

		Inventaris Wob-verzoek W17-12								
			wordt verstrekt			weigeringsgronden				
nr.		document NTS 20172207	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
1		Origineel aanvraagformulier				x		x	x	
2		NTS	x							
3		Projectvoorstel			x					
4		Bijlage beschrijving dierproeven 1			x					
5		Bijlage beschrijving dierproeven 2			x					
6		Bijlage beschrijving dierproeven 3			x					
7		Bijlage beschrijving dierproeven 4			x					
8		DEC-advies				x		x	x	
9		Ontvangstbevestiging				x		x	x	
10		Verzoek om aanvullende informatie				x		x	x	
11		Antwoord op verzoek om aanvullende informatie				x		x	x	
12		Adviesnota CCD		x						x
13		Beschikking en vergunning				x		x	x	



Centrale Commissie Dierproeven

Aanvraag

Projectvergunning Dierproeven

Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	☒ Ja > Vul uw deelnemernummer in 50100 ☐ Nee > U kunt geen aanvraag doen	
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	TNO
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]
		KvK-nummer	27376655
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>	Straat en huisnummer	
		Postbus	96800
		Postcode en plaats	2509 JE DEN HAAG
		IBAN	NL39INGB0657819271
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	TNO
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED] x Dhr. ☐ Mw.
		Functie	Onderzoeker
		Afdeling	[REDACTED]
		Telefoonnummer	[REDACTED]
		E-mailadres	[REDACTED]
1.5	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	☐ Dhr. ☐ 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

Functie

Afdeling

Telefoonnummer

E-mailadres

☐ Dhr. ☐ Mw.

- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?

☒ Ja > Stuur dan het ingevulde formulier *Melding Machtiging* mee met deze aanvraag

☐ Nee

2 Over uw aanvraag

- 2.1 Wat voor aanvraag doet u?

☒ Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3

☐ Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2

☐ Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3

- 2.2 Is dit een *wijziging* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor verleend is?

☐ Ja > Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier

☐ Nee > Ga verder met vraag 3

- 2.3 Is dit een *melding* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor is verleend?

☐ Nee > Ga verder met vraag 3

☐ Ja > Geef hier onder een toelichting en ga verder met vraag 6

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?

Startdatum 01 - 01 - 2018

Einddatum 31 - 12 - 2023

- 3.2 Wat is de titel van het project?

Het bepalen en valideren van de effectiviteit van nieuwe geneesmiddelen en het onderzoeken van de mechanismen die betrokken zijn in het ontstekings- en fibrose proces m.b.v. *in vivo* fibrose modellen.

- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?

Het bepalen en valideren van de effectiviteit van nieuwe geneesmiddelen en het onderzoeken van de mechanismen die betrokken zijn in het ontstekings- en fibrose proces in diermodellen

- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?

Naam DEC DEC-TNO

Postadres 96800 2509 JE DEN HAAG

E-mailadres

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? ☒ Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1684 Lege
☐ Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.
☐ Via een eenmalige incasso
☒ Na ontvangst van de factuur
 s.v.p. uw factuur o.v.v. 'vooruitbetaling' en het bestelnummer 3100165835/1 indienen via e-mail bij [REDACTED] adres:
 TNO T.a.v. Accounts Payable
 Postbus 96829
 2509 JE DEN HAAG

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

Den Haag

Datum

18-06-2017

Handtekening

[REDACTED]



Format Projectvoorstel dierproeven

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

1 Algemene gegevens

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

2 Categorie van het project

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

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

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

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

opleidingsprogramma en eindtermen, is gekozen voor dierproeven.

Fibrose is een pathologisch proces waarbij een overmatige vorming van fibreus bindweefsel in organen of weefsels optreedt. Fibrose kan gezien worden als een uit de hand gelopen wondhelingsproces, waarbij er een dusdanig zeer sterke ophoping van bindweefsel kan optreden dat het normaal functioneren van het orgaan niet meer mogelijk is. Hierdoor kan fibrose tot ernstige gezondheidsproblemen leiden en heeft levensbedreigende aspecten als het bijvoorbeeld de long, lever of nier betreft. Hoewel de klinische noodzaak om fibrose te kunnen behandelen overduidelijk is (er wordt geschat dat in 45% van alle sterfgevallen fibrose een rol heeft gespeeld) waren er tot enkele jaren geleden geen behandelmethoden beschikbaar.

Met het op de markt komen van twee (zij het nog maar zeer matig effectieve) medicijnen tegen longfibrose (Pirfenidone door Roche en Nintedanib door Boehringer Ingelheim) is het fibrose onderzoek de afgelopen jaren in een enorme stroomversnelling geraakt. Zowel binnen de farmaceutische industrie als binnen de academia worden momenteel nieuwe medicijnen ontwikkeld die de hoop bieden dat binnen afzienbare tijd nieuwe therapiemogelijkheden beschikbaar komen. Dit wordt ondersteund door het feit dat hoewel er grote verschillen tussen de organen kunnen zijn in factoren die fibrose kunnen veroorzaken, er een grote overlap in de processen is als het fibroseproces eenmaal op gang is. Dit betekent dat bijvoorbeeld een therapie die ontwikkeld is voor de behandeling van longfibrose vaak ook effect in andere orgaanfibroses kan hebben.

Een essentiële stap in het testen van nieuwe farmaca is het aantonen van effectiviteit in een preklinische setting voordat ze in een klinische fase verder getest zullen gaan worden. TNO heeft de afgelopen 15 jaar een breed portfolio van *in-vivo* en *in-vitro* modellen ontwikkeld waarin we fibrose in verschillende organen kunnen nabootsen. Middels ons portfolio ondersteunen wij zowel de farmaceutische industrie als de academische wereld bij het zo goed mogelijk testen van nieuwe therapie mogelijkheden. Omdat het onderzoek naar nieuwe anti-fibrotische therapieën nog een relatief jong onderzoeksveld is, vinden er voortdurend verbeteringen aan modellen en uitleesmogelijkheden plaats. Wij streven ernaar om deze zo goed mogelijk in ons portfolio te incorporeren om daarmee een zo optimaal mogelijk preklinisch palet aan te bieden.

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

Het hoofddoel van dit project is het testen van nieuwe anti-fibrotische therapie mogelijkheden in state-of-the-art long-, huid-, lever en/of nier fibrosemodellen die zo goed mogelijk bijdragen aan het voorspellen van de uiteindelijke klinische effectiviteit.

Om dit mogelijk te maken zijn de volgende subdoelen in dit project geïntegreerd:

- Continue validatie en verdere optimalisatie van de modellen (bijvoorbeeld door het toevoegen van extra read-out mogelijkheden, het uittesten van nieuwe toedieningsstrategieën, het ontwikkelen van meer chronische varianten van onze modellen om daarmee de humane klinische situatie beter te benaderen en het uittesten van potentiële nieuwe positieve controles).
- Ontwikkelen van kennis over het fibrotische proces in de verschillende modellen (bijvoorbeeld het volgen van de fibroseontwikkeling in de tijd of het vergelijken van fibrotische processen tussen dier en mens om daarmee optimale translatie mogelijk te maken).

Dit project heeft een hoge haalbaarheid:

TNO heeft een zeer uitgebreid track record op dit gebied. Onderzoekers binnen de groep zijn al meer dan 20 jaar werkzaam op het gebied van extracellulaire matrix aanmaak en afbraak. Daarnaast heeft TNO sinds 10 jaar een uitgebreid programma op het onderzoeken en testen van nieuwe anti-fibrotische

therapie mogelijkheden. Hierbij is een groot netwerk binnen zowel de academische wereld als binnen de farmaceutische industrie opgebouwd. Binnen dit netwerk hebben we de afgelopen 10 jaar meer dan 50 samenwerkingsprojecten (zowel bilateraal als in grotere consortia) uitgevoerd.

3.3 Belang

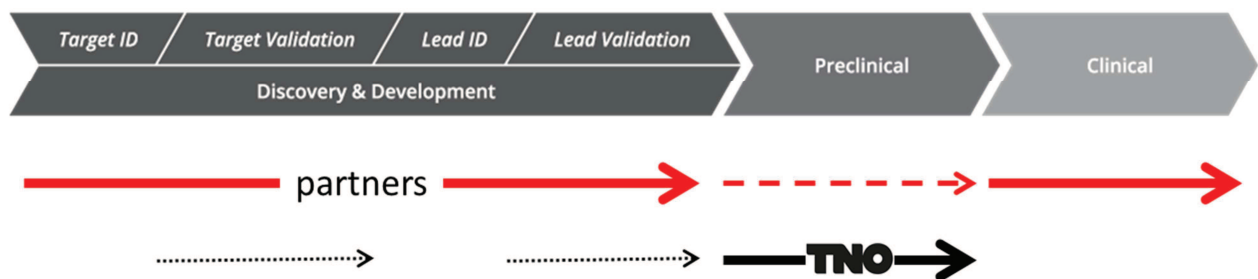
Beschrijf het wetenschappelijk en/of maatschappelijk belang van de hierboven beschreven doelstelling(en).

Er is géén therapie beschikbaar ter voorkoming van fibrose, terwijl de behandeling met de momenteel beschikbare farmaca slechts matig effectief is in zowel de patiënt als in de muis. Fibrose is een chronische aandoening die tot ernstige gezondheidsproblemen kan leiden en heeft levensbedreigende aspecten als het de long, lever of nier betreft. Hoewel de klinische noodzaak om fibrose te kunnen behandelen overduidelijk is (45% van alle mortaliteit heeft een fibrotische component) zijn er nog nauwelijks goede behandelmethoden beschikbaar. Bovenstaande doelstellingen zullen bijdragen aan de ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen tegen fibrose. Deze zullen leiden tot een aanzienlijke verbetering en verhoging van de kwaliteit van leven, enorme kostenbesparing in de zorg en meer arbeidsparticipatie van fibrosepatiënten. Om dit mogelijk te maken is het essentieel dat de bestaande wetenschappelijke kennis over het ontstaan van fibrose en de daarvoor verantwoordelijke processen verder uit te breiden. Longfibrose wordt gekenmerkt door kortademigheid, infiltraten (te zien op röntgenfoto) en ontsteking/fibrosis. Als de longfunctie vermindert neemt de sterfte toe. 50-70% van de patiënten met longfibrose sterft binnen 5 jaar na de diagnose. Per jaar worden 12 op de 100.000 mensen gediagnostiseerd met idiopathische longfibrose. Leverfibrose wordt vaak gezien in obese of hepatitis B of C besmette patiënten. Het duurt jaren voordat de ziekte zich ontwikkelt en klinische signalen worden herkend. 10 tot 20% van alle patiënten gediagnostiseerd met leverfibrose zullen uiteindelijk sterven aan cirrose of leverkanker als er niet wordt overgegaan op een levertransplantatie. Bij 25% van de hepatitis geïnfekteerde patiënten met een levertransplantatie keert de fibrose/cirrose weer terug. Wereldwijd lijden 400 miljoen mensen aan leverfibrose. Chronisch nierfalen kan ontstaan door meerdere oorzaken, zoals diabetes of hypertensie. Eén van de kenmerken van eindstadium nierfalen is de ontwikkeling van fibrose in de verschillende compartimenten in de nier. Wanneer de nier is beschadigd, ontstaat een ontsteking die zich kan ontwikkelen tot 'end stage' *nierfibrose*. De ontstane nefropathie veroorzaakt veel sterfte binnen de diabetes en obese patiënten populatie. Er is geen goede therapie voor nierfalen en de enige behandeling die op dit moment werkt is dialyse of niertransplantatie. Helaas is dit geen lange termijn oplossing. Geschat wordt dat in 2020 drie miljoen Nederlanders diabetes hebben, 44% van deze patiënten zal nefropathie en leverpathologie ontwikkelen. Ook huidfibrose (bijvoorbeeld in het ziektebeeld systemische sclerodermie of na verbranding) kan leiden tot ernstige gezondheidsproblemen. In handen en gezicht komt deze ziekte het meest voor. Samentrekking van bindweefsel kan daar leiden tot een sterk verlies van functie in de hand en de mond.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

Het ontwikkelen van nieuwe therapeutica verloopt volgens een vast stramien:



Allereerst worden er geschikte targets geïdentificeerd op basis van bijvoorbeeld literatuur, humane studies en/of *in vitro* testen. Vervolgens wordt gevalideerd of modificatie van het target inderdaad tot verandering van pathologie kan leiden (bv *in vitro* testen, *ex vivo* testen met humaan weefsel, *in vivo* testen in transgene dieren). Hierna worden stoffen (leads) ontwikkeld die het target kunnen beïnvloeden (bv remmende antilichamen, small molecules, RNA therapie) en worden deze leads gevalideerd (welke stof is het meest potent, hoe is de oplosbaarheid, hoe specifiek is de stof). De meest veelbelovende kandidaten gaan vervolgens door naar de preklinische testfase, waarin wordt onderzocht of de kandidaat stoffen goed genoeg zijn om in de mens getest te worden (klinische fase). Het ultieme doel hierbij is natuurlijk dat stoffen die ook de klinische fase met succes doorlopen als nieuwe therapie zullen worden toegelaten.

TNO ondersteunt als Research and Technology Organization (RTO) al jaren zowel de farmaceutische industrie als academische partners bij het uitvoeren en optimaliseren van preklinisch onderzoek op het gebied van fibrose. Omdat het uitvoeren van dit soort onderzoek bij TNO goed gevalideerd is en het vaak om specialistische modellen gaat, kiezen veel partners ervoor dit soort onderzoek in samenwerking te doen in plaats van zelf uit te voeren. Belangrijk hierbij is te realiseren dat het voor partners vaak van even groot belang is om te leren dat een stof niet werkt (en dus niet door kan naar de klinische fase) als om aan te tonen dat een stof wel werkt. Het overgrote deel van het werk onder dit project valt in de preklinische fase, maar werk op het gebied van target validatie (bv aantonen dat een pathway betrokken is in fibrose d.m.v. het gebruik van transgene dieren) of lead validation (bv vergelijken van verschillende varianten van een nieuwe stof om daarna te kunnen kiezen welke stof verder ontwikkeld zal worden) vindt ook plaats.

Voor het testen van nieuwe geneesmiddelen die de fibrosevorming verminderen, maken wij gebruik van 4 diersmodellen. Uit uitgebreide literatuurstudie en na intensieve consultatie met farmaceutische partijen en academische partners is naar voren gekomen dat deze modellen op dit moment het best gevalideerd en geaccepteerd zijn (ook door de FDA) voor het preklinisch testen van nieuwe therapie mogelijkheden. Het betreft hier de volgende modellen:

- Bleomycine-geïnduceerde longfibrose
- Bleomycine-geïnduceerde huidfibrose
- CCl₄-geïnduceerde leverfibrose
- Ureter obstructie geïnduceerde nierfibrose

Het overgrote deel (>80%) van de studies die onder deze projectaanvraag zullen worden uitgevoerd zullen effectiviteit studies zijn waarin nieuwe therapeutica worden getest. Dit zal in samenwerking met of in opdracht van externe partners plaatsvinden. Voor elke individuele studie wordt uitgebreid met de betreffende partner overlegd over het optimale studiedesign. Er wordt altijd aan de partner gevraagd wat er al bekend is van het te testen middel, om zo onnodig proefdier gebruik te voorkomen. TNO heeft voor verschillende modellen uitgebreide datasets beschikbaar waarin kan worden gekeken of de targets inderdaad betrokken zijn. Verder komen hierbij ook aspecten als keuze van het meest geschikte model (meestal gebaseerd op het werkingsmechanisme of het toepassingsgebied), de experimentele opzet, de toedieningsroute, de behandelingsfrequentie, de poweranalyse, de concentratie keuze, de uitleesparameters, etc. aan de orde.

Hoewel bovenstaande modellen op dit moment het meest geschikt geacht worden voor het testen van nieuwe therapiemogelijkheden betekent dit niet dat er geen knelpunten binnen het fibrose onderzoek meer zijn. Daarom zullen de resterende studies die onder deze projectaanvraag zullen worden uitgevoerd zich richten op het continue verder verbeteren van deze modellen. De hoofdknelpunten waar we op ons zullen

richten zijn:

- Verbeteren reproduceerbaarheid en verbeteren validatie van de modellen: in de uitgebreide literatuur over deze modellen worden veel varianten gebruikt die niet allemaal gelijkwaardig zijn. In het verleden hebben we de reproduceerbaarheid van het longfibrose model al sterk kunnen verbeteren door de toedieningsroute van bleomycine te veranderen van intratracheale injectie naar oropharyngeale toediening. We proberen continue de modellen te verbeteren en tegelijkertijd de modellen zo goed mogelijk te valideren. Hier zal onder andere ook worden gekeken of het mogelijk is om verschillende modellen te combineren (inductie van longfibrose in het huidfibrosemodel), zodat er meer kennis met minder dieren kan worden gegenereerd.
- Verbeteren van beschikbare uitleesparameters: veel van de klassieke uitleesparameters zijn gericht op het meten van het collageen eiwit (histologie, biochemische analyses). Deze hebben als nadeel dat ze vaak weinig onderscheidend zijn (de therapie werkt/werkt niet). Wij richten ons daarom ook op meer gevoelige methodes die de processen beter in kaart kunnen brengen (bijvoorbeeld -omics benaderingen). Hiermee hopen we in de toekomst verschillen tussen nieuwe therapiemogelijkheden beter te kunnen differentiëren. Daarnaast heeft het ontwikkelen van nieuwe uitleesparameters die het beter kunnen bepalen van werkzaamheid in een therapeutisch behandelprotocol kunnen versterken. In het verleden hebben we hier al stappen kunnen zetten door het toepassen van zwaar water labeling van nieuw collageen.
- Verbeteren van kennis over het fibroseproces in muis en rat en het vergelijken van deze processen met het humane ziektebeeld. Deze kennis zal gebruikt worden om beter te kunnen onderzoeken wat de overlap en de verschillen tussen de model ziekte en het humane ziekteproces te kunnen bepalen. Hiermee zal een verbeterde translatie naar de kliniek kunnen plaatsvinden. Daarnaast zal deze kennis worden gebruikt om beter advies te kunnen geven over de opzet van de proeven. Zo zal bijvoorbeeld meer gedetailleerde kennis over het tijdsverloop van de modellen kunnen bijdragen aan een beter ontwerp van een therapeutisch regime (bv bepalen wat het optimale moment om te starten van een behandeling gebaseerd op kennis van het werkingsmechanisme van de nieuwe therapie).

Bij vraag D van de verschillende bijlagen zijn voorbeeldstudies gegeven om duidelijker te maken op welk gebied deze verbeteringen kunnen liggen.

Alle studies worden uitgevoerd conform de richtlijnen van de "good practice guide" (van Diehl *et al*, J Appl Toxicol. 2001 Jan-Feb;21(1):15-23.) en worden voor aanvang eerst door de IvD getoetst.

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

1) Testen van nieuwe anti-fibrotische therapieën

Binnen ons netwerk (farmaceutische industrie, academische partners) worden veel nieuwe behandel mogelijkheden voor fibrotische aandoeningen ontwikkeld. Veel van onze partners hebben zelf niet de kennis/capaciteit in huis om deze nieuwe therapieën op effectiviteit te testen en maken gebruik van onze expertise om deze testen uit te voeren. Therapieën die worden ontwikkeld zijn o.a. small molecules, antilichamen, celtherapie, antisense technologieën. Daarnaast kan bijvoorbeeld het belang van een bepaalde pathway worden onderzocht door gebruik te maken van transgene dieren, dit kan vooral van belang zijn als er nog geen andere mogelijkheden zijn om deze pathways te moduleren.

2) Instandhouding lopende diermodellen

De batches bleomycine die wij gebruiken voor het induceren van huid of longfibrose hebben een verschillende werkzaamheid. Dit betekent dat bij elke nieuwe batch bepaald moet worden bij welke concentratie het fibrose inductie window voldoende hoog is. Voor de huid en longfibrose modellen worden verschillende batches gebruikt. De gevoeligheid varieert ook per species en potentieel per stam. Afhankelijk van het aantal daadwerkelijk uitgevoerde studies zal er naar schatting elke 3 jaar een nieuwe batch getest moeten worden.

3) Verbetering modellen/read-outs

Op basis van contacten binnen ons uitgebreide netwerk, de nieuwste literatuur en ons eigen programma gericht op het continu aanbrengen van verbetering in de modellen, zal er steeds worden gestreefd met zo min mogelijk dieren en zo min mogelijk ongerief maximaal inzicht te krijgen in het ontwikkelen van nieuwe therapieën.

Hierbij zullen onder andere de volgende vragen worden geadresseerd:

- Is het mogelijk de milde longfibrose die in het huidfibrose model optreedt meer consistent tot expressie te laten komen zodat beide pathologieën in hetzelfde model kunnen worden onderzocht? (Zodat niet twee afzonderlijke modellen hoeven worden uitgevoerd, dit geeft vermindering van aantallen dieren in studies).
- Is het mogelijk het transiënte fibroseproces in het longfibrose model met behulp van meerdere inductiemomenten meer de humane ontwikkeling te laten doormaken? Zo ontstaat een meer chronisch dan acuut longschade model, dit is beter transleerbaar naar de kliniek.
- Verfijning van toedieningsmogelijkheden. Bijvoorbeeld de manier van het induceren van de fibrose, of het systemisch toedienen van therapeutica.

4) Verdere ontwikkeling kennis over modellen

Meer beschikbare kennis over de modellen draagt bij aan het optimaliseren van het studiedesign voor het testen van nieuwe therapeutica.

Voorbeelden hiervan zijn:

* Bepaling van werkzaamheid van erkende referentiestoffen

* Het maken van een transcriptoom database door de tijd heen; hierin kunnen partners voordat ze een dierstudie gaan inzetten controleren of hun nieuwe targets wel in de modellen voorkomen: dit geeft uiteindelijk vermindering van het aantal dierproeven.

* Ontwikkelen van meer kennis over eventuele herstelprocessen die plaatsvinden na fibrose inductie; dit geeft meer inzicht of het mogelijk is om fibrose daadwerkelijk te genezen ipv de verdere ontwikkeling te remmen.

* Hoe is het microbiom betrokken bij de ziekte?

* biomarkers zoeken in plasma die voorspellend zijn voor de mate van fibrosevorming

*Vergelijking van de gegeneerde data uit de diermodellen met humane longfibrose patiënt gegevens, om zo de voorspelbaarheid vanuit de modellen naar de kliniek te optimaliseren.

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

Alle onderdelen van deze projectaanvraag zijn erop gericht om zo optimaal mogelijk (maximale voorspelbaarheid naar de kliniek gecombineerd met minimaal proefdiergebruik) te beoordelen of nieuwe therapieën preklinische effectiviteit laten zien en daarmee geschikt zijn voor verdere klinische ontwikkeling. Hierbij wordt gebruik gemaakt van vier verschillende diermodellen voor fibrose die tezamen het overgrote deel van de humane klinische ontwikkelingsgebieden afdekken.

Door een proces van voortschrijdende validatie en verdere doorontwikkeling wordt ernaar gestreefd om te allen tijde de best mogelijke studiedesigns te kunnen aanbieden.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Longfibrose in muis of rat
2	Nierfibrose in muis of rat
3	Huidfibrose in muis of rat
4	Leverfibrose in muis of rat
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	50100	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	TNO	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		3.4.4.1	Longfibrose in muis of rat

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Er is op dit moment geen goede therapie beschikbaar ter voorkoming of behandeling van longfibrose. Voor het bepalen van de effectiviteit van nieuwe anti-fibrotica maken wij gebruik van het bleomycine-geïnduceerde longfibrosemodel in muis of rat. Dit is wereldwijd het meest gebruikte model gericht op het testen van nieuwe therapieën op het gebied van longfibrose.

Om longfibrose te induceren krijgen de dieren op dag 0 onder een isofluraan roesje oropharyngeaal (op de stembanden) een bleomycine oplossing gedruppeld. Uit studies met als doel verbetering van de modellen is gebleken dat deze wijze van toediening minder ongerief veroorzaakt dan intratracheale toediening, terwijl de verdeling van de bleomycine over de longen homogener is waardoor het model beter reproduceerbaar en minder variabel qua ziektelast is geworden.

Aan het preklinisch testen van nieuwe therapeutica gaat altijd een groot traject vooraf (zie 3.4 projectvoorstel). Op grond van de kennis uit dat traject zal in overleg met de partner een gedetailleerd studieplan worden opgesteld. Dit omvat o.a. de rationale voor het testen van de stof in een *in vivo* model en het werkingsmechanisme van de stof. Verder zullen in het studieplan de volgende aspecten worden vastgelegd (afhankelijk van de specifieke vraagstelling; deze zal per studie variëren):

- welke diersoort (muis / rat), geslacht (man / vrouw), stam (bijvoorbeeld C57Bl6/J of een transgene variant)
- beschrijving van de te testen stoffen, inclusief de te gebruiken concentratie(s)
- het tijdstip van start behandeling (preventief of therapeutisch)
- route van toediening
- frequentie van toediening (variërend van eenmalig tot tweemaal daags)
- experimentduur 21 dagen, maar indien we het model chronisch laten verlopen zal de totale studieduur met 3 weken worden verlengd tot 42 dagen. De looptijd zal per studie aan de IvD worden onderbouwd.

- noodzaak voor tussentijdse bloedafname voor bijvoorbeeld een PK analyse.

Een voorbeeld van een veel gebruikt studie design voor het testen van nieuwe therapieën ziet er als volgt uit:

Voorbeeld long fibrose studie - testen van een compound:

days:						0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21						
Group	Induction	Treatment	Route	dose	n																												
1	PBS	Controle vehikel	PO;QD	–	7															↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	
2	Bleomycine	Controle vehikel	PO;QD	–	12															↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
3	Bleomycine	Compound 1	PO;QD	0.3 mg/kg	12															↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
4	Bleomycine	Compound 1	PO;QD	1 mg/kg	12															↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
5	Bleomycine	Compound 1	PO;QD	3 mg/kg	12															↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Fibrose inductie (OP bleomycine)						x																											
lichaamsgewicht (3x per week)						x		x		x				x		x		x				x		x		x							
D2O administration (IP bolus)																				x													
D2O administration (in drink water)																				x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Euthanasie + isolatie plasma & long weefsels																														x			

Een voorbeeld van een studie design voor het ontwikkelen van een meer chronisch longfibrose model:

Voorbeeld long fibrose studie - model ontwikkeling:

			days:										0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	#	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
Group	Induction	n																																														
1	PBS	10	x																																													
2	1x Bleomycine	15	x																																													
3	2x Bleomycine	15	x																																													
4	3x Bleomycine	15	x																																													
Fibrose inductie (OP PBS or bleomycine)			x																																													
lichaamsgewicht (3x per week)			x	x	x	x																																										
Euthanasie (3 weken na laatste inductie) + isolatie plasma & weefsels																																																

De primaire uitleesparameters voor deze studie zijn het bepalen van de hoeveelheid fibrose in de long m.b.v. histologische analyse en/of het kwantificeren van de hoeveelheid collageen in de long als maat voor de mate van verbindweefseling (biochemische analyse).

Daarnaast kan, afhankelijk van de exacte vraagstelling, een groot aantal additionele parameters bepaald worden. Voorbeelden zijn: nat gewicht van de longen, bepalingen in long lavage vloeistof en/of serum/plasma/urine, RNA-analyses, nieuw collageen analyse mbv gedeutereerd water (D₂O) inbouw, etc.

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

In de muis en rat wordt longfibrose geïnduceerd door bleomycine opgelost in PBS tijdens de isofluraan inhalatie narcose op de stembanden te druppelen (volume 50-200µl). Door de tong goed te fixeren en de neus dicht te houden wordt het slikreflex onderdrukt en het dieper inademen gestimuleerd (=oropharyngeaal methode). Gedurende de eerste 9-10 dagen na bleomycine inductie neemt het lichaamsgewicht langzaam af tot ca 85% van het startgewicht (ontstekingsfase). Na deze periode herstelt het gewicht zich weer tot het startgewicht.

Afhankelijk van de vraagstelling van de klant zal een behandelstrategie van de uit te testen compound worden opgesteld, deze zal per studie variëren. Mogelijke variaties zijn:

- het tijdstip van de behandeling (profylactisch of therapeutisch),
- experiment duur (meestal drie weken, maar dit kan ook korter of langer zijn)
- route en frequentie van compound toediening (waaronder inhalatie, oraal, intra-nasaal, intra-tracheaal, intra-peritoneaal, intraveneus, subcutaan, via osmotische pompjes, sublinguaal of intramusculair).
- tussentijdse bloedafname voor bv PK analyse (Het maximaal af te nemen volume wordt gehandhaafd volgens de 'good practice' guideline van Diehl *et al.*)
- lichaamsgewicht bepaling als maat voor welzijn (2 of 3x per week standaard, maar bij gewichtsafname ook dagelijks). Bij ernstig gewichtsverlies (>25%) of als de dieren ademhalingsproblemen hebben en slecht reageren op externe prikkels zullen de dieren voortijdig uit experiment worden genomen.
- toediening van labels/tracers via intraperitoneale injectie of drinkwater (bv zwaar water (D₂O) of BrdU).
- non-invasieve (in house) imaging (bijvoorbeeld schade vaststellen aan orgaan met een µCT scan of EchoMRI)
- korte of langere tijd (maximaal 5 uur) vasten voor isoleren van bloed of urine

- euthanasie methode (bv mbv gradual fill CO₂ of isofluraan of conform een andere geaccepteerde methode uit richtlijn 2010/63/EU, bijlage IV.) waarna isolatie van bloed, longvloeistof en longen zal plaatsvinden om de primaire uitleesparameters van de studie te kunnen analyseren.

Het injectievolume van de test compound(s) of tracers zal variëren tussen 5 en 10 ml/kg, maar uiterlijk de maximale verdraagbare dosis per injectieplaats zoals staat vermeld in de 'good practice' guideline van Diehl *et al.*

Details van de studie worden beschreven in het studieplan en voorafgaand aan de studie met de IvD afgestemd.

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

Voor elk studieplan zal een separate power analyse worden uitgevoerd om tot een zo accuraat mogelijke bepaling van het aantal benodigde dieren te komen. Hierbij worden onder andere de volgende gegevens gebruikt:

- Meest recente inschatting van de variatie binnen het model (model vertoont lichte variatie in de tijd)
- Exacte looptijd van experiment (fibrosevorming is tijdsafhankelijk)
- Primaire uitleesparameter (gevoeligheid van de verschillende variabelen is verschillend)
- Gewenste mate van gevoeligheid
- Welke vergelijkingen noodzakelijk zijn (als alle groepen vergeleken worden liggen gelijke groepsgroottes voor de hand; als alles alleen met bijvoorbeeld de bleomycine controle groep wordt vergeleken kan beter met ongelijke groepsgroottes worden gewerkt)

Als voorbeeld: gebaseerd op een power analyse met $\alpha = 0.05$ en $1-\beta < 0.80$ voor de detectie van een significante vermindering in collageen van 45% is een groepsgrootte van 13 dieren noodzakelijk (als alle groepen met elkaar vergeleken worden).

We houden er rekening mee dat per groep 1 tot 2 dieren voortijdig uit experiment moeten worden gehaald door ernstig gewichtsverlies of andere ernstige klinische verschijnselen gerelateerd aan de longfibrose ontwikkeling. Dit brengt de groepsgrootte naar 15 dieren per groep.

Omdat we weinig variatie in de negatieve controle groep verwachten (saline geïnduceerde en vehikel behandelde groep) en deze groep voornamelijk wordt gebruikt om de mate van inductie te bepalen zijn hier minder dieren noodzakelijk, te weten 6-8.

In deze studie rekenen we met een power van 0.80. Soms wordt in overleg met de klant besloten om de power te verhogen naar 0.90. Het hanteren van een hogere power geeft een grotere kans weer dat de gekozen groepsgrootte de werkelijkheid inderdaad benaderd.

Wanneer het aantal dieren per groep afwijkt van de hierboven beschreven standaard zal de berekening aan de IvD in het afzonderlijke studieplan worden voorgelegd.

B. De dieren

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

Voor het bleomycine-geïnduceerde longfibrose muismodel worden voornamelijk mannelijke C57BL/6J muizen gebruikt in leeftijd van 8-12 weken oud. Vrouwelijke C57BL/6J muizen ontwikkelen minder longfibrose bij dezelfde bleomycine dosis dan mannelijke dieren (uit eigen studies en discussies met partners bekend). Er wordt momenteel onderzocht of de mate van longfibrose in vrouwen verhoogd kan worden door een hogere dosis bleomycine zonder dat dit tot toegenomen sterfte leidt.

Het rat model is in vrouwelijke Wistar ratten (8-10 weken oud) gevalideerd. Indien de voorkeur naar mannetjes uit gaat, zal dit model eerst verder in mannen gevalideerd moeten worden. De meeste studies zullen in de muis worden uitgevoerd. Redenen om voor het ratmodel te kiezen zijn o.a. verschillen in werkzaamheid van de therapeutica tussen de species (bv species specifieke antilichamen, verschillen in metabolisme van de compound tussen de species), maar ook beschikbaarheid van data in 1 van de species (het hele voortraject incl. Pk studies is in rat uitgevoerd).

Indien een andere muis of rat stam nodig is zal dit in het studieplan aan de IvD worden onderbouwd.

Het totaal aantal dieren per studie kan variëren en is afhankelijk van het aantal dieren per groep en het aantal groepen. Het aantal groepen in een studie wordt in samenspraak met de klant bepaald door de voorliggende vraagstelling en de groepsgrootte wordt bepaald aan de hand van de power analyse van het te verwachten

effect. Details worden voorafgaand aan de studie afgestemd met de IvD.

Gebaseerd op een verwacht aantal longfibrose studies van 10-12 per jaar met max 100 muizen per studie wordt het aantal benodigde muizen op maximaal 6000 geschat voor een periode van 5 jaar (12 studies x max. 100 dieren/studie x 5 jaar). De aanvraag voor rat longfibrose studies ligt lager, we verwachten maximaal 2 aanvragen per jaar. Een studie omvat 60-100 ratten per studie, voor een periode van 5 jaar schatten we 1000 ratten nodig te hebben.

NB de ervaring leert dat er over de jaren variatie kan plaatsvinden m.b.t. welke fibrose modellen het meest toegepast worden. Dit betekent dat het maximale aantal dieren dat onder deze aanvraag gebruikt zal worden naar verwachting aanmerkelijk lager zal liggen dan een simpele optelsom van de aantallen vermeld in de vier bijlagen bij deze projectaanvraag doet vermoeden.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☒ Nee, ga door met vraag D.

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

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

☒ Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging:

De medicijnen die in onze longfibrose modellen getest worden, zijn geselecteerd op basis van een uitgebreid voortraject. Dit heeft al bij de partner plaatsgevonden. In dit soort trajecten zijn er in de afgelopen decennia grote stappen gemaakt in het vervangen van *in vivo* studies door *in vitro/ex vivo* efficacy experimenten. Echter voor de laatste stap, voordat het klinische programma gestart kan worden, is preklinisch testen in dieren tot nu toe nog noodzakelijk.

Vermindering:

Door optimalisaties van het model proberen we bij te dragen aan vermindering van het aantal benodigde dieren. Zo hebben we in het verleden de fibrose inductie al gewijzigd van intra-tracheaal naar oropharyngeaal. Hierdoor werd de variatie van de uitleesparameters verminderd en kon de groepsgrootte verkleind worden. Verder hebben we voor dit model uitgebreide mRNA datasets beschikbaar waardoor tevoren al kan worden gekeken of bepaalde pathways relevant zijn voor dit model.

Verfijning:

De dierstudies worden uitgevoerd volgens een vooraf vastgelegd studieprotocol, de medewerkers op deze studies zijn zeer ervaren en goed getraind. Hierdoor heeft de studie een maximale kwaliteit en wordt stress en ongemak voor de dieren zo laag mogelijk gehouden. De fibrose ontwikkeling kan een nadelig effect hebben op het welzijn van de dieren. Dagelijks wordt dan ook de algehele gezondheidstoestand gecontroleerd. Bij verminderd welzijn van de dieren (als het ongerief meer dan matig wordt) zullen de dieren voortijdig uit de studie worden genomen.

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

Om angst en pijn voor de dieren zo veel mogelijk te beperken, zal de inductie van longfibrose onder anesthesie plaatsvinden. Verder worden alle werkzaamheden per studie door een gering aantal goed getrainde biotechnici uitgevoerd. Injectievloeistoffen zullen voor inspuiten eerst op lichaamstemperatuur worden gebracht. Bij het plaatsen van bv een osmotisch pompje onder de huid of in de buik, krijgt het dier altijd pre- en postoperatief pijnbestrijding toegediend.

Het welzijn van de dieren wordt dagelijks objectief beoordeeld door verschillende personen. Indien er duidelijke tekenen van onverwacht ernstig ongerief optreden, zullen de dieren geëuthanaseerd worden. Om uiteindelijk over te gaan tot een humaan eindpunt, hebben wij een scoresysteem opgesteld waarop de dieren getoetst worden. Dit zal het geval zijn als de dieren niet meer eten of drinken, hierdoor ernstig gewicht verliezen (> 25%), slecht reageren op prikkels en/of ademhalingsproblemen hebben (zie J).
De dieren worden gehuisvest onder DMI condities en zullen geen gevaar opleveren voor het milieu. Afvalmateriaal uit de dierstudie (o.a. dierlijk weefsel, gecontamineerd beddingmateriaal of de bleomycine oplossing) wordt na afloop zorgvuldig gescheiden van het huishoudelijk afval en op juiste wijze afgevoerd.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

N.v.t. dit is geen wettelijk vereist onderzoek

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

☒ Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

☒ Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

☐ Nee > Ga verder met vraag I.

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

☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

Voor het induceren van longfibrose zullen de dieren onder een roesje van isofluraan gebracht worden, dit is om te zorgen dat de dieren stilliggen en goed de bleomycine oplossing zullen inademen. Het plaatsen van osmotische pompjes subcutaan of intra peritoneaal wordt uitgevoerd onder een pre- en postoperatief pijnstillingsregiem (volgens wettelijk geldende richtlijnen).

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

nvt

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

nvt

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

nvt

J. Humane eindpunten

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

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

☒ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

In het longfibrose model is het de bedoeling dat de dieren fibrose in de longen zullen ontwikkelen.

Doordat bleomycine schade aanbrengt aan het longepitheel zal hier op lokale plekken ontsteking plaatsvinden, vooral in de eerste 7 dagen na toediening. Immune cellen die naar de ontsteking toe migreren proberen de schade te herstellen. Echter, er zal ook functioneel longweefsel verloren gaan (hier ontstaan fibrosehaarden). Doordat het longweefsel deels niet meer functioneel is, kunnen de dieren het benauwd krijgen. De mate van het ontwikkelen van de fibrosehaarden en de daarmee gepaarde benauwdheid varieert tussen de dieren. Sommige dieren ontwikkelen meer fibrose dan anderen. Daarom hebben we een scoresysteem opgesteld waarop de dieren dagelijks getoetst worden zodat de dieren zo min mogelijk onnodig zullen lijden. Als de score groter is dan 2 worden de dieren geëuthanaseerd. De dieren worden drie keer per week beoordeeld op lichaamsgewicht. Dagelijkse controle van lichaamsgewicht en algehele gezondheidstoestand vindt plaats bij dieren die gewicht verliezen. In de eerste 8-10 dagen na de inductie van de ziekte (ontstekingsfase in de longen) vallen de dieren allemaal een beetje af (5-10%). Sommige dieren vallen echter in deze periode veel meer af. Als het gewicht van deze dieren in de eerste 10 dagen van de studie met 25% afneemt hebben we in het verleden gezien dat er in deze dieren geen verbetering meer zal optreden. We besluiten dan ook om dan het humane eindpunt uit te oefenen.

Treedt het gewichtsverlies pas na dag 7, en meer geleidelijk op, dan weten we dat het dier zich zal stabiliseren en dat we de dieren in experiment kunnen laten.

Als naast het gewichtsverlies de dieren ook aanhoudend trillen, niet reageren op prikkels, ademhalingsproblemen hebben, of een vacht met opstaande haren dan wordt ook toch overgegaan op het uitoefenen van het humane eindpunt. Hieronder staat ons humane eindpunt formulier weergegeven. Dit formulier gebruiken we in alle fibrose studies.

Algemene humane eindpunten formulier:

Dieren dienen te worden geëuthanaseerd indien een **score van 2 of groter** van onderstaande criteria in het experiment gesignaleerd worden:

Ongeriefcode

- | | |
|-----------|--|
| A | Aanzienlijke gewichtsafname een aantal dagen achtereen (1) |
| B | Abnormaal gedrag bijvoorbeeld: |
| B1 | - benauwdheid/hijgen (1) |
| B2 | - speekselmoed (1) |
| B3 | - minder / niet reageren op prikkels (2) |
| B4 | - aanhoudend trillen (2) |
| B5 | - aanhoudend stuip trekken (2) |
| B6 | - zelfverminking (2) |
| C | Omhoog staan van de haren (1) |
| D | Abnormale houding (1) |

Welk percentage van de dieren loopt kans deze criteria te halen?	
Uit historische data van studies zien we dat gemiddeld tussen 5 tot 10% van de dieren voortijdig uit studie worden genomen omdat het ongerief hoger dan matig wordt.	
K. Classificatie van ongerief	
Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.	
Onze negatieve controle groep zal licht ongerief ondervinden, deze groep ontwikkelt geen ziekteverschijnselen. De bleomycine-geïnduceerde groepen zullen maximaal matig ongerief ondervinden en de compound behandelde groepen zullen naar verwachting licht tot matig ongerief ondervinden, omdat de compound mogelijk de fibrosevorming vermindert. Echter, het komt voor (in 0.5-1% van de gevallen kan er sprake zijn van ernstig ongerief omdat er meer dan matige longfibrose is ontstaan) dat dieren acuut verslechteren en we dit niet zagen aankomen. Dieren overlijden dan 's nachts en worden de volgende dag dood in de kooi aangetroffen. De experimentduur van onze modellen varieert van 1 tot enkele weken waarin de dieren maximaal een matig ongerief (cumulatief van alle handelingen) zullen ondervinden. Mocht dit ongerief overschreden worden dan zullen de dieren voortijdig uit het experiment worden gehaald (zie punt J voor de specifieke criteria). Dit wordt tijdens de studie bepaald door de algehele conditie van de dieren regelmatig te checken.	
Eenmalige oropharyngeale toediening van bleomycine onder inhalatie verdoving:	licht ongerief
Longontsteking als gevolg van de bleomycine behandeling:	matig ongerief
Dagelijks/wekelijks wegen:	licht ongerief
Behandeling met therapeutica:	maximaal matig ongerief
Eén of meermaals afnemen van bloed:	licht ongerief
Injectie met tracer stof:	licht ongerief
Euthanasie:	licht ongerief

Einde experiment

L. Wijze van doden	
Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?	
☐ Nee	
☒ Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.	
Onze primaire uitleesparameter is de hoeveelheid collageen gevormd in de longen, dit meten we histologisch en biochemisch in de verschillende long lobben. Het longweefsel moet dus worden geïsoleerd na het euthanaseren van de dieren.	
Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?	
☐ Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.	
☒ Ja	



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	50100	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	TNO	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer 3.4.4.2	Type dierproef Nierfibrose in muis of rat

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Er is op dit moment geen goede therapie beschikbaar ter voorkoming of behandeling van nierfibrose. Voor het bepalen van de effectiviteit van nieuwe therapeutica gericht op het voorkomen van nierfibrose maken wij gebruik van het unilaterale urether obstructie (UUO)- nier fibrose of het nefrectomie model in muis of rat. In het UUO nier fibrose model wordt bij de dieren op dag 0 de ureter vlak onder de nier afgebonden. De schade aan de nier ontstaat acuut. Door deze obstructie kan de urine niet meer uit de nier weg en stapelt zich op waardoor stuwingsdruk ontstaat in de bovenliggende nier. Dit heeft als gevolg ontsteking, collageen ophoping en verwijding van de nier tubuli. Dit proces gaat heel snel en binnen een aantal dagen is de nier functie van de aangedane nier volledig verdwenen. De contralaterale nier compenseert hiervoor en neemt de functie deels over. Bij een nefrectomie wordt op dag 0 één van de nieren verwijderd om zo de druk op de contralaterale nier te vergroten. Het doel is dat in deze nier schade aan de nefronen ontstaat, deze schade ontstaat echter zeer langzaam. Dit model komt meer overeen met chronische nier schade. Om de druk op deze nier extra te vergroten en het schade proces sneller te laten verlopen kan een extra trigger worden gegeven. Dit kan bijvoorbeeld door de bloeddruk te verhogen met het hormoon angiotensine of door extra zout aan het dieet toe te voegen.

Aan het preklinisch testen van nieuwe therapeutica gaat altijd een groot traject vooraf (zie 3.4 projectvoorstel). Op grond van de kennis uit dat traject zal in overleg met de partner een gedetailleerd studieplan worden opgesteld. Dit omvat o.a. de rationale voor het testen van de stof in een *in vivo* model en het werkingsmechanisme van de stof. Verder zullen in het studieplan de volgende aspecten worden vastgelegd (afhankelijk van de specifieke vraagstelling; deze zal per studie variëren):

- welke diersoort (muis / rat), geslacht (man / vrouw), stam (bijvoorbeeld C57Bl6/J of een transgene variant)
- Keuze voor het model: UUO (acuut model) of nefrectomie (chronisch model)
- beschrijving van de te testen stoffen, inclusief de te gebruiken concentratie(s)

- het tijdstip van start behandeling (preventief of therapeutisch)
- route van toediening
- frequentie van toediening (variërend van eenmalig tot tweemaal daags)
- experimentduur (voor een UUO studie tussen de 7 en 14 dagen; voor een nefrectomie studie maximaal 17 weken). De looptijd zal per studie aan de IvD worden onderbouwd.
- noodzaak voor tussentijdse bloedafname voor bijvoorbeeld een PK analyse

Een voorbeeld van een veel gebruikt studie design voor het testen van nieuwe therapieën in een preventief behandelregiem ziet er als volgt uit:

Dag						-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Groep	Inductie	Treatment	Route	Dosering	n												
1	Naïve	saline	SC		7		V			V			V			V	
2	UUO	saline	SC		10		V			V			V			V	
3	UUO	Compound 1	SC	5 mg/kg	10		↓			↓			↓			↓	
4	UUO	Compound 2	SC	5 mg/kg	10		↓			↓			↓			↓	
5	UUO	Compound 3	SC	10 mg/kg	10		↓			↓			↓			↓	
Inductie (UUO)							X										
Lichaamsgewicht (eerste week dagelijks, daarna 2x per week)						x	x	x	x	x			x			x	x
s.c injectie analgesie							x	x	x	x							
Euthanasie + collectie plasma & weefsels																	†

V - vehkel; ↓ - dose administration

Een voorbeeld van een pilot studie voor het testen van de aanwezige hoeveelheid collageen in een transgene muis stam ziet er als volgt uit:

Dag						-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Groep	Inductie	strain			n												
1	Sham	Wild type			8												
2	Sham	Transgeen			8												
3	UUO	Wild type			8												
4	UUO	Transgeen			8												
Inductie (UUO)							X										
Lichaamsgewicht (eerste week dagelijks, daarna 2x per week)						x	x	x	x	x			x			x	x
s.c injectie analgesie							x	x	x	x							
Euthanasie + collectie plasma & weefsels																	†

Primaire uitleesparameters van een nier fibrose studie zijn het bepalen van de hoeveelheid fibrose in de nier m.b.v. histologie en beeldanalyse en/of het kwantificeren van de hoeveelheid collageen in de nier als maat voor de mate van verbindweefseling (biochemische analyse).

Daarnaast kan, afhankelijk van de exacte vraagstelling, een groot aantal additionele parameters bepaald worden. Voorbeelden zijn: nat gewicht van de nieren, bepalingen in serum/plasma/urine, RNA-analyses, nieuw collageen analyse mbv gedeutereerd water (D₂O) inbouw, etc.

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

In muis en rat wordt nier fibrose geïnduceerd door de ureter van één van de nieren (meestal in de linker nier) af te binden met twee ligaturen. Eventueel kan de nier ook volledig worden verwijderd om de druk op de contralaterale nier te vergroten. De nier arterie, nier vene en de ureter worden dan met een ligatuur afgebonden waarna de nier volledig wordt weggenomen.

De dieren worden geopereerd onder isofluraan anesthesie. Peritoneum en de huid wordt gehecht.

Pre- en postoperatief krijgen de dieren pijnstilling; deze wordt tot maximaal 4 dagen na de operatie gegeven.

Verder krijgen de dieren na de operatie extra vocht toegediend en herstellen op een warmtematje.

Door de buikoperatie neemt het lichaamsgewicht de eerste 2-3 dagen af, waarna deze zich weer snel herstelt tot het startgewicht.

Afhankelijk van de vraagstelling van de klant/partner zal een behandelstrategie van de uit te testen compound worden opgesteld, deze zal per studie variëren. Mogelijke variaties zijn:

- het tijdstip van de behandeling (profylactisch of therapeutisch),
- experiment duur (meestal 10 dagen, maar dit kan ook korter of langer zijn)
- eenmalige dosering versus herhaalde toediening (verschil in tijdsduur en intervallen),

- toediening van combinaties van medicijnen,
- route van toediening (waaronder inhalatie, oraal, intra-nasaal, intra-tracheaal, intra-peritoneaal, intraveneus, subcutaan, via osmotische pompjes, sublinguaal of intramusculair).
- tussentijdse bloedafname voor bv PK analyse (Het maximaal af te nemen volume wordt gehandhaafd volgens good practice guideline van Diehl *et al*, J Appl Toxicol. 2001).
- lichaamsgewicht bepaling als maat voor welzijn (eerste 4 dagen na de operatie dagelijks daarna 2 of 3x per week).
- toediening van labels/tracers via intra peritoneale injectie of drinkwater (bv zwaar water D₂O of BrdU).
- euthanasie methode waarna isolatie van bloed, urine, en nier(en) zal plaatsvinden om de primaire uitleesparameters van de studie te kunnen analyseren.

Het injectievolume van de test compound(s) of tracers zal variëren tussen 5 en 10 ml/kg, maar uiterlijk de maximale verdraagbare dosis per injectieplaats zoals staat vermeld in de 'good practice' guideline van Diehl *et al*.

Details van de studie worden beschreven in het studieplan en voorafgaand aan de studie met de IvD afgestemd.

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

Voor elk studieplan zal een separate power analyse worden uitgevoerd om tot een zo accuraat mogelijke bepaling van het aantal benodigde dieren te komen. Hierbij worden onder andere de volgende gegevens gebruikt:

- Meest recente inschatting van de variatie binnen het model (model vertoont lichte variatie in de tijd)
- Exacte looptijd van experiment (fibrosevorming is tijdsafhankelijk)
- Primaire uitleesparameter (gevoeligheid van de verschillende variabelen is verschillend)
- Gewenste mate van gevoeligheid (dit is een keuze: als bijvoorbeeld eerdere varianten van een te testen stof al een verbetering van 30% lieten hoeft alleen gekeken worden of een nieuwe variant beter is. Dan zou een verbetering van 50% genoeg zijn, terwijl als een pathway nog nooit eerder getest is kan het goed zijn om het experiment gevoeliger in te zetten (bv een gewenste gevoeligheid van 40%)
- Welke vergelijkingen noodzakelijk zijn (als alle groepen vergeleken worden liggen gelijke groepsgroottes voor de hand; als alles alleen met bijvoorbeeld de UUO controle groep wordt vergeleken kan beter met ongelijke groepsgroottes worden gewerkt)

Voor het uittesten van nieuwe compounds varieert het aantal dieren tussen de 10 en 15 dieren per groep. De groepsgrootte hangt af van de grootte van het gewenste detecteerbare effect (de fibrose reductie is uitleesparameter afhankelijk).

Als voorbeeld gebaseerd op een power analyse $\alpha = 0.05$ en $1-\beta < 0.80$ voor de detectie van een significante vermindering in collageen hoeveelheid in de nier van 40% is een groepsgrootte van 14 dieren noodzakelijk. We houden er rekening mee dat we 5-10% van de dieren per groep zullen uitvallendoor bv een complicatie na de operatie. Dit gebeurt echter zelden. Dit brengt de groepsgrootte naar 15 dieren per groep.

Omdat we weinig variatie in de naïeve/sham controle groep verwachten, zal het aantal dieren per groep hier vaak lager uitvallen.

In deze studie rekenen we met een power van 0.80. Soms wordt in overleg met de klant besloten om de power te verhogen naar 0.90. Het hanteren van een hogere power geeft een grotere kans weer dat de gekozen groepsgrootte de werkelijkheid inderdaad benaderd.

Wanneer het aantal dieren per groep afwijkt van de hierboven beschreven standaard zal de berekening aan de IvD in het afzonderlijke studieplan worden voorgelegd.

B. De dieren

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

Voor het nier fibrose model kan gewerkt worden met mannelijke of vrouwelijke C57BL/6J of 129SV muizen of B/N of Fisher 344 ratten variërend in leeftijd van 6-12 weken oud.

De hierboven beschreven stammen/sexe zijn al eerder door ons gebruikt en het lopende fibrose model is hierop uitgebreid gevalideerd.

De stam die nodig is voor het uitvoeren van een studie zal in het studieplan aan de IvD worden toegelicht.

Het totaal aantal dieren per studie kan variëren en is afhankelijk van het aantal dieren per groep en het aantal groepen. Het aantal groepen in een studie wordt in samenspraak met de klant bepaald door de voorliggende vraagstelling en de groepsgrootte wordt bepaald aan de hand van de power analyse van het te verwachten effect. Details worden voorafgaand aan de studie afgestemd met de IvD.

Gebaseerd op een verwacht aantal nier fibrose studies van 6 per jaar met max 100 muizen per studie wordt het aantal benodigde muizen op maximaal 3000 geschat voor een periode van 5 jaar (6 studies x max. 100 dieren/studie x 5 jaar). De aanvraag voor rat fibrose studies ligt lager, we verwachten maximaal 2 aanvragen per jaar. Een gemiddelde studie omvat 80 ratten, voor een periode van 5 jaar schatten we 800 ratten nodig te hebben.

NB de ervaring leert dat er over de jaren variatie kan plaatsvinden m.b.t. welke fibrose modellen het meest toegepast worden. Dit betekent dat het maximale aantal dieren dat onder deze aanvraag gebruikt zal worden naar verwachting aanmerkelijk lager zal liggen dan een simpele optelsom van de aantallen vermeld in de vier bijlagen bij deze projectaanvraag doet vermoeden.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☒ Nee, ga door met vraag D.

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

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

☒ Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging:

De farmaca die in onze nier fibrose modellen getest worden, zijn geselecteerd op basis van een uitgebreid voortraject. Dit heeft al bij de partner plaatsgevonden. In dit soort trajecten zijn er in de afgelopen decennia grote stappen gemaakt in het vervangen van *in vivo* studies door *in vitro/ex vivo* efficacy experimenten. Echter voor de laatste stap, voordat het klinische programma gestart kan worden, is preklinisch testen in dieren tot nu toe nog noodzakelijk.

Vermindering:

Door optimalisaties van het model proberen we bij te dragen aan vermindering van het aantal benodigde dieren. Zo worden tegenwoordig de operaties onder inhalatie anesthesie uitgevoerd zodat dieren sneller uit narcose ontwaken. Hierdoor is de uitval van dieren verminderd. Verder hebben we voor het UUO model uitgebreide mRNA datasets beschikbaar waardoor tevoren al kan worden gekeken of bepaalde pathways relevant zijn voor dit model.

Verfijning:

De dierstudies worden uitgevoerd volgens een vooraf vastgelegd studieprotocol, de medewerkers op deze studies zijn zeer ervaren en goed getraind. Hierdoor heeft de studie een maximale kwaliteit en wordt stress en ongemak voor de dieren zo laag mogelijk gehouden. De buikoperatie kan een nadelig effect hebben op het welzijn van de dieren. Dagelijks wordt dan ook de algehele gezondheid gecontroleerd en worden de dieren gewogen. De eerste 4 dagen na de operatie krijgen ze tevens pijnstilling toegediend.

Bij verminderd welzijn van de dieren (als het ongerief meer dan matig wordt) zullen de dieren voortijdig uit de studie worden genomen.

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

Om angst en pijn voor de dieren zo veel mogelijk te verminderen, krijgen de dieren ruim voor de operatie pijnstilling en zal de operatie onder inhalatie anesthesie plaats vinden. Postoperatief wordt pijnstilling twee maal

daags, 4 dagen lang gegeven. Verder worden alle werkzaamheden per studie door goed getrainde biotechnici uitgevoerd. Injectie van vloeistoffen zullen voor inspuiten eerst op lichaamstemperatuur worden gebracht. Door de operatie verliest het dier vocht dit vullen we na de operatie aan met warm 0.9% NaCl. De dieren herstellen overnacht op een warmtematje. Ook wordt voer in de kooi geplaatst zodat het dier hier makkelijk bij kan.

Bij het plaatsen van medicatie in bijvoorbeeld een osmotisch pompje onder de huid of in de buikholte, krijgt het dier altijd pre- en postoperatief pijnbestrijding toegediend.

Het welzijn van de dieren wordt dagelijks objectief beoordeeld door verschillende personen. Indien er duidelijke tekenen van onverwacht ernstig ongerief optreden, zullen de dieren geëuthanaseerd worden. Om uiteindelijk over te gaan tot een humaan eindpunt, hebben wij een scoresysteem opgesteld waarop de dieren getoetst worden. Dit zal het geval zijn als de dieren niet meer eten of drinken, hierdoor ernstig gewicht verliezen (> 25%) of slecht reageren op prikkels (zie J).

De dieren worden gehuisvest onder DMI condities en zullen geen gevaar opleveren voor het milieu.

Afvalmateriaal uit de dierstudie wordt na afloop zorgvuldig gescheiden van het huishoudelijk afval en op juiste wijze afgevoerd.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

N.v.t.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

☒ Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

☒ Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

☐ Nee > Ga verder met vraag I.

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

toegepast?
☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.
☒ Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.
Voor de UUO of nefrectomie operatie krijgen de dieren pre- en post operatief (4 dagen lang) pijnstilling via subcutane injectie met carprofen (5 mg/kg BW). Verder wordt het buikvlies voor de incisie eerst lokaal verdoofd met 4% lidocaïne spray. Gebleken is dat 4 dagen na de operatie de buikwond zodanig hersteld is dat de dieren geen pijnstilling meer nodig hebben. Het plaatsen van osmotische pompjes subcutaan of intra peritoneaal zal ook onder een pre- en postoperatieve pijnstilling regiem (volgens richtlijnen) worden uitgevoerd.
I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen
Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?
nvt
Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.
nvt
Beschrijf welke maatregelen worden genomen om deze schadelijke effecten te voorkomen of waar mogelijk te minimaliseren.
nvt
J. Humane eindpunten
Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?
☐ Nee > Ga verder met vraag K.
☒ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.
In het nier fibrose model is het de bedoeling dat de dieren fibrose in de nieren ontwikkelen. De fibrose die ontstaat in de nieren veroorzaakt in de dieren geen pijn. De andere nier neemt zonder problemen de functie over. De druk in deze nier neemt toe, maar schade ontstaat heel langzaam in de tijd. We maken gebruik van een scoresysteem waarop de dieren dagelijks getoetst worden zodat de dieren zo min mogelijk onnodig zullen lijden. Als de score groter is dan 2 worden de dieren geëuthanaseerd. De dieren worden de eerste week na de operatie dagelijks beoordeeld op lichaamsgewicht. In de eerste 2-3 dagen na de operatie vallen de dieren allemaal af (~10%). Sommige dieren vallen echter in deze periode veel meer af door een bijkomende complicatie die zich voor kan doen na een buikoperatie. Dit komt echter zeer zelden voor. Mochten de dieren naast het gewichtsverlies ook andere symptomen laten zien (zoals het slecht reageren op prikkels) dan wordt besloten om over te gaan op het uitvoeren van het humane eindpunt. Om de dieren tijdens de studie goed te beoordelen gebruiken we een humane eindpunt formulier (zie hieronder weergegeven). Dit formulier gebruiken we in alle fibrose studies.
<u>Algemene humane eindpunten formulier:</u>
Dieren dienen te worden geëuthanaseerd indien een score van 2 of groter van onderstaande criteria in het experiment signaleerd worden:
<u>Ongeriefcode</u>
A Aanzienlijke gewichtsafname een aantal dagen achtereen (1)
B Abnormaal gedrag bijvoorbeeld:
B1 - benauwdheid/hijgen (1)
B2 - speekselvoed (1)
B3 - minder / niet reageren op prikkels (2)
B4 - aanhoudend trillen (2)
B5 - aanhoudend stuip trekken (2)
B6 - zelfverminking (2)
C Omhoog staan van de haren (1)
D Abnormale houding (1)
Welk percentage van de dieren loopt kans deze criteria te halen?
Uit historische data van studies zien we dat gemiddeld tussen 1 tot 5% van de dieren voortijdig uit studie

worden genomen omdat het ongerief hoger dan matig wordt.

K. Classificatie van ongerief

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

Onze naïeve controle groep zal licht ongerief ondervinden, deze groep wordt niet geopereerd en ontwikkelt geen ziekte verschijnselen. De UUO of nefrectomie dieren zullen maximaal matig ongerief ondervinden. De compound behandelde groepen zullen naar verwachting ook matig ongerief ondervinden.

De experimentduur van het UUO model varieert van 1 tot vier weken waarin de dieren maximaal een matig ongerief (cumulatief van alle handelingen) zullen ondervinden. Mocht dit ongerief overschreden worden dan zullen de dieren voortijdig uit het experiment worden gehaald (zie punt J voor de specifieke criteria). Dit wordt tijdens de studie bepaald door de algehele conditie van de dieren regelmatig te checken.

Echter, het is weleens voorgekomen (in 0.1% van de gevallen kan er sprake zijn van ernstig ongerief omdat er na de operatie een complicatie optreedt) dat dieren acuut verslechteren en we dit niet zagen aankomen. Dieren overlijden dan 's nachts en worden de volgende dag dood in de kooi aangetroffen.

Eenmalige nier fibrose inductie : UUO obstructie of nefrectomie onder isofluraan anesthesie :	matig ongerief
Nier fibrose ontwikkeling:	licht ongerief
Dagelijks/wekelijks wegen:	licht ongerief
Behandeling met therapeutica:	maximaal matig ongerief
Een of meermalen afnemen van bloed:	licht ongerief
Injectie met tracer stof:	licht ongerief
Euthanasie:	licht ongerief

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

☐ Nee

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

Onze primaire uitleesparameter is de hoeveelheid collageen gevormd in de nieren, dit meten we histologisch en biochemisch in de nier. De nier(en) moet dus worden geïsoleerd na het euthanaseren van de dieren.

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

☐ Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

☒ Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	50100	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	TNO	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		3.4.4.3	Huidfibrose in muis of rat

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Er is op dit moment geen goede therapie beschikbaar ter voorkoming of behandeling van huidfibrose. Voor het bepalen van de effectiviteit van nieuwe anti-fibrotica maken wij gebruik van het bleomycine-geïnduceerde huidfibrosemodel in muis of rat. Dit is wereldwijd het meest gebruikte model gericht op het testen van nieuwe therapieën op het gebied van huidfibrose. Het huidfibrose model wordt geïnduceerd door drie keer per week lokaal (subcutaan) een bleomycine oplossing in de huid te spuiten. Een bijeffect van dit model is dat er ook milde longfibrose ontstaat. Om in dit model zowel huid als longfibrose te kunnen behandelen, willen we een nieuw model ontwikkelen (combinatie model huid en long) waarin zich naast huidfibrose ook voldoende longfibrose ontwikkelt. Dit willen we gaan opzetten door oropharyngeal (zie bijlage 1, dierexperimenten en voorbeeld hieronder) een lage dosering bleomycinedosering in de longen te geven, naast het gebruikelijke subcutane injectie regiem.

Aan het preklinisch testen van nieuwe therapeutica gaat altijd een groot traject vooraf (zie 3.4 projectvoorstel). Op grond van de kennis uit dat traject zal in overleg met de partner een gedetailleerd studieplan worden opgesteld. Dit omvat o.a. de rationale voor het testen van de stof in een *in vivo* model en het werkingsmechanisme van de stof. Verder zullen in het studieplan de volgende aspecten worden vastgelegd (afhankelijk van de specifieke vraagstelling; deze zal per studie variëren):

- welke diersoort (muis / rat), geslacht (man / vrouw), stam (bijvoorbeeld C57Bl6/J of een transgene variant)
- beschrijving van de te testen stoffen, inclusief de te gebruiken concentratie(s)
- het tijdstip van start behandeling (preventief of therapeutisch)
- route van toediening
- frequentie van toediening (variërend van eenmalig tot tweemaal daags)
- experimentduur (de meeste studies zullen vijf weken duren, maximaal 7 weken indien er profylactisch of therapeutisch behandel regiem wordt gevolgd). De looptijd zal per studie aan de IvD worden onderbouwd.

- noodzaak voor tussentijdse bloedafname voor bijvoorbeeld een PK analyse.

Een voorbeeld van een veel gebruikt studie design voor het testen van nieuwe therapeutica in een therapeutisch behandel regime ziet er als volgt uit:

						Days							
Groep	Inductie	Behandeling	Route	Dosering	n	-1	0	7	14	21	28	35	
1	PBS	Vehikel	PO;BID	—	7			x				†	
2	Bleomycine	Vehikel	PO;BID	—	12			x				†	
3	Bleomycine	Comp. A	PO;BID	20 mg/kg	12			x				†	
4	Bleomycine	Comp. B	PO;BID	20 mg/kg	12			x				†	
5	Bleomycine	Comp. C	PO;BID	20 mg/kg	12			x				†	
6	Bleomycine	Referentie compound	PO;BID	50 mg/kg	12			x				†	
Matchen van de dieren						x							
Fibrose inductie (sc BLM/ 3x per week)							x	x	x	x	x	x	
Body weight (3x per week)							x	x	x	x	x	x	
Behandeling (dag 7) met compound (2x daags oraal)								x	x	x	x	x	
Euthanasie + collectie plasma & weefsel (huid)												x	

Een voorbeeld van modelontwikkeling van huid - long combinatie model:

				Dagen																																											
Groep	Inductie	OP-dosering	n	-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35							
1	PBS		7		x																																										
2	Bleomycine	5 IU	12		x																																										
3	Bleomycine	10 IU	12		x																																										
4	Bleomycine	15 IU	12		x																																										
Inductie (OP bleomycine in de long)					x																																										
Fibrose inductie huid (sc 3x per week)					x	x	x	x				x	x	x				x	x	x				x	x	x				x	x	x				x	x	x									
Body weight (3x per week)				x	x	x	x				x	x	x				x	x	x				x	x	x				x	x	x				x	x	x										
Euthanasie + collectie plasma & weefsel (huid en long)																																															

De primaire uitleesparameters voor deze studie zijn het bepalen van de hoeveelheid fibrose in de dermis m.b.v. histologische analyse en/of het kwantificeren van de hoeveelheid collageen in de huid als maat voor de mate van verbindweefseling (biochemische analyse). Voor het combinatie model worden naast de huid ook in de long lobben bovenstaande parameters gekwantificeerd.

Daarnaast kan, afhankelijk van de exacte vraagstelling, een groot aantal additionele parameters bepaald worden. Voorbeelden zijn: nat gewicht van de longen, bepalingen in long lavage vloeistof en/of serum/plasma/urine, RNA-analyses, nieuw collageen analyse mbv gedeutereerd water (D₂O) inbouw, etc.

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

In de muis wordt huid fibrose (en als bijeffect ook milde longfibrose) geïnduceerd door een bleomycine sulfaatoplossing 3 maal per week subcutaan in de geschoren huid te injecteren.

Na de eerste bleomycine injectie neemt het lichaamsgewicht iets af, maar het lichaamsgewicht herstelt zich snel. Voorafgaand aan de 1e bleomycine injecties en aan het eind van de studie zal de externe huiddikte van de muizen worden gemeten, dit gebeurt onder een isofluraan roesje.

Afhankelijk van de vraagstelling van de klant zal een behandelstrategie van de uit te testen compound worden opgesteld, deze zal per studie variëren. Mogelijke variaties zijn:

- het tijdstip van de behandeling (profylactisch of therapeutisch),
- experiment duur (meestal vijf weken, maar dit kan ook korter of langer zijn)
- metingen van externe huiddikte (met welk interval; wekelijks of alleen bij start en eind studie)
- route en frequentie van compound toediening (waaronder inhalatie, oraal, intra-nasaal, intra-tracheaal, intra-peritoneaal, intraveneus, subcutaan, via osmotische pompjes, sublinguaal of intramusculair).
- tussentijdse bloedafname voor bv PK analyse (Het maximaal af te nemen volume wordt gehandhaafd volgens de 'good practice' guideline van Diehl et al.)
- lichaamsgewicht bepaling als maat voor welzijn (2 of 3x per week standaard, maar bij gewichtsafname ook dagelijks). Bij ernstig gewichtsverlies (>25%) of als de dieren ademhalingsproblemen hebben en slecht reageren op externe prikkels zullen de dieren voortijdig uit experiment worden genomen.
- toediening van labels/tracers via intraperitoneale injectie of drinkwater (bv zwaar water (D₂O) of BrdU).
- non-invasieve (in house) imaging (bijvoorbeeld schade vaststellen aan orgaan met een µCT scan of EchoMRI)
- korte of langere tijd (maximaal 5 uur) vasten voor isoleren van bloed of urine
- euthanasie methode waarna isolatie van bloed, huid en/of longvloeistof en longen zal plaatsvinden om de primaire uitleesparameters van de studie te kunnen analyseren.

Het injectievolume van de test compound(s) of tracers zal variëren tussen 5 en 10 ml/kg, maar uiterlijk de

maximale verdraagbare dosis per injectieplaats zoals staat vermeld in de 'good practice' guideline van Diehl et al.

Details van de studie worden beschreven in het studieplan en voorafgaand aan de studie met de IvD afgestemd.

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

Voor elk studieplan zal een separate power analyse worden uitgevoerd om tot een zo accuraat mogelijke bepaling van het aantal benodigde dieren te komen. Hierbij worden onder andere de volgende gegevens gebruikt:

- Meest recente inschatting van de variatie binnen het model (model vertoont lichte variatie in de tijd)
- Exacte looptijd van experiment (fibrosevorming is tijdsafhankelijk)
- Primaire uitleesparameter (gevoeligheid van de verschillende variabelen is verschillend)
- Gewenste mate van gevoeligheid (dit is een keuze: als bijvoorbeeld eerdere varianten van een te testen stof al een verbetering van 30% lieten hoeft alleen gekeken worden of een nieuwe variant beter is. Dan zou een verbetering van 50% genoeg zijn, terwijl als een pathway nog nooit eerder getest is kan het goed zijn om het experiment gevoeliger in te zetten (bv een gewenste gevoeligheid van 35%))
- Welke vergelijkingen noodzakelijk zijn (als alle groepen vergeleken worden liggen gelijke groepsgroottes voor de hand; als alles alleen met bijvoorbeeld de bleomycine controle groep wordt vergeleken kan beter met ongelijke groepsgroottes worden gewerkt)

Als voorbeeld gebaseerd op een power analyse $\alpha = 0.05$ en $1-\beta < 0.90$ voor de detectie van een significante vermindering in collageen hoeveelheid in de dermis van 35% is een groepsgrootte van 9 dieren noodzakelijk. We houden er rekening mee dat we 5-10% van de dieren per groep zullen uitvallen door ernstig gewichtsverlies of andere ernstige klinische verschijnselen gerelateerd aan het ziektemodel. Dit komt echter zelden voor. Dit brengt de groepsgrootte naar 10 dieren per groep.

Omdat we weinig variatie in de negatieve controle groep verwachten (PBS geïnjecteerd en vehikel behandelde groep) en deze groep voornamelijk wordt gebruikt om de mate van fibrose inductie te bepalen zijn hier minder dieren noodzakelijk.

In dit voorbeeld wordt gerekend met een power van 0.90. Het hanteren van een hogere power geeft een grotere kans weer dat de gekozen groepsgrootte de werkelijkheid inderdaad benaderd.

Wanneer het aantal dieren per groep afwijkt van de hierboven beschreven standaard zal de berekening aan de IvD in het afzonderlijke studieplan worden voorgelegd.

NB de ervaring leert dat er over de jaren variatie kan plaatsvinden m.b.t. welke fibrose modellen het meest toegepast worden. Dit betekent dat het maximale aantal dieren dat onder deze aanvraag gebruikt zal worden naar verwachting aanmerkelijk lager zal liggen dan een simpele optelsom van de aantallen vermeld in de vier bijlagen bij deze projectaanvraag doet vermoeden.

B. De dieren

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

Voor het bleomycine geïnduceerde-huidfibrose model wordt voornamelijk gewerkt met vrouwelijke C57BL/6J of DB/A muizen variërend in leeftijd van 6-10 weken oud. **Echter kunnen voor dit type onderzoek ook mannelijke muizen gebruikt worden, geslacht validatie staat op dit moment ingepland.**

De hierboven beschreven stammen/sexe zijn al eerder door ons gebruikt en het huidfibrose model is hierop uitgebreid gevalideerd.

De meeste studies zullen in de muis worden uitgevoerd. Echter kan dit model ook in de rat worden uitgevoerd. Reden om voor het rat model te kiezen zijn o.a. verschillen in werkzaamheid van de therapeutica tussen de species (bv species specifieke antilichamen, verschillen in metabolisme van de compound tussen de species), maar ook beschikbaarheid van data in 1 van de species (het hele voortraject incl. PK studies is bijvoorbeeld in de rat uitgevoerd).

Indien een andere muis stam nodig is voor het uitvoeren van een studie of het ontwikkelen van een nieuw model zal dit in het studieplan aan de IvD worden onderbouwd.

Het totaal aantal dieren per studie kan variëren en is afhankelijk van het aantal dieren per groep en het aantal groepen. Het aantal groepen in een studie wordt in samenspraak met de klant bepaald door de voorliggende vraagstelling en de groepsgrootte wordt bepaald aan de hand van de power analyse van het te verwachten effect. Details worden voorafgaand aan de studie afgestemd met de IvD.

Gebaseerd op een verwacht aantal huid fibrose studies van 10-12 per jaar met max 100 muizen per studie wordt het aantal benodigde muizen op maximaal 6000 geschat voor een periode van 5 jaar (12 studies x max. 100 dieren/studie x 5 jaar). De aanvraag voor huidfibrose studies in de rat ligt lager, we verwachten maximaal 2 aanvragen per jaar. Een gemiddelde studie omvat 100 ratten, voor een periode van 5 jaar schatten we 1000 ratten nodig te hebben.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☒ Nee, ga door met vraag D.

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

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

☒ Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging:

De medicijnen die in onze huidfibrose modellen getest worden, zijn geselecteerd op basis van een uitgebreid voortraject. Dit heeft al bij de partner plaatsgevonden. In dit soort trajecten zijn in de afgelopen decennia grote stappen gemaakt in het vervangen van *in vivo* studies door *in vitro/ex vivo* efficacy experimenten. Echter voor de laatste stap, voordat het klinische programma gestart kan worden, is preklinisch testen in dieren tot nu toe nog noodzakelijk.

Vermindering:

Door optimalisaties van het model proberen we bij te dragen aan vermindering van het aantal benodigde dieren. Zo zijn we bezig een huid-long combinatie model op te zetten, om in dit model ook meer longfibrose te genereren. We hopen zo in 1 ziektemodel het effect op twee organen te kunnen monitoren.

Verfijning:

De dierstudies worden uitgevoerd volgens een vooraf vastgelegd studieprotocol, de medewerkers op deze studies zijn zeer ervaren en goed getraind. Hierdoor heeft de studie een maximale kwaliteit en wordt stress en ongemak voor de dieren zo laag mogelijk gehouden. De fibrose ontwikkeling kan een nadelig effect hebben op het welzijn van de dieren. Dagelijks wordt dan ook de algehele gezondheid gecontroleerd.

Bij verminderd welzijn van de dieren (als het ongerief meer dan matig wordt) zullen de dieren voortijdig uit de studie worden genomen.

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

Om angst en pijn voor de dieren zo veel mogelijk te verminderen, zal de externe huiddikte worden gemeten onder anesthesie. Verder worden alle werkzaamheden per studie door een klein aantal goed getrainde biotechnici uitgevoerd. Injectie van vloeistoffen zullen voor inspuiten eerst op lichaamstemperatuur worden gebracht. Bij het plaatsen van bv een pompje onder de huid of in de buikholte, krijgt het dier altijd pre en postoperatief pijnbestrijding toegediend.

Het welzijn van de dieren wordt dagelijks objectief beoordeeld door verschillende personen. Indien er duidelijke tekenen van onverwacht ernstig ongerief optreden, zullen de dieren geëuthanaseerd worden. Om uiteindelijk

over te gaan tot een humaan eindpunt, hebben wij een scoresysteem opgesteld waarop de dieren getoetst worden. Dit zal het geval zijn als de dieren niet meer eten of drinken, hierdoor ernstig gewicht verliezen (> 25%), slecht reageren op prikkels en/of ademhalingsproblemen hebben (zie J).

De dieren worden gehuisvest onder DMI condities en zullen geen gevaar opleveren voor het milieu.

Afvalmateriaal uit de dierstudie (o.a. dierlijk weefsel, gecontamineerd beddingmateriaal of de bleomycine oplossing) wordt na afloop zorgvuldig gescheiden van het huishoudelijk afval en op juiste wijze afgevoerd.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

n.v.t.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

☒ Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

☒ Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

☐ Nee > Ga verder met vraag I.

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

☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

Om eventueel naast de huidfibrose ook nog extra longfibrose te induceren zullen de dieren onder een roesje van isofluraan gebracht worden, dit is om te zorgen dat de dieren stilliggen en goed de bleomycineoplossing zullen inademen. Het plaatsen van osmotische pompjes subcutaan of intra peritoneaal

wordt uitgevoerd onder een pre- en postoperatieve pijnstilling regiem (volgens wettelijk geldende richtlijnen).

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

n.v.t

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

n.v.t

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

n.v.t

J. Humane eindpunten

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

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

☒ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

In het huidfibrose model is het de bedoeling dat er lokaal op de plek van injectie huidfibrose ontstaat. Het dier heeft hier geen last van. Echter zal zich in de dieren ook een zeer milde vorm van longfibrose ontwikkelen, waar de dieren geen last van hebben.

Om de dieren goed te monitoren maken we gebruik van een scoresysteem waarop de dieren dagelijks getoetst worden zodat de dieren zo min mogelijk onnodig zullen lijden indien ze toch onverwacht verslechteren.

Als de score groter is dan 2 worden de dieren geëuthanaseerd. Dit komt echter zeer zelden voor. Mochten de dieren naast het gewichtsverlies ook andere symptomen laten zien (zoals het slecht reageren op prikkels) dan wordt besloten om over te gaan op het uitvoeren van het humane eindpunt.

Om de dieren tijdens de studie goed te beoordelen gebruiken we een humane eindpunt formulier (zie hieronder weergegeven). Dit formulier gebruiken we in alle fibrose studies.

Algemene humane eindpunten formulier:

Dieren dienen te worden geëuthanaseerd indien een score van 2 of groter van onderstaande criteria in het experimentesignaleerd worden:

Ongeriefcode

- | | |
|-----------|--|
| A | Aanzienlijke gewichtsafname een aantal dagen achtereen (1) |
| B | Abnormaal gedrag bijvoorbeeld: |
| B1 | - benauwdheid/hijgen (1) |
| B2 | - speekselvoed (1) |
| B3 | - minder / niet reageren op prikkels (2) |
| B4 | - aanhoudend trillen (2) |
| B5 | - aanhoudend stuiptrekken (2) |
| B6 | - zelfverminking (2) |
| C | Omhoog staan van de haren (1) |
| D | Abnormale houding (1) |

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

Uit historische data van studies zien we dat gemiddeld tussen 1 tot 5 % van de dieren voortijdig uit studie worden genomen omdat het ongerief hoger dan matig wordt.

K. Classificatie van ongerief

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

Onze negatieve controle groep zal licht ongerief ondervinden, deze groep ontwikkelt geen ziekte verschijnselen. De bleomycine-geïnduceerde groepen zullen maximaal matig ongerief ondervinden en de compound behandelde groepen zullen naar verwachting licht tot matig ongerief ondervinden, omdat de compound mogelijk de fibrose vorming vermindert.

Echter, het komt voor (in 0.5% van de gevallen kan er sprake zijn van ernstig ongerief omdat er naast huidfibrose ook meer dan matige longfibrose is ontstaan) dat dieren acuut verslechteren en we dit niet zagen aankomen. Dieren overlijden dan 's nachts en worden de volgende dag dood in de kooi aangetroffen.

De experimentduur van onze modellen varieert van 1 tot enkele weken waarin de dieren maximaal een matig

ongerief (cumulatief van alle handelingen) zullen ondervinden. Mocht dit ongerief overschreden worden dan zullen de dieren voortijdig uit het experiment worden gehaald (zie punt J voor de specifieke criteria). Dit wordt tijdens de studie bepaald door de algehele conditie van de dieren regelmatig te checken.

Meermalen per week subcutaan injecteren van bleomycine oplossing:	licht ongerief
Huidfibrose als gevolg van de s.c. bleomycine behandeling:	licht ongerief
Milde longfibrose als gevolg van de s.c. bleomycine inductie:	licht-matig ongerief
Eenmalige oropharyngaele toediening van bleomycine onder inhalatie anesthesie*:	licht ongerief
Longfibrose als gevolg van extra oropharyngeale bleomycine inductie*:	matig ongerief
Metten van externe huiddikte onder inhalatie anesthesie:	licht ongerief
2 tot 3 maal per week wegen wegen:	licht ongerief
Behandeling met therapeutica:	maximaal matig ongerief
Eén of meermalen afnemen van bloed:	licht ongerief
Injectie met tracer stof:	licht ongerief
Euthanasie:	licht ongerief

*Dit is van toepassing op het gecombineerde huid-long model

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

☐ Nee

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

Onze primaire uitleesparameter is de hoeveelheid collageen gevormd in de huid en longen, dit meten we histologisch en biochemisch in de verschillende huidbiopten en long lobben. Er moet dus weefsel worden geïsoleerd na het euthanaseren van de dieren.

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

☐ Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

☒ Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	50100	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	TNO	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		3.4.4.4	Leverfibrose in muis of rat

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Er is op dit moment geen goede therapie beschikbaar ter voorkoming of behandeling van leverfibrose. Voor het bepalen van de effectiviteit van nieuwe anti-fibrotica maken wij gebruik van het CCl₄-geïnduceerde leverfibrose muismodel. Dit is wereldwijd het meest gebruikte model gericht op het testen van nieuwe therapieën op het gebied van leverfibrose. Om leverfibrose te induceren krijgen de dieren vanaf dag 0 drie keer in de week, intra-peritoneaal CCl₄ opgelost in mineraal olie toegediend om leverschade te induceren.

Aan het preklinisch testen van nieuwe therapeutica gaat altijd een groot traject vooraf (zie 3.4 projectvoorstel). Op grond van de kennis uit dat traject zal in overleg met de partner een gedetailleerd studieplan worden opgesteld. Dit omvat o.a. de rationale voor het testen van de stof in een *in vivo* model en het werkingsmechanisme van de stof. Verder zullen in het studieplan de volgende aspecten worden vastgelegd (afhankelijk van de specifieke vraagstelling; deze zal per studie variëren):

- welke diersoort (muis / rat), geslacht (man / vrouw), stam (bijvoorbeeld C57Bl6/J of een transgene variant)
- beschrijving van de te testen stoffen, inclusief de te gebruiken concentratie(s)
- het tijdstip van start behandeling (preventief of therapeutisch)
- route van toediening
- frequentie van toediening (variërend van eenmalig tot tweemaal daags)
- experimentduur (meestal vier weken (profylactisch behandelregiem) of zes weken (therapeutisch behandelregiem)). De looptijd zal per studie aan de IvD worden onderbouwd.- noodzaak voor tussentijdse bloedafname voor bijvoorbeeld een PK analyse.

Een voorbeeld van een veel gebruikt studie design voor het profylactisch testen van nieuwe therapieën ziet er als volgt uit:

days:						-7	0	2	3	4	7	9	10	11	14	16	17	18	21	23	24	25	28
Groep	Inductie	Behandeling	Route	Dosering	n																		
1	Mineral Oil	vehikel	i.p. (2x week)	--	7	x																	†
2	CCl ₄	vehikel	i.p. (2x week)	--	10	x																	†
3	CCl ₄	Compound -1	i.p. (2x week)	10 mg/kg	10	x																	†
4	CCl ₄	Compound -2	i.p. (2x week)	25 mg/kg	10	x																	†
5	CCl ₄	Compound -3	i.p. (2x week)	30 mg/kg	10	x																	†
Body weight (3x week)						x	x	x		x	x	x		x	x	x		x	x	x		x	x
CCl ₄ of minerale olie injectie (i.p., 3x week)							x	x		x	x	x		x	x	x		x	x	x		x	
Behandeling (i.p., 2x week)							x		x		x		x		x		x		x		x		
Euthanasie + collectie plasma & weefsel (lever)																							x

Een voorbeeld van het leverfibrose model in de vorm van een tijdreeks voor het verkrijgen van genexpressie data en biomarker materiaal:

days:						-7	0	2	3	4	7	9	10	11	14	16	17	18	21	23	24	25	28
Groep	Inductie	D2O bolus	D2O drinkingwater		n																		
1	Mineral Oil	D0	D0-28		8	x																	†
2	CCl ₄	D0	D0-D7		8	x																	†
3	CCl ₄	D7	D7-D14		8	x																	†
4	CCl ₄	D14	D14-D21		8	x																	†
5	CCl ₄	D21	D21-D28		8	x																	†
Body weight (3x week)						x	x	x		x	x	x		x	x	x		x	x	x		x	x
CCl ₄ of minerale olie injectie (i.p., 3x week)							x	x		x	x	x		x	x	x		x					
D2O bolus (via ip injectie)							x			x				x				x					
8% D2O administration (via het drink water)							x	x	x	x	x	x		x	x	x		x	x	x		x	x
Urine / plasma collectie							x			x				x				x				x	
Euthanasie + collectie plasma & weefsel (lever)										x				x				x				x	

De primaire uitleesparameters voor deze studie zijn het bepalen van de hoeveelheid fibrose in de lever m.b.v. histologische analyse en/of het kwantificeren van de hoeveelheid collageen in de lever als maat voor de mate van verbindweefseling (biochemische analyse).

Daarnaast kan, afhankelijk van de exacte vraagstelling, een groot aantal additionele parameters bepaald worden. Voorbeelden zijn: nat gewicht van de lever lobben, bepalingen in serum/plasma/urine, RNA-analyses, nieuw collageen analyse m.b.v. gedeutereerd water (D₂O) inbouw, etc.

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

In de muis wordt leverfibrose geïnduceerd door CCl₄ opgelost in minerale olie drie keer per week intra-peritoneaal in te spuiten (0.75 ml/kg; 5 ml/kg). De controlegroep krijgt alleen minerale olie geïnjecteerd. Langdurige blootstelling aan CCl₄ veroorzaakt in de lever cirrose en fibrose doordat het schade aan de hepatocyten veroorzaakt door de gevormde radicaal metabolieten. Hierdoor ontstaat centrolobulair milde necrose en fibrose. Na de eerste CCl₄ injectie neemt het lichaamsgewicht van de muizen wat af (5-10%). Dit herstelt zich in de eerste week van de studie vaak weer.

Afhankelijk van de vraagstelling van de klant zal een behandelstrategie van de uit te testen compound worden opgesteld, deze zal per studie variëren. Mogelijke variaties zijn:

- het tijdstip van de behandeling (profylactisch of therapeutisch),
- experiment duur (meestal vier tot zes weken, maar dit kan ook korter of langer zijn)
- route en frequentie van compound toediening (waaronder inhalatie, oraal, intra-nasaal, intra-tracheaal, intra-peritoneaal, intraveneus, subcutaan, via osmotische pompjes, sublinguaal of intramusculair).
- tussentijdse bloedafname voor bv PK analyse (Het maximaal af te nemen volume wordt gehandhaafd volgens de 'good practice' guideline van Diehl *et al.*)
- lichaamsgewicht bepaling als maat voor welzijn (2 of 3x per week standaard, maar bij gewichtsafname ook dagelijks). Bij ernstig gewichtsverlies (>25%) of als de dieren ademhalingsproblemen hebben en slecht reageren op externe prikkels zullen de dieren voortijdig uit experiment worden genomen.
- toediening van labels/tracers via intra-peritoneale injectie of drinkwater (bv zwaar water (D₂O) of BrdU).

- non-invasieve (in house) imaging (bijvoorbeeld schade vaststellen aan orgaan met een μ CT scan of EchoMRI)
- korte of langere tijd (maximaal 5 uur) vasten voor isoleren van bloed of urine
- euthanasie methode waarna isolatie van bloed, longvloeistof en longen zal plaatsvinden om de primaire uitleesparameters van de studie te kunnen analyseren.

Het injectievolume van de test compound(s) of tracers zal variëren tussen 5 en 10 ml/kg, maar uiterlijk de maximale verdraagbare dosis per injectieplaats zoals staat vermeld in de 'good practice' guideline van Diehl *et al.*

Details van de studie worden beschreven in het studieplan en voorafgaand aan de studie met de IvD afgestemd.

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

Voor elk studieplan zal een separate power analyse worden uitgevoerd om tot een zo accuraat mogelijke bepaling van het aantal benodigde dieren te komen. Hierbij worden onder andere de volgende gegevens gebruikt:

- Meest recente inschatting van de variatie binnen het model (model vertoont lichte variatie in de tijd)
- Exacte looptijd van experiment (fibrosevorming is tijdsafhankelijk)
- Primaire uitleesparameter (gevoeligheid van de verschillende variabelen is verschillend)
- Gewenste mate van gevoeligheid (dit is een keuze: als bijvoorbeeld eerdere varianten van een te testen stof al een verbetering van 30% lieten hoeft alleen gekeken worden of een nieuwe variant beter is. Dan zou een verbetering van 50% genoeg zijn, terwijl als een pathway nog nooit eerder getest is kan het goed zijn om het experiment gevoeliger in te zetten (bv een gewenste gevoeligheid van 20%))
- Welke vergelijkingen noodzakelijk zijn (als alle groepen vergeleken worden liggen gelijke groepsgroottes voor de hand; als alles alleen met bijvoorbeeld de CCl₄ controle groep wordt vergeleken kan beter met ongelijke groepsgroottes worden gewerkt)

Als voorbeeld: gebaseerd op een power analyse met $\alpha = 0.05$ en $1-\beta < 0.80$ voor de detectie van een significante vermindering in collageen in de lever van 30% is een groepsgrootte van 9 dieren noodzakelijk (als alle groepen met elkaar vergeleken worden).

We houden er rekening mee dat per groep 5-10% dieren voortijdig uit experiment moeten worden gehaald door ernstig gewichtsverlies of andere ernstige klinische verschijnselen gerelateerd aan het i.p. inspuiten van CCl₄ om deze ziekte te induceren. Wanneer CCl₄ per ongeluk in het colon of de nier wordt gespoten, sterft het dier een paar minuten na de injectie. We passen daarom de groepsgrootte aan naar 10 dieren per groep.

Omdat we weinig variatie in de negatieve controle groep verwachten (saline geïnduceerde en vehikel behandelde groep) en deze groep voornamelijk wordt gebruikt om de mate van inductie te bepalen zijn hier minder dieren noodzakelijk, te weten 6-8.

In deze studie rekenen we met een power van 0.80. Soms wordt in overleg met de klant besloten om de power te verhogen naar 0.90. Het hanteren van een hogere power geeft een grotere kans weer dat de gekozen groepsgrootte de werkelijkheid inderdaad benaderd.

Wanneer het aantal dieren per groep afwijkt van de hierboven beschreven standaard zal de berekening aan de IvD in het afzonderlijke studieplan worden voorgelegd.

B. De dieren

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

Voor het CCl₄ geïnduceerde-leverfibrose muis model kan gewerkt worden met mannelijk C57BL/6J muizen variërend in leeftijd van 8-12 weken oud. Vrouwelijke C57BL/6J muizen ontwikkelen minder leverfibrose bij dezelfde CCl₄ dosis dan mannelijke dieren (uit eigen studies en discussies met partners bekend).

De hierboven beschreven stam/sexe zijn al eerder door ons gebruikt en het huidige model is hierop uitgebreid gevalideerd. De meeste studies zullen in muis worden uitgevoerd. Wij krijgen in toenemende mate verzoeken om stoffen in de rat te testen. Indien dit inderdaad noodzakelijk blijkt, zal dit model eerst verder in ratten gevalideerd worden. In deze validatie zal ook gekeken worden of de bij muizen waargenomen geslachtsafhankelijke verschillen ook in de rat op treden. Op basis hiervan zal besloten worden of beide geslachten bruikbaar zijn om voor een lever fibrose studie in te zetten.

Redenen om voor een ratmodel te kiezen zijn o.a. verschillen in werkzaamheid van de therapeutica tussen de

species (bv species specifieke antilichamen, verschillen in metabolisme van de compound tussen de species), maar ook beschikbaarheid van data in 1 van de species (het hele voortraject incl. PK studies is in rat uitgevoerd).

Indien een andere muis of rat stam nodig is, zal dit in het studieplan aan de IvD worden onderbouwd.

Het totaal aantal dieren per studie kan variëren en is afhankelijk van het aantal dieren per groep en het aantal groepen. Het aantal groepen in een studie wordt in samenspraak met de klant bepaald door de voorliggende vraagstelling en de groepsgrootte wordt bepaald aan de hand van de power analyse van het te verwachten effect. Details worden voorafgaand aan de studie afgestemd met de IvD.

Gebaseerd op een verwacht aantal leverfibrose studies van 10-12 per jaar met max 100 muizen per studie wordt het aantal benodigde muizen op maximaal 6000 geschat voor een periode van 5 jaar (12 studies x max. 100 dieren/studie x 5 jaar). De aanvraag voor rat leverfibrose studies ligt lager, we verwachten maximaal 2 aanvragen per jaar. Een studie omvat 60-100 ratten per studie, voor een periode van 5 jaar schatten we 1000 ratten nodig te hebben. Dit is inclusief het aantal ratten die voor validatie van het model nodig zullen zijn.

NB de ervaring leert dat er over de jaren variatie kan plaatsvinden m.b.t. welke fibrose modellen het meest toegepast worden. Dit betekent dat het maximale aantal dieren dat onder deze aanvraag gebruikt zal worden naar verwachting aanmerkelijk lager zal liggen dan een simpele optelsom van de aantallen vermeld in de vier bijlagen bij deze projectaanvraag doet vermoeden.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☒ Nee, ga door met vraag D.

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

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

☒ Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging:

De farmaca die in onze leverfibrose modellen getest worden, zijn geselecteerd op basis van een uitgebreid voortraject. Dit heeft al bij de partner plaatsgevonden. In dit soort trajecten zijn er in de afgelopen decennia grote stappen gemaakt in het vervangen van *in vivo* studies door *in vitro/ex vivo* efficacy experimenten. Echter, voor de laatste stap, voordat het klinische programma gestart kan worden, is preklinisch testen in dieren tot nu toe nog noodzakelijk.

Vermindering:

Door optimalisaties van het model proberen we bij te dragen aan vermindering van het aantal benodigde dieren. Verder willen we voor dit model uitgebreide mRNA datasets gaan verzamelen waardoor van tevoren al kan worden gekeken of bepaalde pathways relevant zijn voor dit model.

Verfijning:

De dierstudies worden uitgevoerd volgens een vooraf vastgelegd studieprotocol, de medewerkers op deze studies zijn zeer ervaren en goed getraind. Hierdoor heeft de studie een maximale kwaliteit en wordt stress en ongemak voor de dieren zo laag mogelijk gehouden. De fibrose ontwikkeling kan een nadelig effect hebben op het welzijn van de dieren. Dagelijks wordt dan ook de algehele gezondheid gecontroleerd.

Bij verminderd welzijn van de dieren (als het ongerief meer dan matig wordt) zullen de dieren voortijdig uit de studie worden genomen.

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

Alle werkzaamheden per studie worden door een gering aantal goed getrainde biotechnici uitgevoerd. Injectie vloeistoffen zullen voor inspuiten eerst op lichaamstemperatuur worden gebracht. Bij het plaatsen van bv een osmotisch pompje onder de huid of in de buikholte, krijgt het dier altijd pre- en postoperatief pijnbestrijding toegediend.

Het welzijn van de dieren wordt dagelijks objectief beoordeeld door verschillende personen. Indien er duidelijke tekenen van onverwacht ernstig ongerief optreden, zullen de dieren geëuthanaseerd worden. Om uiteindelijk over te gaan tot een humaan eindpunt, hebben wij een scoresysteem opgesteld waarop de dieren getoetst worden. Dit zal het geval zijn als de dieren niet meer eten of drinken, hierdoor ernstig gewicht verliezen (> 25%) en/of slecht reageren op externe prikkels (zie J).

De dieren worden gehuisvest onder DMI condities en zullen geen gevaar opleveren voor het milieu. Afvalmateriaal uit de dierstudie (o.a. dierlijk weefsel, CCl₄ oplossing) wordt na afloop zorgvuldig gescheiden van het huishoudelijk afval en op juiste wijze afgevoerd.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

N.v.t. dit is geen wettelijk vereist onderzoek

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

☒ Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

☒ Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

☐ Nee > Ga verder met vraag I.

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

☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

Het plaatsen van osmotische pompjes subcutaan of intra peritoneaal zal ook onder een pre- en postoperatief pijnstillingsregiem (volgens wettelijk geldende richtlijnen) worden uitgevoerd.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

n.v.t

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

n.v.t

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

n.v.t

J. Humane eindpunten

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

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

☒ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

In het leverfibrose model is het de bedoeling dat de dieren fibrose in de lever ontwikkelen. De fibrose die ontstaat in de lever veroorzaakt zelf geen pijn in de dieren. We zien wel dat na de eerste CCl₄ injecties de dieren soms een geringe gewichtsafname (5-10%) laten zien. Meestal zijn de dieren binnen een week weer op het startgewicht.

Verder worden de dieren behandeld met therapeutica, dit kan het welzijn van de dieren negatief beïnvloeden. Om de dieren goed te monitoren maken we gebruik van een scoresysteem waarop de dieren dagelijks getoetst worden zodat de dieren zo min mogelijk onnodig zullen lijden indien ze toch onverwacht verslechteren. Dit scoresysteem is oorspronkelijk ontwikkeld voor het beoordelen van muizen met longfibrose, maar wordt nu ook toegepast bij de overige fibrosemodellen.

Als de score groter is dan 2 worden de dieren geëuthanaseerd. Dit komt echter zeer zelden voor. Mochten de dieren naast het gewichtsverlies ook andere symptomen laten zien (zoals het slecht reageren op prikkels) dan wordt besloten om over te gaan op het uitvoeren van het humane eindpunt.

Om de conditie van de dieren tijdens de studie goed te kunnen beoordelen gebruiken we een humane eindpunt formulier (zie hieronder weergegeven). Dit formulier gebruiken we in alle fibrose studies.

Algemene humane eindpunten formulier:

Dieren dienen te worden geëuthanaseerd indien een score van 2 of groter van onderstaande criteria in het experiment gesignaleerd worden:

Ongeriefcodes

A Aanzienlijke gewichtsafname een aantal dagen achtereen (1)

B Abnormaal gedrag bijvoorbeeld:

B1 - benauwdheid/hijgen (1)

B2 - speekselvloed (1)

B3 - minder / niet reageren op prikkels (2)

B4 - aanhoudend trillen (2)

B5 - aanhoudend stuip trekken (2)

B6 - zelfverminking (2)

C Omhoog staan van de haren (1)

D Abnormale houding (1)

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

Uit historische data van studies zien we dat gemiddeld tussen 1 tot 5% van de dieren voortijdig uit studie worden genomen omdat het ongerief hoger dan matig wordt.

K. Classificatie van ongerief

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

Onze negatieve controlegroep zal licht ongerief ondervinden, deze groep ontwikkelt geen ziekteverschijnselen. De CCl₄ geïnduceerde groepen zullen maximaal matig ongerief ondervinden en de compound behandelde groepen zullen naar verwachting licht tot matig ongerief ondervinden, omdat de compound mogelijk de fibrose vorming vermindert.

Echter, het komt soms voor (in 0.5% van de gevallen kan er sprake zijn van ernstig ongerief door leverfibrose) dat dieren acuut verslechteren en we dit niet zagen aankomen. Dieren overlijden dan 's nachts en worden de volgende dag dood in de kooi aangetroffen.

De experimentduur van onze modellen varieert van minimaal 4 tot ca. 6 weken waarin de dieren maximaal een matig ongerief (cumulatief van alle handelingen) zullen ondervinden. Mocht dit ongerief overschreden worden dan zullen de dieren voortijdig uit het experiment worden gehaald (zie punt J voor de specifieke criteria). Dit wordt tijdens de studie bepaald door de algehele conditie van de dieren regelmatig te checken.

Drie keer per week i.p. injecteren van CCl ₄ oplossing:	matig ongerief
Lever ontsteking als gevolg van CCl ₄ toediening:	licht ongerief
Dagelijks/wekelijks wegen:	licht ongerief
Behandeling met medicijnen/compound:	maximaal matig ongerief
Een of meermalen afnemen van bloed:	licht ongerief
Injectie met tracer stof:	licht ongerief
Euthanasie:	licht ongerief

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

☐ Nee

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

Onze primaire uitleesparameter is de hoeveelheid collageen gevormd in de lever, dit meten we histologisch en biochemisch in de verschillende lever lobben. De lever moet dus worden geïsoleerd na het euthanaseren van de dieren.

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

☐ Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

☒ Ja

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer :
2. Titel van het project : Het bepalen en valideren van de effectiviteit van nieuwe geneesmiddelen en het onderzoeken van de mechanismen die betrokken zijn in het ontstekings- en fibrose proces m.b.v. in vivo fibrose modellen.
3. Titel van de NTS : Het bepalen en valideren van de effectiviteit van nieuwe geneesmiddelen en het onderzoeken van de mechanismen die betrokken zijn in het ontstekings- en fibrose proces in diermodellen

4. Type aanvraag:

- ☒ nieuwe aanvraag projectvergunning
☐ wijziging van vergunning met nummer:

5. Contactgegevens DEC

Naam DEC : DEC TNO

Telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]

Emailadres contactpersoon: [REDACTED]

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

- ☒ ontvangen door DEC: 6-2-2017
☐ aanvraag compleet:
☒ in vergadering besproken: 14-2-2017
☐ anderszins behandeld:
☐ termijnonderbreking(en) van / tot : van 20-2-2017 tot 26-5-2017
☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermin met max. 15 werkdagen:
☒ aanpassing aanvraag: 26-5-2017
☒ advies aan CCD: 14-6-2017

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

8. Eventueel horen van aanvrager

- Datum: n.v.t.
- Plaats: n.v.t.
- Aantal aanwezige DEC-leden: n.v.t.
- Aanwezige (namens) aanvrager: n.v.t.
- Gestelde vragen en verstrekte antwoorden: n.v.t.
- Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag. n.v.t.

9. Correspondentie met de aanvrager

- Datum vragen: 20-2-2017
- Datum antwoord: 26-5-2017
- Gestelde vragen en antwoorden: Zie hieronder

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

Vraag 1: Het hoofddoel is ons helder, evenals hoe u te werk gaat bij het testen van nieuwe anti-fibrotische therapieën. Echter, in de beschreven strategie (3.4.1.) missen wij informatie over de strategie met betrekking tot de resterende studies die onder deze projectaanvraag zullen worden uitgevoerd. Hoe bepaalt u waar u aan gaat werken bij de onderdelen 3 en 4 (3.4.3)? Het is voor ons van belang om inzicht te hebben in het grotere verhaal: hoe bepaalt u waar de prioriteiten liggen in het onderzoek en wat de prioriteiten zijn voor de periode (5 jaar) van deze vergunning? Wat is de voorgeschiedenis, wat zijn de knelpunten in het fibroseonderzoek en hoe passen de onderzoeksvragen bij 3 en 4 hierin?

De modellen die we momenteel gebruiken (in deze aanvraag) zijn gekozen op basis van de volgende argumenten:

- In de literatuur zijn deze modellen het meest gebruikt
- Deze modellen zijn door de farmaceutische industrie het meest geaccepteerd voor de ontwikkeling van geneesmiddelen. De FDA eist dat nieuwe geneesmiddelen getest zijn voordat deze geaccepteerd worden op de markt.

Knelpunten in het fibroseonderzoek:

- De readout parameters zijn niet optimaal voor gebruik in zowel een profylactische als therapeutische test setting
- Hoe translationeel zijn onze modellen

TNO wil graag deze modellen verbeteren teneinde tot goed gevalideerde modellen te komen. De prioriteiten liggen op de volgende punten:

- Reproduceerbaarheid van de verschillende modellen verbeteren
- Welke uitlees parameters wordt er gebruikt
- Welk deel vd pathways in de patiënt worden gerepresenteerd in de modellen
- Hoe kunnen modellen het best gebruikt worden in een therapeutische setting (bijvoorbeeld het gebruik van zwaar water in therapeutische setting)

In het verleden hebben we al een aantal van deze punten geadresseerd en de komende 5 jaar willen we ons in het onderzoek vooral verder richten op:

- Het beter begrijpen vd fibrose processen die een rol spelen in deze modellen en deze processen vergelijken met de processen in de patiënt (systeem biologische aanpak; vergelijk met humaan materiaal)
- Het optimaliseren van read-out parameters zodat op een effectieve manier zowel profylactische als therapeutische protocollen getoetst kunnen worden

Vraag 2: Voor de pathways wordt gebruik gemaakt van transgene muizen. Kunt u meer inzicht geven in wanneer het van belang is om deze dieren te gebruiken? Betreft het hier bestaande transgene lijnen? En hebben deze dieren ongerief als resultaat van de genetische wijziging?

Het gebruik van transgene muizen kan inzicht geven in de processen die betrokken zijn bij fibrose omdat specifieke pathways aan / uit gezet zijn.

De toepassing zal vooral gericht zijn om meer inzicht in de fibrose processen te krijgen en niet specifiek om deze te gebruiken voor het uittesten van compounds. Op dit moment zullen we alleen gebruik maken van bestaande transgene muizenlijnen, het ongerief van transgene deze dieren zal niet meer zijn dan het in de aanvraag geclassificeerde maximale ongerief van 3 (cumulatief gezien).

Vraag 3: Wij begrijpen van de IvD dat u veel energie steekt in literatuuronderzoek. Kunt u ons inzicht geven in uw strategie hieromtrent en uw bevindingen? En concreet: u geeft aan dat de genoemde modellen de beste zijn voor uw onderzoek. Met welke modellen vergelijkt u deze modellen?

Is dit ook afgezet tegen in vitro modellen?

Literatuur onderzoek is een van de bronnen waaruit we informatie putten betreffende de verschillende fibrose modellen. Zo heeft een uitgebreid literatuur onderzoek op het gebied van longfibrose ons doen besluiten te stoppen met de intra-tracheale toediening van bleomycine en over te stappen op oropharygeale toediening. Helaas hebben we onder andere n.a.v. een systematische review op het gebied van longfibrose geleerd dat veel van de literatuur op het gebied van de verschillende modellen soms grote omissies vertoont (zo wordt het optreden van sterfte tijdens de proef vaak bijzonder slecht gerapporteerd) waardoor studies roodkleuriger voorgesteld worden dan dat onze ervaringen zijn. Daarom putten wij ook sterk uit ons grote netwerk van in vivo experts binnen de bedrijven. Onze ervaringen zijn dat deze experts vaak veel kritischer zijn t.o.v. de modellen en eventuele positieve therapie effecten dan de academische wereld en vaak zeer bereidwillig zijn om tot in detail over de voors en tegens van de modellen te discussiëren.

Er zijn verschillende modellen in de literatuur beschreven waarbij fibrose chirurgisch, chemisch, genetisch of mechanisch wordt geïntroduceerd in de verschillende organen.

Wij hebben bij TNO ook verschillende van deze modellen uitgetest (zoals het bileduct ligatie model of MCD dieet geïnduceerde fibrose model (methionine-choline deficiënte- dieet) om leverfibrose te induceren; het 5/6 massa reductie of ischemi model (voor nier fibrose) en het brandwonden of wondheling (punch) model voor huidfibrose.

De modellen die we nu aanbieden worden in het fibrose veld het meest frequent gebruikt en weerspiegelen de histopathologie die gelijk is aan die van bijvoorbeeld IPF of systemische sclerose patiënten. Tevens zijn de inductie en uitleesparameters van deze modellen heel goed reproduceerbaar gebleken. Ook belangrijk is dat deze modellen al

bijgedragen hebben aan PFDA goedkeuring van bestaande therapiemogelijkheden en daarmee een bijdrage kunnen leveren bij het valideren van nieuwe therapieën.

Het translationele aspect is voor TNO heel belangrijk, hetgeen geldt voor zowel in-vivo modellen als in-vitro modellen. Daarom hebben we naast het optimaliseren / valideren van in-vivo modellen ook een programma op het gebied van in-vitro modellen.

Bijvoorbeeld het ontwikkelen van een 3D voorspellend in-vitro model voor leverfibrose.

Ook voor de in-vitro modellen willen we weten welk deel van de processen in de patiënt representatief is, zodat we in de toekomst op basis van de te testen target kunnen besluiten of de studie in-vitro of in-vivo uitgevoerd zal moeten worden.

Vraag 5: Bij punt 3.2 vermeldt u dat het er subdoelen in het project zijn geïntegreerd, zoals het uittesten van positieve nieuwe controles. Waarom is dit een noodzakelijk doel?

Positieve controles bij het testen van nieuwe therapeutica worden gebruikt om vast te stellen of het model naar behoren heeft gefunctioneerd en dient als benchmark om het effect van de stof te vergelijken met bekende stoffen zodat bijvoorbeeld meerdere studies eenvoudiger met elkaar kunnen worden vergeleken. De twee op de markt toegelaten middelen (pirfenidone en nintedanib; alleen toegelaten voor longfibrose), hebben in onze modellen maar een zeer matig effect in zowel patiënt als in de muis. In het laatste geval is een andere referentiestof niet perse meer betrouwbaar. Om beter te kunnen benchmarken is er daarom een zeer grote behoefte aan (nieuwe) betrouwbaardere referentie compounds.

Vraag 6: Kunt u toelichten hoe extra controles het ongerief kunnen verminderen vóór het bereiken of overschrijden van de humane eindpunten?

Onze enige parameter die we in de looptijd van een studie kunnen monitoren, is het lichaamsgewicht van de dieren. Bleomycine of CCl4 geïnduceerde dieren verliezen in de eerste week gewicht, dit hoort bij het ziektemodel.

Na deze periode neemt het lichaamsgewicht weer langzaam toe. In een studie zijn er soms enkele dieren die gewicht blijven verliezen na de eerste week van inductie. Uit ervaring weten we dat als deze dieren een aantal dagen achter elkaar gewicht blijven verliezen het herstel niet aannemelijk zal zijn.

Door dagelijks deze dieren extra te monitoren (gewicht bepalen en tevens ook alle punten van het humane eindpuntformulier) kunnen we het verloop van het ziekteproces goed inschatten. We grijpen in voordat het dier andere duidelijkere symptomen van ongerief laat zien en halen dieren dan ook eerder uit een studie.

Vraag 7: We vragen u de duur van de proef nader te preciseren. Is er bijvoorbeeld een maximum duur te noemen?

Dit is gepreciseerd in de bijlagen. Over het algemeen zal een Longfibrose studie 3 weken duren, lever fibrose studie 4 weken, Nier fibrose studie 10 dagen en een huidfibrose studie 5 weken. Echter, als er bijvoorbeeld meer naar latere start van de therapie gekeken wordt of als er bijvoorbeeld naar effecten van stoffen op resolutie van fibrose gekeken zal worden, zal het mogelijk nodig zijn om de duur van de proef te verlengen met twee tot vijf weken.

Vraag 8: U stelt dat behandeling met therapeutica maximaal matig ongerief zal opleveren. Waar bestaat dat ongerief uit? Kunt u dit toelichten?

Ongerief door behandeling in onze modellen vindt voornamelijk plaats door bijvoorbeeld 2 x daags gavage, dagelijkse i.v. injectie of het plaatsen van een subcutane pomp.

Vraag 9: In de bijlagen is sprake van een wisselende power (0,8 / 0,9). Wat is daar de reden van?

In het algemeen wordt er voor het soort studies dat in deze aanvraag wordt besproken met een power van 0,8 gerekend. Soms wordt in overleg met de partner met wie we de studie uitvoeren besloten om de power naar 0,9 te verhogen. Dit kan bijvoorbeeld het geval zijn als de studie doorslaggevend is voor het doen van verdere investeringen in een onderzoeksprogramma. Hier geeft het hanteren van een hogere power een grotere kans dat de gekozen groepsgrootte de werkelijkheid inderdaad weergeeft en daarmee het besluit om een programma voort te zetten of te stoppen op een zo solide mogelijke basis wordt genomen.

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

- Aard expertise: n.v.t.
- Deskundigheid expert: n.v.t.
- Datum verzoek: n.v.t.
- Strekking van het verzoek: n.v.t.
- Datum expert advies: n.v.t.
- Advies expert: n.v.t.

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.

3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Vanwege betrokkenheid bij het betreffende project is één DEC-lid, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken bij de advisering.

C. Beoordeling (inhoud):

1. De aanvraag is toetsbaar en heeft voldoende samenhang. Het gaat om een project rond fibrose, met een duidelijke strategie en opzet. De samenhang bestaat eruit dat in diverse organen een vergelijkbaar fibroseproces kan ontstaan, waardoor het zinvol heeft dit proces in die organen in samenhang te bestuderen. De verschillende studies kunnen informatie opleveren die van nut zijn bij de overige studies. De DEC heeft om uitleg gevraagd over het includeren van een subdoel. Naar aanleiding van het uitgebreide antwoord op deze vraag begrijpt de DEC dat ook dit doel een directe invulling is van het eerste subdoel van de aanvraag, namelijk validatie en verdere optimalisatie van de modellen. De DEC concludeert dat studies naar het fibroseproces en therapieën in dit project worden gecombineerd met studies naar het verbeteren van modellen en uitleesparameters. Voor de DEC is juist deze combinatie een sterk element in dit projectvoorstel, omdat daarmee het werken voor opdrachtgevers gecombineerd wordt met een sterke eigen inhoudelijke kennis en de daadwerkelijke mogelijkheid om modellen te verbeteren. Zie hiervoor ook element 7 van het advies met betrekking tot de proefopzet en haalbaarheid. De DEC heeft ook uitgebreid gesproken over het samenbrengen van 4 fibrosemodellen in een aanvraag. Daarbij is de conclusie van de DEC dat het juist essentieel is om deze fibrosemodellen niet te scheiden omdat a) in mensen ook verschillende organen aangetast kunnen zijn en b) dit vermindering in het gebruik van dieren kan faciliteren. Dit omdat de modellen niet elk op zichzelf staan, maar net als bij mensen meerdere uitingen van fibrose kunnen laten zien.
2. Voor zover de DEC bekend, is er geen mogelijk tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de dierexperimenten in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) sluit(en) aan bij de hoofddoelstelling(en). Er is sprake van translationeel/toegepast onderzoek, waarbij fibrose wordt bestudeerd in het dier in combinatie met de transleerbaarheid naar de mens.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is het testen van nieuwe anti-fibrotische therapiemogelijkheden in diverse fibrosemodellen die zo goed mogelijk bijdragen aan het voorspellen van klinische effectiviteit. Het uiteindelijke doel van het project is de ontwikkeling van nieuwe medicijnen tegen fibrose. De DEC TNO ziet deze samenhang duidelijk. Door het testen van therapieën, met daarbij extra aandacht voor de transleerbaarheid naar de mens, kan dit project bijdragen aan het daadwerkelijk ontwikkelen van goede medicijnen tegen fibrose. 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: fibrosepatiënten en de muizen en ratten die als proefdier gebruikt worden. Daarnaast hebben opdrachtgevers belang bij

informatie over hun product. Ook de uitvoerende organisatie en de medewerkers die aan het onderzoek werken hebben een belang. Voor de patiënten zijn in het geding de waarden: leven, gezondheid, welzijn, activiteiten kunnen ontplooien. Voor de proefdieren zijn in het geding de waarden: leven, gezondheid, welzijn en natuurlijk gedrag kunnen vertonen. Voor de opdrachtgevers en de uitvoerende organisatie gaat het voornamelijk om een economisch belang. Voor de betrokken medewerkers van TNO gaat het om hun professionele ontwikkeling.

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. De dieren worden gehuisvest onder veilige condities en zullen geen gevaar opleveren voor het milieu. De vergunninghouder heeft geborgd dat potentieel milieubelastend afvalmateriaal op passende wijze wordt afgevoerd.

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 aanvrager geeft aan bij 3.2 in het projectvoorstel dat de betrokken onderzoekers jarenlange ervaring hebben in het veld, inclusief een uitgebreid inhoudelijk netwerk waarbinnen wordt samengewerkt. In het antwoord op vraag 1 van de DEC aan de aanvrager komt bovendien een duidelijke focus naar voren die de haalbaarheid versterkt. Op grond van deze beschrijvingen ziet de DEC geen reden om te twijfelen aan de haalbaarheid zoals die is omschreven. Dit geldt ook voor de toepassing van de 3 V's, mede door het antwoord op de door de DEC gestelde vraag 3, naar literatuuronderzoek inzake modellen. Hier geeft de aanvrager aan goed op de hoogte te zijn van actuele literatuur, maar ook met een kritische houding staat tegenover de publicaties in dit veld. De aanvrager beschrijft derhalve een netwerk van experts waar men een reëler beeld vindt van de transleerbaarheid van de resultaten in dit veld.
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. De aanvrager beschrijft een uiteindelijk doel van de onderzoekslijn, maar specificeert ook concrete, haalbare doelen voor dit project: therapiemogelijkheden testen en daarbij modellen voor fibrose verbeteren wat betreft het voorspellen van klinische effectiviteit. De DEC neemt mee in haar weging dat een deel van het project ingegeven wordt door de mogelijkheid om het diermodel en daarmee de transleerbaarheid te verbeteren. Het antwoord getuigt van het feit dat deze verbeteringen daadwerkelijk haalbaar zijn en zelfs tot verbeteringen kunnen leiden in de internationale gemeenschap in handen van deze groep. De aanvrager stelt namelijk niet alleen modellen te verbeteren, maar de wegen te kennen om ook de acceptatie van dergelijke verbeteringen door de FDA te realiseren. Het antwoord van vraag 1 samen met vraag 3 geeft in

de ogen van de DEC een unieke combinatie weer van een onderzoeksomgeving waar het probleem wordt aangepakt met een multidisciplinair team met expertise en netwerk op het gebied van fibrose in vitro, in vivo, translatie en wet- en regelgeving.

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)
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.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het is ingeschat als voor het gros van de dieren maximaal matig en voor een klein percentage ernstig (0,5%). De DEC is van mening dat deze percentages realistisch zijn ingeschat. De DEC heeft gediscussieerd over de vraag of extra monitoring dit percentage zou kunnen verlagen. In het antwoord op vraag 6 van de DEC maakt de aanvrager duidelijk dat de monitoring passend is ingeregeld om het percentage dieren dat ernstig ongerief ondergaat zeer laag te houden. Daarnaast maakt de aanvrager in het antwoord op vraag 2 van de DEC duidelijk dat er geen extra ongerief is inherent aan de foklijnen van transgene muizen.
12. De integriteit van de dieren wordt aangetast in die zin dat ze als proefdier worden gebruikt en worden gedood. Er is geen andere aantasting van de integriteit van het dier.
13. De humane eindpunten zijn in de bijlagen goed gedefinieerd en het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt bereikt is goed ingeschat. Het gaat om lage percentages en de criteria zijn duidelijk geformuleerd en door de DEC passend bevonden.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn voor het bestuderen fibrotische aandoeningen. Dit heeft te maken met de complexiteit van deze aandoeningen. De DEC ziet in dat met name het afweersysteem

van een levend organisme op dit moment nog niet nagebootst kan worden. De DEC neemt mee in haar weging dat de vergunninghouder ook een onderzoeksprogramma heeft op het gebied van *in vitro*-modellen. Ook beschrijft de aanvrager in de strategie dat geschikte targets geïdentificeerd worden op basis van bijvoorbeeld literatuur, humane studies en/of *in vitro*-testen. Vervolgens wordt voor het valideren of modificatie van het target inderdaad tot verandering van pathologie kan leiden gebruik gemaakt van *in vitro* testen, *ex vivo* testen met humaan weefsel, naast het gebruik van *in vivo* testen in transgene dieren. Daarmee is het voor de DEC helder dat het gebruik van dieren het moment is dat er geen alternatieven zijn zonder dieren. De DEC vertrouwt erop dat de IvD hierop op experimentniveau zal toezien.

15. Het aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat op grond van literatuur en statistiek. Er is een heldere strategie om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Deze strategie bestaat uit het raadplegen van erkende statistische berekeningsmethoden en het combineren van meerdere modellen in dieren. In de bijlagen 1 en 2 laat de aanvrager zien alert te zijn op mogelijkheden voor vermindering. Bijlage 1: in het verleden zijn uitleesparameters verminderd, waardoor de groepsgrootte verkleind kon worden. Bijlage 2: door een andere anesthesiemethode kon de uitval worden verminderd (waardoor minder dieren nodig zijn voor betrouwbare uitkomsten). In het antwoord op vraag 9 van de DEC bevestigt de aanvrager dat men op de hoogte is van de gevolgen van het stellen van eisen aan de power van het experiment, namelijk het gebruik van meer dieren. Maar de DEC is ervan overtuigd dat het gebruik van meer dieren dan ook een sterker resultaat zal genereren, wat extra dierproeven daarna zal kunnen voorkomen.
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, en dat de dierproeven met zo min mogelijk stress en ongerief gepaard gaan. Zo worden er modellen gekozen waarin fibrotische aandoeningen zich relatief snel manifesteren op moleculair-biologisch niveau en krijgen herstellende dieren een warmtematje (bijlage 2). Dit zijn enkele voorbeelden waaruit wij opmaken dat er aantoonbaar aandacht voor verfijning is. Met het antwoord op vraag 6 van de DEC is bovendien duidelijk geworden hoe monitoring van het ongeriefniveau plaatsvindt.
17. Er is geen sprake van wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. In de bijlagen staat beschreven hoe soms mannelijke en soms vrouwelijke dieren zullen worden gebruikt, in overleg met de opdrachtgever. De strategie en onderbouwing hierbij vindt de DEC overtuigend. De DEC is er dan ook van overtuigd dat de aanvrager in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd dat het, om de doelstellingen te bereiken, noodzakelijk is om de proeven variërend met mannelijke, dan wel vrouwelijke dieren uit te voeren. Zo wordt in bijlage 1 gekozen voor mannelijke muizen omdat zij sneller longfibrose ontwikkelen dan

vrouwtjes. Bij ratten is het vrouwelijke model gevalideerd, maar is na eventuele validatie van het mannelijke model gebruik van dat model een mogelijkheid.

19. De dieren worden in het kader van het project gedood, omdat het noodzakelijk is voor de te behalen doelen om weefsels van de dode dieren te bestuderen. De dieren worden volgens een, bijlage IV van de EU-richtlijn, passende methode gedood.
20. Omdat in het projectvoorstel specifieke typen muizen en ratten worden aangevraagd, is de vraag over herplaatsing/hergebruik niet van toepassing.

NTS

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

D. Ethische afweging

1. De centrale morele vraag luidt: rechtvaardigt het verkrijgen van inzicht in processen en therapieën bij fibrose-aandoeningen de dood van maximaal 24.000 muizen en maximaal 4.000 ratten, en daarbij voor 10% van de dieren licht ongerief, 89,5% matig ongerief en 0,5% ernstig ongerief?
2. De DEC TNO is van mening dat het maatschappelijk belang van inzicht in processen en therapieën bij fibrose-aandoeningen in dit project zwaarder weegt dan het belang van de proefdieren om niet aan de proeven te worden onderworpen, met bijkomend ongerief. Indien de doelstellingen bereikt worden, wat aannemelijk is, is dat een stap vooruit in de ontwikkeling van betere therapieën ter voorkoming of genezing van fibrose-aandoeningen.
3. De DEC is overtuigd van het belang van het doel, namelijk het verkrijgen van inzicht in fibroseprocessen ten behoeve van de ontwikkeling van nieuwe medicijnen tegen fibrose. Door de transleerbaarheid van de mens kan dit project bijdragen aan de ontwikkeling van dergelijke medicijnen. De waarden die voor patiënten in het geding zijn wegen zwaarder dan de waarden die voor de proefdieren in het geding zijn. De voorgestelde experimentele opzet, in combinatie met de deskundigheid van de uitvoerenden, kan daadwerkelijk bijdragen aan belangrijke gezondheidsdoelen voor menselijke patiënten. Ook heeft de DEC op grond van het projectvoorstel er vertrouwen in dat de aanvrager kan voldoen aan de 3V-voorwaarden.

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, behalve de vragen zoals die gesteld zijn aan de aanvrager. Deze zijn door de aanvrager naar tevredenheid beantwoord.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

TNO

Postbus 96800

2509 JE DEN HAAG



**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
AVD5010020172207

Bijlagen

2

Datum 16 juni 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 15 juni 2017. Het gaat om uw project "Het bepalen en valideren van de effectiviteit van nieuwe geneesmiddelen en het onderzoeken van de mechanismen die betrokken zijn in het ontstekings- en fibrose proces m.b.v. in vivo fibrose modellen.". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD5010020172207. 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:

16 juni 2017

Aanvraagnummer:

AVD5010020172207

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
16 juni 2017
Aanvraagnummer:
AVD5010020172207

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 50100
Naam instelling of organisatie: TNO
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: 
KvK-nummer: 27376655
Postbus: 96800
Postcode en plaats: 2509 JE DEN HAAG
IBAN: NL39INGB0657819271
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: TNO

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Datum:
16 juni 2017
Aanvraagnummer:
AVD5010020172207

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

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



Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u?

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

Over uw project

Geplande startdatum:
Geplande einddatum:
Titel project:

1 januari 2018
31 december 2023
Het bepalen en valideren van de effectiviteit van nieuwe geneesmiddelen en het onderzoeken van de mechanismen die betrokken zijn in het ontstekings- en fibrose proces m.b.v. in vivo fibrose modellen.

Titel niet-technische samenvatting:

Het bepalen en valideren van de effectiviteit van nieuwe geneesmiddelen en het onderzoeken van de mechanismen die betrokken zijn in het ontstekings- en fibrose proces in diermodellen

Naam DEC:
Postadres DEC:
E-mailadres DEC:

DEC-TNO
96800 2509 JE DEN HAAG



Betaalgegevens

De leges bedragen:
De leges voldoet u:

€ 1.684,-
na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen:

- ☒ [x] Projectvoorstel
- ☒ [x] Beschrijving Dierproeven
- ☒ [x] Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen:

- ☒ [x] DEC-advies

Ondertekening

Naam:

Functie:

Plaats:

Datum:



Den Haag

16 juni 2017

Datum:

16 juni 2017

Aanvraagnummer:

AVD5010020172207



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

TNO

T.a.v. Accounts Payable

Postbus 96829

2509 JE DEN HAAG



**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

AVD5010020172207

Bijlagen

2

Datum 16 juni 2017

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 16 juni 2017

Vervaldatum: 16 juli 2017

Factuurnummer: 172207

OVV: Vooruitbetaling, bestelnummer 3100165835/1

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven	€ 1.684,00

Betreft aanvraag AVD5010020172207

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.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

TNO

Postbus 96800

2509 JE DEN HAAG



**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
AVD5010020172207

Datum 23 juni 2017
Betreft aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 15 juni 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Het bepalen en valideren van de effectiviteit van nieuwe geneesmiddelen en het onderzoeken van de mechanismen die betrokken zijn in het ontstekings- en fibrose proces m.b.v. in vivo fibrose modellen." met aanvraagnummer AVD5010020172207. 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 geeft u onder 3.5 aan dat er sprake kan zijn van ernstig ongerief, terwijl in 3.4 staat dat het ongerief maximaal matig is. Kunt u een nieuwe NTS sturen waarin u onder 3.4 ook aangeeft dat er sprake kan zijn van ernstig ongerief, eventueel voorzien van extra uitleg?

Kunt u voor Bijlage Dierproeven 3.4.4.3 aangeven waarom u enkel vrouwelijke muizen wilt gebruiken? Kunt u voor Bijlage 3.4.4.4 aangeven welk geslacht ratten u wilt gebruiken en indien dit één geslacht betreft onderbouwen waarom? Als onvoldoende (wetenschappelijk) is onderbouwd waarom het gebruik van één geslacht nodig is, kan de CCD een voorwaarde opleggen dat beide geslachten in gelijke mate gebruikt moeten worden.

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:

23 juni 2017

Aanvraagnummer:

AVD5010020172207

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

Van: [REDACTED]
Verzonden: woensdag 5 juli 2017 14:32
Aan: Info-zbo
CC: [REDACTED]
Onderwerp: RE: Aanhouden AVD5010020172207
Categorieën: Dossier [REDACTED]

Geachte [REDACTED],

Naar aanleiding van uw vraagbrief op onze aanvraag AVD5010020172207 "Het bepalen en valideren van de effectiviteit van nieuwe geneesmiddelen en het onderzoeken van de mechanismen die betrokken zijn in het ontstekings- en fibrose proces m.b.v. in vivo fibrose modellen." hebben wij de onderstaande reactie van de onderzoeker ontvangen:

We hebben alle onduidelijkheden in de aanvraag verwerkt, de aanpassingen zijn rood gemarkeerd in de tekst weergegeven.
 Een nieuwe NTS en de bijlagen 3.4.4.3 en 3.4.4.4 die bij deze aanvraag horen, zijn aangepast, verduidelijkt en geüpload via NetFTP.

In de NTS geeft u onder 3.5 aan dat er sprake kan zijn van ernstig ongerief, terwijl in 3.4 staat dat het ongerief maximaal matig is. Kunt u een nieuwe NTS sturen waarin u onder 3.4 ook aangeeft dat er sprake kan zijn van ernstig ongerief, eventueel voorzien van extra uitleg?

- Een nieuwe NTS is geüpload, waarin onder 3.4 in rood de wijzigingen zijn aangegeven.

Kunt u voor Bijlage Dierproeven 3.4.4.3 aangeven waarom u enkel vrouwelijke muizen wilt gebruiken?

- In Bijlage 3.4.4.3 geven wij aan dat we voornamelijk vrouwelijke muizen willen gebruiken voor huidfibrose studies, omdat het model hierin goed is gevalideerd. Echter kunnen mannelijke muizen ook voor dit type studie gebruikt worden. Een studie om de huidfibrose inductie in de twee geslachten te valideren staat op dit moment ingepland. We hebben de bijlage 3.4.4.3. aangepast om dit te verduidelijken.

Kunt u voor Bijlage 3.4.4.4 aangeven welk geslacht ratten u wilt gebruiken en indien dit één geslacht betreft onderbouwen waarom? Als onvoldoende wetenschappelijk) is onderbouwd waarom het gebruik van één geslacht nodig is, kan de CCD een voorwaarde opleggen dat beide geslachten in gelijke mate gebruikt moeten worden.

- In bijlage 3.4.4.4 hebben we onderbouwd welk geslacht ratten we zullen gaan gebruiken als er vraag blijkt te zijn naar leverfibrose studies in ratten. Eerst zal in een validatie studie gekeken worden of de bij muizen waargenomen geslachtsafhankelijke verschillen ook in de rat optreden. Op basis hiervan zal besloten worden of beide geslachten bruikbaar zijn om voor een lever fibrose studie in te zetten.

Nog een algemene opmerking betreffende het gebruik van de verschillende geslachten in deze aanvraag: Hoewel in sommige studies het gebruik van de verschillende geslachten ook door partners afhankelijk is (als er bijvoorbeeld al PK data in vrouwen bekend is, ligt het voor de hand om een studie ook in vrouwen uit te voeren), verwachten wij dat de ratio man/vrouw over de gehele aanvraag met hierin alle vier de fibrose modellen ongeveer gelijk zal zijn.

Als er nog vragen of onduidelijkheden zijn dan hoor ik dat graag

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

Location

TNO innovation
for life

This message may contain information that is not intended for you. If you are not the addressee or if this message was sent to you by mistake, you are requested to inform the

sender and delete the message. TNO accepts no liability for the content of this e-mail, for the manner in which you use it and for damage of any kind resulting from the risks inherent to the electronic transmission of messages.

From: Info-zbo

[mailto:info@zbo-ccd.nl]

Sent: vrijdag 23 juni 2017 16:46

To: [REDACTED]

Cc: [REDACTED]

Subject: Aanhouden AVD5010020172207

Geachte [REDACTED],

Op 15 juni 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Het bepalen en valideren van de effectiviteit van nieuwe geneesmiddelen en het onderzoeken van de mechanismen die betrokken zijn in het ontstekings- en fibrose proces m.b.v. in vivo fibrose modellen." met aanvraagnummer AVD5010020172207. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In bijgaande brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op.

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 er nog vragen zijn, dan hoor ik dat graag.

Met vriendelijke groeten,

Namens de Centrale Commissie Dierproeven

[REDACTED]

www.centralecommissiedierproeven.nl

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

.....
T: 0900 – 28 000 28 (10 ct/min)

E: info@zbo-ccd.nl



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

TNO

[Redacted]

Postbus 96800

2509 JE DEN HAAG

**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

AVD5010020172207

Bijlagen

1

Datum 10 juli 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [Redacted]

Op 15 juni 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Het bepalen en valideren van de effectiviteit van nieuwe geneesmiddelen en het onderzoeken van de mechanismen die betrokken zijn in het ontstekings- en fibrose proces m.b.v. in vivo fibrose modellen." met aanvraagnummer AVD5010020172207. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 5 juli 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Dit betrof een nieuwe NTS en de onderbouwing voor de te gebruiken geslachten.

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.

U heeft aangegeven dat over het gehele project de ratio mannelijke en vrouwelijke dieren gelijk zal zijn.

U kunt met uw project "Het bepalen en valideren van de effectiviteit van nieuwe geneesmiddelen en het onderzoeken van de mechanismen die betrokken zijn in het ontstekings- en fibrose proces m.b.v. in vivo fibrose modellen." starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 januari 2018 tot en met 31 december 2023.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Beoordeling achteraf

Na afloop van het project zal er een beoordeling plaatsvinden, zoals bedoeld in artikel 10a1, lid 1d en lid 3, in de wet. Meer informatie over de eisen bij een beoordeling achteraf vindt u in de bijlage.

Er is sprake van ernstig ongerief.

Datum:

10 juli 2017

Aanvraagnummer:

AVD5010020172207

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-TNO gevoegd. Dit advies is opgesteld op 14 juni 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:

**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: TNO
Adres: Postbus 96800
Postcode en plaats: 2509 JE DEN HAAG
Deelnemersnummer: 50100

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 januari 2018 tot en met 31 december 2023, voor het project "Het bepalen en valideren van de effectiviteit van nieuwe geneesmiddelen en het onderzoeken van de mechanismen die betrokken zijn in het ontstekings- en fibrose proces m.b.v. in vivo fibrose modellen." met aanvraagnummer AVD5010020172207, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-TNO. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Onderzoeker. Voor de uitvoering van het project is Research assistant verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 15 juni 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 15 juni 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 5 juli 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 14 juni 2017, ontvangen op 15 juni 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 5 juli 2017

Aanvraagnummer:
AVD5010020172207

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Longfibrose in muis of rat				
	Muizen (<i>Mus musculus</i>) /	6.000	1% Ernstig 99% Matig	
	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) /	1.000	1% Ernstig 99% Matig	
3.4.4.2 Nierfibrose in muis of rat				
	Muizen (<i>Mus musculus</i>) /	3.000	1% Ernstig 99% Matig	
	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) /	800	1% Ernstig 99% Matig	
3.4.4.3 Huidfibrose in muis of rat				
	Muizen (<i>Mus musculus</i>) /	6.000	1% Ernstig 99% Matig	
	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) /	1.000	1% Ernstig 99% Matig	
3.4.4.4 Leverfibrose in muis of rat				
	Muizen (<i>Mus musculus</i>) /	6.000	1% Ernstig 99% Matig	

Aanvraagnummer:
AVD5010020172207

	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) /	1.000	1% Ernstig 99% Matig	
--	---------------------------------------	-------	-------------------------------	--

Voorwaarden

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

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet en wordt daarom voorzien van beoordeling achteraf. Deze beoordeling zal uiterlijk april 2024 plaatsvinden. Er zal dan beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt. Daarnaast wordt bekeken of de schade die de dieren hebben ondervonden, het aantal en soorten proefdieren en de ernst de dierproeven conform de vergunning waren.

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

Gedurende de looptijd van de vergunning, koppelt de aanvrager aan de CCD terug welke experimenten; welke type dierproef; de wijze van uitvoering; welke diersoort en bijbehorend ongerief is uitgevoerd onder deze vergunning. Deze terugkoppeling moet uiterlijk 31 januari door de CCD ontvangen zijn en rapporteert over het afgelopen kalenderjaar (1 januari - 31 december). Ook wanneer er geen dierstudies zijn uitgevoerd wordt dit gerapporteerd. De CCD kan op basis van deze terugkoppeling aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken. Wanneer u overtuigend en onbetwistbaar kan aantonen dat er geen gegevens over de geteste stof kunnen worden vrijgegeven omdat de opdrachtgever deze als vertrouwelijke informatie heeft geclassificeerd kunt u deze informatie buiten de rapportage houden.

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 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:
AVD5010020172207

Over de hele aanvraag worden mannelijke en vrouwelijke dieren in evenredige aantallen gebruikt. Zo doende wordt voorkomen dat surplusdieren in voorraad moeten worden gedood. De aanvrager mag de uitkomsten van de eerste onderzoeken waarbij beide geslachten gebruikt worden rapporteren aan de CCD. De uitkomst van deze eerste onderzoeken kan voor de CCD aanleiding geven om bovenstaande voorwaarde van gelijk gebruik van beide geslachten, bij deze projectvergunning te wijzigen of in te trekken.



Aanvraagnummer:
AVD5010020172207

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:
AVD5010020172207

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

Einde van een dierproef

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

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

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

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

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.

Beoordeling achteraf

Volgens artikel 10a1, lid 1d en lid 3 van de wet worden projecten waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt, projecten die als ernstig ingedeelde dierproeven omvatten of een dierproef die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, achteraf beoordeeld worden.