim

To test bioavailability of [REDACTED] and bioavailability after s.c. injection.

Setup

Group A: IL4-10 i.v.

Group B: IL4-10 [REDACTED]

Group C: IL4-10 [REDACTED]

Group D: IL4-10 s.c.

Three rats per time point, 6 rats per group, 24 rats per experiment.

Expected outcomes

→ Detection of altered bioavailability by [REDACTED] synerkines [REDACTED] synerkine.

→ Bioavailability after s.c. injection.

**Experiment 3**

Aim

To provide evidence for [REDACTED] clearance rates. [REDACTED] that thought to be involved in clearance of synerkines [REDACTED] before the experiment (pre-treatment).

Setup

Group A: IL4-10 ([REDACTED]) i.v.

Group B: IL4-10 ([REDACTED]) i.v. + pretreatment

Group C: IL4-10 ([REDACTED]) i.v.

Group D: IL4-10 ([REDACTED]) i.v. + pretreatment

Three rats per time point, 6 rats per group, 24 rats per experiment.

Expected outcomes

→ The mechanism underlying [REDACTED] bioavailability by [REDACTED] synerkines is unravelled.

**Experiments 4-7**

Additional experiments using altered time points for blood withdrawal, different route of administration, different dose, using [REDACTED]. Based on the outcome of experiments 1-3, we will consult with the IvD about the exact design of these follow up experiments and these will be described in detail in the work protocol.

We would like to stress that we do not expect that for [REDACTED] synerkine [REDACTED] after each experiment it will be evaluated whether further studies are necessary. [REDACTED]

[REDACTED] synerkine [REDACTED]

We expect that we will perform maximal 8 experiments per year (192 rats per year).

Therefore we expect that we will use maximally 960 rats in the coming 5 years.

**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.

Can we reuse animals?

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

No

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

**D. Replacement, reduction, refinement**

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

Replacement: The bioavailability of macromolecules is influenced by a wide range of factors, including but not limited to size of the molecule, charge, [REDACTED] etc. Therefore it is not possible to accurately predict the behaviour of [REDACTED] synerkines *in vivo* based on only *in vitro* studies. We will perform extensive analysis *in vitro* on [REDACTED] synerkine before proceeding to the *in vivo* experiments. To be able to perform human studies a clean synerkine batch

should be produced which is out of scope of the current study.

**Reduction:** Based on our previous experience we expect that three animals per time point is sufficient to obtain reliable results. Nevertheless, after each experiment we will evaluate the group sizes. We will also critically look at the data and in case of no improvement by ■■ synerkine ■■■■ compared to the individual cytokines the experiment will not be repeated.

**Refinement:** The pharmacokinetics of proteins in rats is well accepted and yield relatively robust data. All experiments will be carried out by experienced technicians or researchers.

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

Animals will be kept in groups wherever possible. For short term experiment, animals will be anesthetized during the entire experiment. All handlings will be performed by experienced animal technicians or researchers.

## 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.

For short term experiments (less than 2 hours) involving repeated blood withdrawal, rats will be anesthetized with 2.5% isoflurane and the tail vein will be cannulated (using Abocath).

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

### **I. Other aspects compromising the welfare of the animals**

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

We do not expect any adverse effect on the animals' welfare based on some limited previous experiments.

Explain why these effects may emerge.

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.

It is not likely but we cannot rule out that in studies after the injection of synerkines antibodies are formed against the synerkines, which upon repeated injection may cause anaphylactic reaction. We will assess the generation of antibodies after single injection. When repeated injection of synerkines will be applied, animals will be carefully monitored for signs of anaphylaxis (e.g. fast breathing). Such reaction will be considered a humane end point.

Indicate the likely incidence.

Less than 5%.

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

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

Injection of synerkines represents mild discomfort. Repeated blood withdrawal represents mild discomfort. We expect that most animals (80%) will experience mild discomfort despite the combination of procedures. In the rest of the rats, e.g. when pretreatment will be applied or when animals are bled for the assessment of antibody titers, the cumulative discomfort may be moderate.

## **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.

We will collect tissues at the end of the experiment. In addition, after rats are injected with synerkines they could develop neutralizing antibodies against the individual cytokines or the linker sequence of which ■ synerkine is composed. Such antibodies could interfere with the outcome of a second study, that is the reason animals cannot be reused.

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

UMC Utrecht

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



**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  
AVD1150020171744  
**Bijlagen**  
1

Datum 6 juni 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED],

Op 16 mei 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Synerkines: platform for potential novel anti-inflammatory drugs" met aanvraagnummer AVD1150020171744. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 29 mei 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Wij hebben u een aantal vragen gesteld over de experimentele opzet. U heeft bijlage dierproeven 3.4.4.1 aangepast.

#### **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.

Met het oog op artikel 10a, lid 1, zijn er algemene voorwaarden gesteld.

U kunt met uw project "Synerkines: platform for potential novel anti-inflammatory drugs" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 juli 2017 tot en met 30 juni 2022. Deze termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat de looptijd van een vergunning niet langer kan zijn dan 5 jaar.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

#### **Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Utrecht gevoegd. Dit advies is opgesteld op 8 mei 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.

**Datum:**  
6 juni 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD1150020171744

#### **Bezwaar**

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

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

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

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

#### **Meer informatie**

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

Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:



Algemeen Secretaris

#### **Bijlagen:**

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



# Projectvergunning

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

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

**Naam:** UMC Utrecht  
**Adres:** Postbus 12007  
**Postcode en plaats:** 3501 AA UTRECHT  
**Deelnemersnummer:** 11500

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 juli 2017 tot en met 30 juni 2022, voor het project "Synerkines: platform for potential novel anti-inflammatory drugs" met aanvraagnummer AVD1150020171744, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Utrecht. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Senior Scientist.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 16 mei 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 16 mei 2017;
  - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 16 mei 2017;
  - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 8 mei 2017, ontvangen op 16 mei 2017.
  - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 29 mei 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
<b>3.4.4.1 Bioavailability of synerkines</b>				
	Ratten ( <i>Rattus norvegicus</i> ) /	960	20% Matig 80% Licht	

### Voorwaarden

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

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

In artikel 10, lid 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

**Aanvraagnummer:**  
AVD1150020171744

worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in 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.



**Aanvraagnummer:**

AVD1150020171744

## Weergave wet- en regelgeving

### **Dit project en wijzigingen**

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

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

### **Verzorging**

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

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

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

### **Pijnbestrijding en verdoving**

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

**Aanvraagnummer:**

AVD1150020171744

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.