

	Inventaris Wob-verzoek W17-09								
		wordt verstrekt			weigeringsgronden				
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTS2017845								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel				x		x	x	
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1			x					
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2			x					
6	DEC-advies				x		x	x	
7	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
8	Advies CCD		x						x
9	Beschikking en vergunning				x		x		



16 FEB. 2017

Aanvraag

Projectvergunning Dierproeven

Administratieve gegevens

- U bent van plan om één of meerdere dierproeven uit te voeren.
- Met dit formulier vraagt u een vergunning aan voor het project dat u wilt uitvoeren. Of u geeft aan wat u in het vergunde project wilt wijzigen.
- Meer informatie over de voorwaarden vindt u op de website www.zbo-ccd.nl 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 11800 ☐ Nee > U kunt geen aanvraag doen															
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table><tr><td>Naam instelling of organisatie</td><td>Academic Medical Center Amsterdam</td></tr><tr><td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td><td></td></tr><tr><td>KvK-nummer</td><td>3 4 3 3 6 2 7 7 7</td></tr></table>	Naam instelling of organisatie	Academic Medical Center Amsterdam	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde		KvK-nummer	3 4 3 3 6 2 7 7 7									
Naam instelling of organisatie	Academic Medical Center Amsterdam																
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde																	
KvK-nummer	3 4 3 3 6 2 7 7 7																
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	<table><tr><td>Straat en huisnummer</td><td>Meibergdreef 31</td></tr><tr><td>Postbus</td><td></td></tr><tr><td>Postcode en plaats</td><td>1105AZ Amsterdam</td></tr><tr><td>IBAN</td><td>NL68RABO0136166741</td></tr><tr><td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td><td>Zie bijgesloten procedure voor betaling AMC</td></tr></table>	Straat en huisnummer	Meibergdreef 31	Postbus		Postcode en plaats	1105AZ Amsterdam	IBAN	NL68RABO0136166741	Tenaamstelling van het rekeningnummer	Zie bijgesloten procedure voor betaling AMC					
Straat en huisnummer	Meibergdreef 31																
Postbus																	
Postcode en plaats	1105AZ Amsterdam																
IBAN	NL68RABO0136166741																
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Zie bijgesloten procedure voor betaling AMC																
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td></td><td>☒ Dhr. ☐ Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>Associate professor</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>Center for Experimental and Molecular Medicine</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td></td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td></td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters		☒ Dhr. ☐ Mw.	Functie	Associate professor		Afdeling	Center for Experimental and Molecular Medicine		Telefoonnummer			E-mailadres		
(Titel) Naam en voorletters		☒ Dhr. ☐ Mw.															
Functie	Associate professor																
Afdeling	Center for Experimental and Molecular Medicine																
Telefoonnummer																	
E-mailadres																	
1.5	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td></td><td>☐ Dhr. ☐ Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td></td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td></td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td></td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td></td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters		☐ Dhr. ☐ Mw.	Functie			Afdeling			Telefoonnummer			E-mailadres		
(Titel) Naam en voorletters		☐ Dhr. ☐ Mw.															
Functie																	
Afdeling																	
Telefoonnummer																	
E-mailadres																	

- | | | |
|---|--|--|
| (Titel) Naam en voorletters | | ☐ Dhr. ☐ Mw. |
| Functie | | |
| Afdeling | | |
| Telefoonnummer | | |
| E-mailadres | | |
| ☐ Ja > <i>Stuur dan het ingevulde formulier Melding Machtiging mee met deze aanvraag</i> | | |
| ☒ Nee | | |

2 Over uw aanvraag

- | | |
|---|--|
| ☒ 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 | |
| ☐ 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 | |
| ☐ Nee > Ga verder met vraag 3 | |
| ☐ Ja > Geef hier onder een toelichting en ga verder met vraag 6 | |

3 Over uw project

- | | |
|---|---|
| Startdatum | 0 1 _ 0 1 _ 2 0 1 8 |
| Einddatum | 3 1 _ 1 2 _ 2 0 2 2 |
| Novel treatment options for pulmonary fibrosis. | |
| Betere behandel mogelijkheden voor longfibrose. | |
| Naam DEC | DEC AMC |
| Postadres | Meibergdreef 31 |
| E-mailadres |  |

4 Betaalgegevens

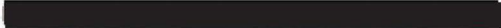
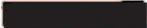
4.1	Om welk type aanvraag gaat het?	☒ Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1287.00 Lege ☐ Wijziging € Lege
4.2	Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen. <i>Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.</i>	☐ Via een eenmalige incasso ☐ Na ontvangst van de factuur

5 Checklist bijlagen

5.1	Welke bijlagen stuurt u mee?	Verplicht ☒ Projectvoorstel ☒ Niet-technische samenvatting Overige bijlagen, indien van toepassing ☐ Melding Machtiging ☒ Appendix 3.4.4.1 en 3.4.4.2
-----	------------------------------	---

6 Ondertekening

6.1	Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar: Centrale Commissie Dierproeven Postbus 20401 2500 EK Den Haag	Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondergetekende verklaart: - dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn. - dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid. - dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen. - dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag. - dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.
-----	---	--

Naam	
Functie	
Plaats	Amsterdam
Datum	10 - 02 - 2017
Handtekening	



Format

Projectvoorstel dierproeven

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

1 Algemene gegevens

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

2 Categorie van het project

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

Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF), the most common form of pulmonary fibrosis, is a chronic and ultimately fatal disease that is characterized by a progressive decline in lung function. Clinically, the main symptoms of IPF are chronic cough and shortness of breath. Usually the breathlessness first appears

during exercise. Breathlessness can affect day-to-day activities such as showering, climbing stairs, getting dressed and eating. As disease progresses and scarring in the lungs gets worse, breathlessness may prevent all activities and patients die relatively shortly after diagnosis. Indeed, the prognosis of IPF is devastating: there is only a 20-25% survival rate at 3-5 years after diagnosis and its mortality rate exceeds many types of cancer.

Treatment modalities for IPF are limited and lung transplantation is the last resort, which is however for selected patients only. Recently, two novel drugs, i.e. pirfenidone and nintedanib, became clinically available. Both seem to slow the decline of lung function in patients with IPF, while pirfenidone also slightly improves survival of IPF patients. However, both drugs have serious side effects, show no benefit on quality of life, and do not stop nor reverse the disease. Novel treatment options are thus eagerly awaited.

To reduce both morbidity and mortality associated with pulmonary fibrosis, it is pivotal to identify novel mediators involved in disease progression. Targeting such novel mediators during disease progression in pre-clinical animal models is subsequently a first pivotal step to determine whether the novel mediators may have therapeutic potential. Only in case pharmacological inhibition is effective in these pre-clinical models, clinical studies may be designed.

Bleomycin-induced pulmonary fibrosis is the best described pre-clinical model of human lung fibrosis that has been widely used to study mechanisms involved in fibrogenesis and for the evaluation of potential therapies for IPF. Intratracheal or intranasal delivery of bleomycin into the lung results in direct cell injury through the induction of DNA strand breaks, the generation of free radicals, and the induction of oxidative stress. This results in pulmonary inflammation between day 3 and 7 after bleomycin instillation and subsequent interstitial fibrosis (starting at day 10-12 and peaking at around day 21 after bleomycin instillation; Figure 1).

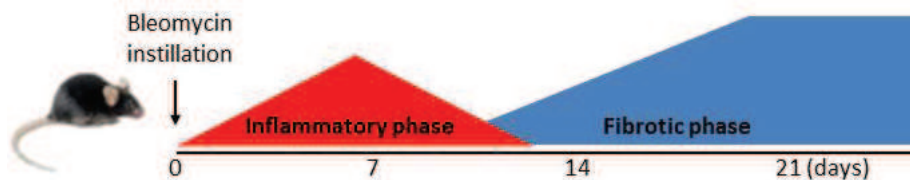


Figure 1: Different processes induced after bleomycin instillation into the lung of mice. Initially bleomycin induces an inflammatory response which is followed by the fibrotic phase.

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?

Based on *in vitro* work, patient biopsies or literature, novel pathways/mediators potentially involved in pulmonary fibrosis will be identified. Importantly however, *in vitro* studies do only partly mimic the complex interplay of cells/processes involved in pulmonary fibrosis *in vivo*. The actual importance of the most promising pathways/mediators identified *in vitro* thus need to be assessed in *in vivo* models. Similarly, patients data showing, for instance, that certain pathways/mediators are highly expressed in pulmonary fibrosis patients as compared to controls do not yet prove that these pathways/mediators are involved in disease progression. Again, the actual importance of these pathways/mediators need to be assessed in *in vivo* models. The primary objective (i.e. "directe doel") of the current project is therefore to prove or refute the importance of potential novel pathways/mediators in pulmonary fibrosis and to assess the underlying mechanism by which these pathways/mediators modify pulmonary fibrosis. Ultimately (i.e. "uiteindelijke doel"), this should result in the identification of novel compounds as candidates for future clinical studies and in a better understanding of the etiology of pulmonary fibrosis.

We expect to successfully achieve the primary objective of the current project as we have ample experience with the bleomycin-induced fibrosis model

Next to skill full biotechnicians experienced with the bleomycin model, we also have all necessary assays to analyse inflammation and fibrosis routinely up- and running in our laboratory. Importantly, both pirfenidone and inatinib (the only two approved drugs for the treatment of IPF) limit fibrosis in the bleomycin model suggesting the model is suitable to identify fibrotic mediators relevant for the human setting.

3.3 Belang

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

Pulmonary fibrosis is a devastating disease with no effective treatment options resulting in high morbidity and mortality. Novel treatment options are eagerly awaited for, and research consequently focusses on the identification of novel pathways/mediators that could be targeted to limit the progression of pulmonary fibrosis. *In vitro* experiments and/or *ex vivo* patient data identify potential novel pathways/mediators to target and, in the current project, we propose to determine the *in vivo* fibrotic effect (and underlying mechanism) of these novel pathways/mediators suggested to drive fibrosis.

The identification of novel pathways/mediators involved in disease progression is of great scientific importance as it will significantly increase our knowledge of the etiology of pulmonary fibrosis (which is currently largely unknown). Fully understanding disease etiology is critically important for rationale design of future treatment strategies thereby decreasing pulmonary fibrosis-related morbidity and mortality.

Establishing whether targeting the new pathways/mediators limits disease progression is a key first step in translation into the clinic. Especially compounds that efficiently limit (or even reverse) disease progression when administered after disease onset are prime candidates to further pursue in (clinical) research.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

To achieve our primary objective, wild type and/or genetically modified mice will be subjected to models of bleomycin-induced pulmonary fibrosis to obtain proof of principle for the new pathway/mediator to be involved in pulmonary fibrosis. If the new pathway/mediator indeed affects pulmonary fibrosis, subsequent studies will be performed to elucidate the underlying mechanism and to determine whether targeting the pathway/mediator also limits disease progression. Importantly, potential pathway/mediator involved in pulmonary fibrosis will be selected based on *in vitro* experiments using (patient-derived) fibroblasts and/or epithelial cells. Only pathways/mediators that modify fibrotic properties of these cells (like proliferation, differentiation or extracellular matrix production), will be tested in the *in vivo* animal model. Alternatively, pathways/mediators to be tested may be selected based on patient-derived data. For instance, pathways/mediators highly expressed in pulmonary fibrosis patients but not in controls may be selected for proof of principle studies. Finally, pathways/mediators may be selected from literature. Indeed, pathways/mediators that modify (for instance) kidney or liver fibrosis may be selected based on the notion that these disorders are driven by similar biological pathways.

For selected pathways/mediators, we envision a standard set of experiments to be performed (Figure 2; for details about the experiments, see 3.4.2):

1. Proof of principle: First, we aim to determine whether experimental pulmonary fibrosis is affected in genetically modified mice to obtain proof of principle that the pathway/mediator is involved in pulmonary fibrosis.

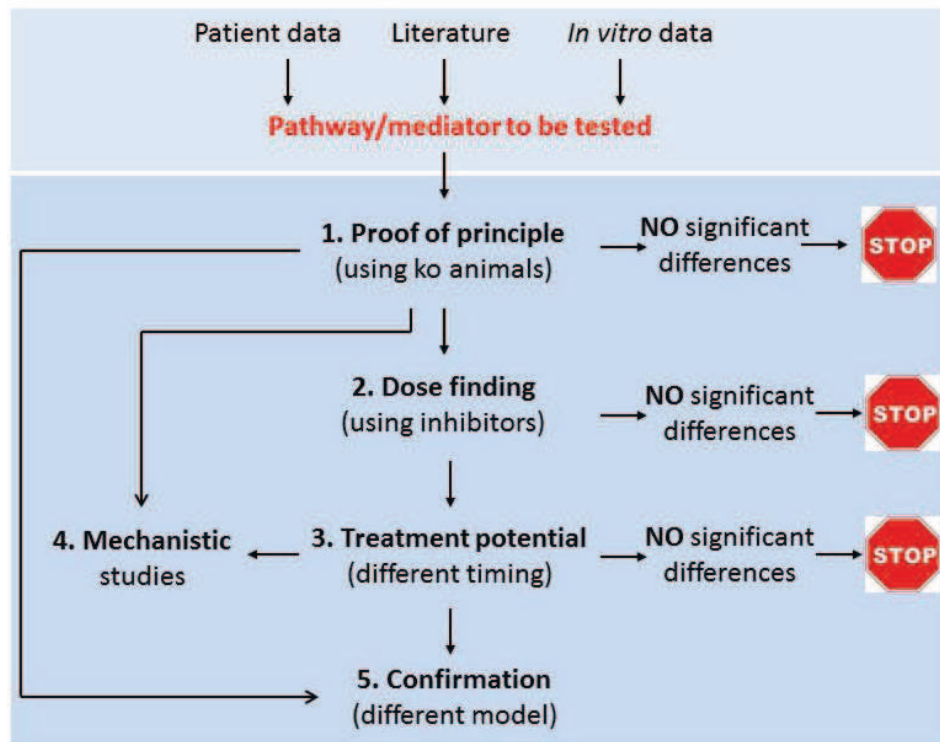


Figure 2: Strategy of the project as outlined in detail in the text. Only if specific GO criteria are met, subsequent experiments will be performed (for details, see 4.2.2).

2. Dose finding: In case fibrosis is modified in the genetically modified mice, the next aim will be to determine whether pharmacological targeting the pathway/mediator diminishes experimental pulmonary fibrosis. As a first step, in this part of the project, we will test different concentrations of the pharmacological inhibitor to assess whether pharmacological inhibition also limits fibrosis and to obtain the optimal dose for follow up experiments.

3. Treatment potential: If any of the inhibitor concentrations tested in the dose finding experiment limits pulmonary fibrosis, we will next determine whether delayed treatment (i.e. after the onset of fibrosis) still effectively limits fibrosis. This is particularly relevant as patients will never be treated before disease onset and these experiments thus provide information on the potential therapeutic importance.

4. Mechanistic studies: In case knock out animals (tested in proof of principle experiment) or pharmacological inhibition (tested in the dose finding experiment) reduces fibrosis, we aim to elucidate the underlying mechanism by which the pathway/mediator limits fibrosis. This is particularly relevant as the underlying mechanisms by which pathways/mediators contribute to disease progression is essential to fully understand the aetiology of pulmonary fibrosis.

5. Confirmation experiments: Experiments 1-4 will be addressed using a single pulmonary fibrosis model (as indicated in Figure 1; see 3.4.2 for details). Although we opt for the best available model to perform experiments 1-4, the model (as actually all animal models) does not fully recapitulate disease progression in the clinical setting. Consequently, we aim to validate key findings in an alternative model of pulmonary fibrosis. In case the tested pathway/mediator also drives pulmonary fibrosis in such an alternative model, the pathway/mediator is more likely to drive fibrosis in a more general nature which obviously enhances the translational potential of our findings.

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

Experiments 1-4 as indicated above (3.4.1) will be performed using an intranasal bleomycin-induced pulmonary fibrosis model. As already indicated, we opt for this model as it is the best described pre-clinical model of human lung fibrosis that has been widely used to study mechanisms involved in

fibrogenesis. Moreover, we opt for this model as we have ample experience with this particular model. Importantly however, although the bleomycin model is the best available model to study pulmonary fibrosis, it does not completely mimic the progression of fibrosis in IPF patients. For example, the spontaneous resolution of fibrosis in this model fails to represent the irreversibility seen in IPF patients. Consequently, it is pivotal to evaluate pathways/mediators that show promising effects in the intranasal model in an alternative experimental model before translating these findings into clinical studies. As alternative model for the confirmation experiments (experiment 5), we opt to use a model in which bleomycin is systemically delivered using Alzet minipumps (continuous delivery of bleomycin; see Appendix 2). This latter model, which is only recently described in literature and not yet well established, seems to result in limited inflammation and collagen deposition restricted to the subpleural area and mimics scleroderma-related pulmonary fibrosis. The necessity to implant minipumps suggest that animal discomfort may be higher in this model as compared to the intranasal model and consequently we opt to use this model only for the confirmation experiments.

In case the consensus in scientific literature would change over the next years and the systemic model would be considered scientifically superior over the intranasal model (i.e. better mimic the clinical situation of IPF), we will start new projects with the systemic model and may use the intranasal model to confirm our data.

As already indicated at 3.4.1 and shown in figure 2, experiments will be performed in a step-wise manner and we will not perform experiments 1-5 for all pathways/mediators. Based on specific Go / No Go criteria, we will limit the number of experimental animals used. In detail, we plan the following experiments based on the indicated Go / No Go criteria:

Experiment 1 – Proof of principle (Figure 3): Wild type and specific genetically modified mice are subjected to the bleomycin-induced pulmonary fibrosis model and mice are sacrificed at different time points during the fibrotic phase. Subsequent analysis of fibrotic markers reveals the importance of the studied pathway/mediator in the development of pulmonary fibrosis. In case no genetically modified animals are available, wild type mice may be made deficient by viral approaches.

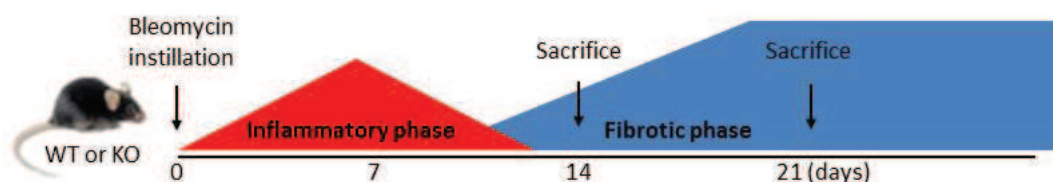


Figure 3: Schematic overview of the proof of principle experiments in which wildtype and pathway specific genetically modified mice are treated with bleomycin after which fibrosis development is assessed at different time points.

Go/No Go criteria: No significant difference between wild type and genetically modified mice → NO GO.
 Significant difference between wild type and deficient mice → GO to exp 2, 4 and 5.
 No deficient mice available → GO to exp 2.

Experiment 2 – Dose finding (Figure 4): Wild type mice will be treated with different concentrations of a specific inhibitor of the pathway/mediator to be tested. Treatment will be started before the induction of fibrosis. Mice are subsequently sacrificed at the optimal time point as determined in the proof of principle experiment (largest difference between wild type and deficient mice).

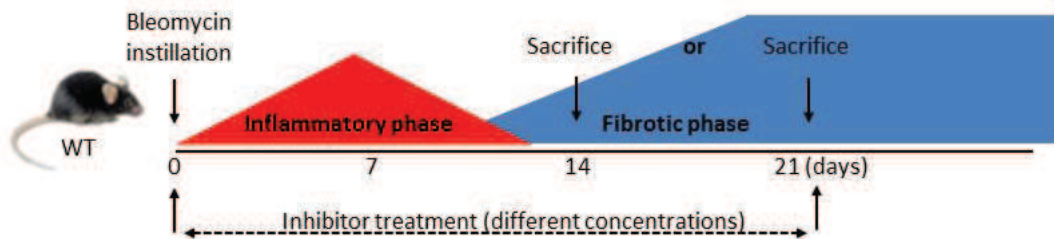


Figure 4: Schematic overview of the dose finding experiments in which wildtype mice are treated with different concentrations of pathway specific inhibitors starting before the induction of fibrosis.

Go/No Go criteria: Inhibitor does not significantly limit fibrosis → NO GO.
 Inhibitor does significantly inhibit fibrosis → GO to exp 3.

Experiment 3 – Treatment potential (Figure 5): Wild type mice will be treated with the optimal dose of inhibitor (defined from literature or from the dose finding experiment) starting after the onset of fibrosis. Mice are subsequently sacrificed at the optimal time point as determined in the proof of principle experiment.



Figure 5: Schematic overview of the treatment potential experiments in which wildtype mice are treated with the optimal concentration of pathway specific inhibitor after which fibrosis development is assessed. Importantly, treatment is started after the onset of fibrosis to mimic the clinical situation in which treatment can only be started after diagnosis (and thus onset of fibrosis).

Go/No Go criteria: Inhibitor does not significantly limit fibrosis → NO GO.
 Inhibitor does significantly inhibit fibrosis → GO to exp 4 and 5.

Experiment 4 – Mechanistic studies (Figure 6): Wild type and/or genetically modified mice are treated with specific inhibitors after which mice are sacrificed at different time intervals. Typical experiments may consist of wild type and deficient mice treated with a specific inhibitor to assess whether the effect of the inhibitor is indeed dependent on the presence of its target (i.e. the inhibitor should only affect fibrosis in wild type mice but not in deficient mice lacking the pathway/mediator the inhibitor is targeting. Alternatively, treated mice may be sacrificed at different time points after bleomycin-instillation to obtain insight in biological processes affected by the inhibitor (or deficient gene). Early time points will be studied to assess the effect on inflammation and epithelial injury whereas later time points (day 28) may be studied to assess whether fibrosis is really diminished or “just” delayed.



Figure 6: Schematic overview of the mechanistic experiments in which wildtype mice and pathway specific genetically modified mice are sacrificed at different time points after bleomycin instillation.

Experiment 5 - Confirmation studies (Figure 7): Wild type and/or genetically modified mice treated (or not) with specific inhibitors are subjected to the systemic bleomycin-induced pulmonary fibrosis model. As this model is not well described yet, and not yet used in our laboratory, we will first perform a pilot experiment (according to the scheme depicted below) to assess the optimal time point of sacrifice in subsequent experiments. To this end, wild type mice are subjected to the model and they are sacrificed after different time intervals. Subsequently, the amount of fibrosis will be assessed and the optimal time point for future experiments is defined by the following criteria: 1. High amount of fibrosis; 2. Low variability in the amount of fibrosis and 3. minimal discomfort. This pilot experiment also allows us to perform a power analysis to determine whether the proposed group size of 8 mice is sufficient for scientifically sound experiments.



Figure 7: Schematic overview of the initial pilot experiment of the systemic bleomycin model resulting in a limited inflammatory response followed by a robust fibrotic phase. Based on this pilot experiment in which mice are sacrificed at different time points (i.e. days 14, 21 or 28), the optimal time point of sacrifice will be selected for subsequent experiments.

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.

All individual experiments are tightly interconnected as indicated above. For every single novel pathway/mediator to be studied, we will start with a proof of principle experiment. In case these proof of principle experiments are negative, no additional experiments will be performed. Only in case the proof of principle experiments are showing a decrease in fibrosis, we will pursue the efficacy of pharmacological inhibition (experiments 2 and 3) and aim to elucidate the underlying mechanism by which fibrosis is decreased (experiment 4). Pathways/mediators with a large impact on fibrosis, and a consequent large decrease in fibrosis in either knock out mice or after pharmacological inhibition, will be validated in an alternative fibrosis model (experiment 5).

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Intranasal bleomycin-induced pulmonary fibrosis
2	Systemic bleomycin-induced pulmonary fibrosis
3	
4	

Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	11800	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Academic Medical Center Amsterdam	
1.3	List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
		1	Intranasal bleomycin-induced pulmonary fibrosis

Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

Mice will be subjected to bleomycin-induced pulmonary fibrosis. At different time intervals, mice will be sacrificed and pulmonary fibrosis is assessed using standard assays. Specifically, we will quantify collagen levels (as accumulation of this extracellular matrix protein is the major feature of pulmonary fibrosis) using hydroxyproline assays, and histological changes using the Ashcroft score (a numeric scale of fibrosis). Moreover, immunohistological stainings for macrophages, extracellular matrix proteins and endothelial cells may be performed to identify underlying mechanisms.

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

Bleomycin will be administered intranasally (maximal 50 µl). Mice may be treated with potential inhibitors of fibrosis from the start of the experiment or after the induction of fibrosis (max 1-2 times/day). Inhibitors may be applied subcutaneously, intraperitoneally, intravenously, orally or intranasally depending on the specific inhibitor with maximal volumes as described in Diehl et al, J. Appl. Toxicol. 21, 15-23, 2001. In certain experiments, blood may be collected at different time intervals before and after the induction of fibrosis (maximal 8 ml/kg/2 weeks or 7.5% of the blood volume/week; according to Diehl et al, J. Appl. Toxicol. 21, 15-23, 2001). At the end of the experiment, mice will be sacrificed under anaesthesia. Just before sacrifice, lungs may be flushed to obtain bronchoalveolar lavage fluid (BAL). During the experiment, mice will be weighed to assess animal discomfort (in general twice a week but daily in case large weight loss is observed).

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

Most importantly, power calculations will be performed to determine the smallest group size necessary to obtain significant findings. We will continuously repeat the power calculations to adjust group sizes in subsequent experiments based on the most recent data (most recent power calculation indicates that with a standard deviation of 35% we need 8 mice to show a difference of >50% with a power of 80%). We will use Student's t-tests for comparisons between two groups or 1-way anova for comparisons between multiple groups. Furthermore, obtained results will guide subsequent experiments (like for instance, delayed treatment experiments will only be performed in case previous experiments already provided proof of principle that the targeted pathway/mediator modifies pulmonary fibrosis).

B. The animals

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

- mus musculus (as genetically modified mice are available, and the availability of a good model in mice).
- Both male and female mice will be used (as this minimises the number of knock out mice to be bred). Moreover, the combined use of males and females allows to analyse whether pathways/mediators may act in a gender specific manner).
- Wild type and genetically modified (lacking or overexpressing potential fibrotic mediators) mice.
- Mice between 10 and 14 weeks of age (adult mice over 20 g, as we observed previously that bleomycin may cause a larger drop in body weight in younger/lighter mice).
- Mice (genetically modified and wild type controls) will be bred at the Academic Medical Center Amsterdam, whereas wild type mice may also be purchased from licenced companies like Charles River or Harlan.
- The maximal number of mice needed to perform all experiments proposed within the 5 years of the project will be around 840. This number is based on typical experiments (as outlined in figures 2-7 in the project proposal) with 40 mice for a proof of principal experiment (4 experimental groups; i.e. wildtype and KO mice sacrificed at two different time points; and 4 controls naïve mice per genotype), 48 mice for a dose finding experiment (6 experimental groups; i.e. 3 concentrations of inhibitor and 3 solvent controls), 40 mice for the treatment potential experiment (5 experimental groups; i.e. no treatment, and treatment (or solvent control) started at two different time points) and 48 mice for mechanistic studies (6 experimental groups; i.e. single dose treatment (and solvent control) with 3 time points of sacrifice). Furthermore, we will analyse maximally 2 different pathways/mediators every year (of which half will not pass the GO criteria in experiment 1 or 2).

C. Re-use

Will the animals be re-used?

☒ No, continue with question D.

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

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

☐ No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement – Pulmonary fibrosis is a complex process involving multiple cell types (epithelial cells, fibroblasts, endothelial cells, immune cells) that interact in a space and time dependent manner ultimately leading to fibrosis. These complex interactions cannot be accurately mimicked *in vitro* and consequently we do need experimental animals. All animal experiments will however be based on solid scientific evidence (either obtained ourselves using *in vitro* / patient data or derived from literature) suggesting that a pathway/mediator is involved in fibrosis.

Refinement - To minimize animal discomfort as much as possible, we will employ anaesthesia (as indicated above in the description of the procedure), whereas we will monitor the mice for signs of discomfort and apply humane endpoints (see for details section "Classification of discomfort/humane endpoints" below). In general, animal discomfort will be monitored twice a week but in case discomfort is observed (like large weight loss), daily checks will be in place. In case weight loss is severe (>15%) mice will receive wet food. To further refine the experiments, mice are housed in groups (if possible) in enriched cages with appropriate bedding and free access to food and water. Moreover, we will use mice above 20 grams body weight (10-14 weeks of age) as we previously observed that bleomycin may cause a larger drop in body weight in lighter mice after intranasal administration. Finally, pathway specific inhibitors will preferentially be administered orally or intranasally. In case such an approach is not feasible (for instance when the inhibitor would not be active by such administration), the preferred route of administration will be subcutaneously > intraperitoneally > intravascular.

Reduction - To reduce the number of mice to be used as much as possible, we will use minimal group sizes to obtain significant differences, and we will continue to monitor variability in our experiments to adjust the (minimal) necessary group size in subsequent experiments. Moreover, results obtained in experiments will guide future experiments as indicated above. Finally, we aim to reduce the number of control groups used in the experiments by combining different experiments (if possible), and we will minimise the number of mice to be bred by using a homozygous breeding strategy and by using both male and female mice.

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

The intranasal administration of bleomycin will be performed by experienced biotechnicians to minimise discomfort. To avoid effects on the environment we will strictly follow the D-I and DM-II guidelines for animal experiments (which will be performed in a high health-status, restricted-entry mouse barrier facility of the AMC). Adverse effect on the environment are further minimised by the fact that only organs/tissues taken from mice will be transported to the Laboratory in double sealed containers after which the organs/tissues are analysed in appropriate (ML-I/ML-II) laboratories.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

nvt

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

☒ No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

☒ No > Continue with question H.

☐ Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

☐ No > Continue with question I.

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

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

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

Bleomycin is administered under anaesthesia, whereas mice are also sacrificed under anaesthesia.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

After bleomycin administration mice show a temporary decrease in body weight peaking at around day 10-12 after which their body weight recovers. Occasionally, weight loss does not recover.

Explain why these effects may emerge.

The weight loss is probably due to bleomycin-induced inflammation and loss of appetite.

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

Excessive weight loss is prevented/limited by using mice above 20 g body weight (as the severe weight loss mostly occurs in slightly lighter mice). In case weight loss is >15% (but less than the humane end point of 20% body weight loss) without any additional sign of discomfort, mice will receive wet food and they will be more extensively monitored for discomfort. As soon as their body weight increases, mice will return to normal food.

J. Humane endpoints

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

☐ No > Continue with question K.

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

(1) bad overall behaviour (rough fur, hunched back, walking on its toes, diarrhea), (2) weight loss of >15% compared to highest body weight measured in combination with any sign of discomfort, (3) weight loss of >20% compared to highest body weight measured without any sign of discomfort.

Indicate the likely incidence.

<10%

K. Classification of severity of procedures

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

The discomfort of mice subjected to the systemic bleomycin model consists of:

- Intranasal bleomycin administration → mild discomfort
- Injections (drugs/inhibitors/etc) → mild discomfort
- Blood sampling (only in some mice) → mild discomfort
- Development of fibrosis → moderate discomfort

- Bronchoalveolar lavage and sacrifice → terminal

Overall, we expect the discomfort to be moderate.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

☐ No

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

We need to analyse fibrosis in the lungs of the mice, and consequently we need to collect the lungs.

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

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

☒ Yes



Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	11800	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Academic Medical Center Amsterdam	
1.3	List the serial number and type of animal procedure.	Serial number 2	Type of animal procedure Systemic bleomycin-induced pulmonary fibrosis

Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

Mice will be subjected to bleomycin-induced pulmonary fibrosis. At different time intervals, mice will be sacrificed and pulmonary fibrosis is assessed using standard assays. Specifically, we will determine hydroxyproline levels, collagen deposition and Ashcroft scores to assess the extent of fibrosis, whereas immunohistological stainings for macrophages, extracellular matrix proteins and endothelial cells may be performed to identify underlying mechanisms.

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

Bleomycin will be administered via osmotic minipumps that are implanted under the loose skin on the back of the mice (using pain killing and anesthesia). Mice may be treated with potential inhibitors of fibrosis from the start of the experiment or after the induction of fibrosis (max 1-2 times/day). Inhibitors may be applied subcutaneously, intraperitoneally, intravenously, orally or intranasally depending on the specific inhibitor with maximal volumes as described in Diehl et al, J. Appl. Toxicol. 21, 15-23, 2001. In certain experiments, blood may be collected at different time intervals before and after the induction of fibrosis (maximal 8 ml/kg/2 weeks or 7.5% of the blood volume/week; according to Diehl et al, J. Appl. Toxicol. 21, 15-23, 2001). At the end of the experiment, mice will be sacrificed under anaesthesia. Just before sacrifice, lungs may be flushed to obtain bronchoalveolar lavage fluid (BAL). During the experiment, mice will be weighed to assess animal discomfort (in general twice a week but daily in case large weight loss is observed).

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

Most importantly, power calculations will be performed to determine the smallest group size necessary to obtain significant findings. We will continuously repeat the power calculations to adjust group sizes in subsequent experiments based on the most recent data. Furthermore, obtained results will guide successive experiments (like for instance, delayed treatment experiments will only be performed in case previous experiments already provided proof of principle that the targeted pathway/mediator modifies pulmonary fibrosis).

In a first pilot experiment, we will determine the variability in outcome measures which will allow us to perform a power analysis to determine whether the proposed group size of 8 mice (based on Urawa M, J Thromb Haemost 14:1588-99, 2016) is sufficient for scientifically sound experiments.

B. The animals

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

- mus musculus (as genetically modified mice are available, and the availability of a good model in mice).
- Both male and female mice will be used (as this minimises the number of knock out mice to be bred). Moreover, the combined use of males and females allows to analyse whether pathways/mediators may act in a gender specific manner).
- Wild type and genetically modified (lacking or overexpressing potential fibrotic mediators) mice.
- Mice between 10 and 14 weeks of age (adult mice over 20 g, as we observed previously that bleomycin may causes a large drop in body weight in younger/lighter mice).

- Mice (genetically modified and wild type controls) will be bred at the Academic Medical Center Amsterdam, whereas wild type mice may also be purchased from licenced companies like Charles River or Harlan.

- The maximal number of mice needed to perform all experiments proposed within the 5 years of the project will be around 160. This number is based on a pilot experiment to establish the optimal time point of sacrifice (as outlined in figures 7 in the project proposal; three time points of sacrifice and a control group leading to 32 mice) and subsequent typical experiments with 32 mice (4 experimental groups; i.e. treatment (and solvent control) started at two different time points). Furthermore, we envision to test 1 pathway/mediator per year and thus 4 pathways/mediators during the project.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

☒ No, continue with question D.

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

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

☐ No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement – Pulmonary fibrosis is a complex process involving multiple cell types (epithelial cells, fibroblasts, endothelial cells, immune cells) that interact in a spatial and temporal dependent manner ultimately leading to fibrosis. These complex interactions cannot be accurately mimicked *in vitro* and consequently we do need experimental animals. All animal experiments will however be based on solid

scientific evidence (either obtained ourselves using *in vitro* / patient data or derived from literature) suggesting that a pathway/mediator is involved in fibrosis.

Refinement - Due to the implantation of osmotic pumps, we envision that this particular systemic model causes more discomfort than the intranasal model (as outlined in "Bijlage 1"). Consequently, we will primarily use this particular model only to validate key findings obtained using the intranasal model.

To minimize animal discomfort as much as possible, we will employ anaesthesia and pain killing (as indicated above in the description of the procedure), whereas we will monitor the mice for signs of discomfort and apply humane endpoints (see for details section "Classification of discomfort/humane endpoints" below). In general, animal discomfort will be monitored twice a week but in case discomfort is observed (like large weight loss), daily checks will be in place. In case weight loss is severe (>15%) mice will receive wet food. To further refine the experiments, mice are housed in groups (if possible) in enriched cages with appropriate bedding and free access to food and water. Moreover, we will use mice above 20 grams body weight (10-14 weeks of age) as we previously observed that bleomycin may cause a larger drop in body weight in lighter mice after intranasal administration. Finally, pathway specific inhibitors will preferentially be administered orally or intranasally. In case such an approach is not feasible (for instance when the inhibitor would not be active by such administration), the preferred route of administration will be subcutaneously > intraperitoneally > intravascular.

Reduction - To reduce the number of mice to be used as much as possible, we will use minimal group sizes to obtain significant differences, and we will continue to monitor variability in our experiments to adjust the (minimal) necessary group size in subsequent experiments. Moreover, results obtained in experiments will guide future experiments as indicated above. Moreover, we aim to reduce the number of control groups used in the experiments by combining different experiments (if possible), and we will minimise the number of mice to be bred by using a homozygous breeding strategy and by using both male and female mice.

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

As indicated above, we will use anaesthesia and pain killing if necessary. To avoid effects on the environment we will strictly follow the D-I and DM-II guidelines for animal experiments (which will be performed in a high health-status, restricted-entry mouse barrier facility of the AMC). Adverse effect on the environment are further minimised by the fact that only organs/tissues taken from mice will be transported to the Laboratory in double sealed containers after which the organs/tissues are analysed in appropriate (ML-I/ML-II) laboratories.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

nvt

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

☒ No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

☒ No > Continue with question H.

☐ Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

☐ No > Continue with question I.

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

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

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

Anaesthesia and analgesics used in order to implant Alzet minipumps, whereas mice are sacrificed under anaesthesia.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

We did not yet use this particular model (bleomycin administration via osmotic pumps) in our department, but literature suggests that mortality is around 10% in this model.

Explain why these effects may emerge.

Most likely, this is due to disease progression (i.e. pulmonary fibrosis).

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

Weight loss will be monitored carefully and mice will be sacrificed if weight loss is above the predefined humane end point. Moreover, during the selection of the optimal time point for sacrifice (as based on a pilot experiment as indicated above) mortality is included as an important selection criterion and we may thus select a time point at which mortality is low (or absent).

J. Humane endpoints

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

☐ No > Continue with question K.

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

(1) bad overall behaviour (rough fur, hunched back, walking on its toes, diarrhea), (2) weight loss of >15% compared to highest body weight measured in combination with any sign of discomfort, (3) weight loss of >20% compared to highest body weight measured without any sign of discomfort.

Indicate the likely incidence.

10%.

K. Classification of severity of procedures

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

The discomfort of mice subjected to the systemic bleomycin model consists of:

- Pump placement under anaesthesia → analgetics used → mild discomfort
- Recovery from surgery/anaesthesia → analgetics used → moderate discomfort
- Injections (drugs/inhibitors/etc) → mild discomfort
- Blood sampling (only in some mice) → mild discomfort
- Development of fibrosis → moderate discomfort
- Bronchoalveolar lavage and sacrifice → terminal

Overall, we expect the discomfort to be moderate.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

☐ No

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

We need to analyse fibrosis in the lungs of the mice, and consequently we need to collect the lungs.

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

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

☒ Yes

Format DEC-advies

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

A. Algemene gegevens over de procedure

Bij de punten 1 t/m 7 dienen altijd de gevraagde gegevens te worden ingevuld.

1. Aanvraagnummer
2. Titel van het project Novel treatment options for pulmonary fibrosis
3. Titel van de NTS Betere behandel mogelijkheden voor longfibrose
4. Type aanvraag:
 - ☒ nieuwe aanvraag projectvergunning
 - ☐ wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC
 - telefoonnummer contactpersoon
 - e-mailadres contactpersoon
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ☐ ontvangen door DEC
 - ☐ aanvraag compleet
 - ☐ in vergadering besproken 26-01-2017
 - ☐ anderszins behandeld
 - ☐ termijnonderbreking(en) van / tot
 - ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - ☐ aanpassing aanvraag
 - ☐ advies aan CCD
7. Afstemming IvD

De relevante onderdelen van de vergunningaanvraag (projectvoorstel en bijlagen) zijn in een traject voorafgaand aan de indiening ervan bij de DEC in overleg met de IvD tot stand gekomen.
8. Eventueel horen van aanvrager n.v.t.
 - Datum
 - Plaats
 - Aantal aanwezige DEC-leden
 - Aanwezige (namens) aanvrager
 - Gestelde vraag / vragen
 - Verstrek(e) antwoord(en)
 - Het horen van de aanvrager heeft wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag
9. Correspondentie met de aanvrager n.v.t.
 - Datum
 - Gestelde vraag/vragen
 - Datum antwoord
 - Verstrek(e) antwoord(en)

- De antwoorden hebben ~~wel~~/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag

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

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Is het project vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)? Indien van toepassing, licht toe waarom het project niet vergunningplichtig is en of daar discussie over geweest is.

>Ja

Indien niet vergunningplichtig, ga verder met onderdeel E. Advies.

2. De aanvraag betreft > een nieuwe aanvraag.

3. Is de DEC competent om hierover te adviseren?

> Ja

4. Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom.

> Nee

C. Beoordeling (inhoud)

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

Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling (het onderzoeken van de potentiële rol van nieuwe pathways/mediatoren in longfibrose en het vaststellen van de onderliggende mechanismen). Dit project kan getypeerd worden als een project met vijf subdoelen die onderling een relatie hebben en een tijdsafhankelijkheid hebben. De vijf subdoelen zijn:

- I) Een proof-of-principle experiment met een KO muis: het vaststellen van de rol van een bepaald gen;
- II) Een dosis respons experiment met een inhibitor: vaststellen of het farmacologisch remmen van dit gen de ontwikkeling van longfibrose verbetert;
- III) Vaststellen van een behandelingsprotocol;
- IV) Mechanistische studie; na de bevinding dat het KO model of farmacologisch remmen fibrose vermindert, zal het onderliggende mechanisme bestudeerd worden.
- V) Bevestiging in tweede long fibrose model: de resultaten van 1-4 worden bevestigd in een tweede model

De subdoelen zijn in een logische volgorde opgesteld. Er wordt eerst vastgesteld of een KO muis een verbetering laat zien in de ontwikkeling van longfibrose. Vervolgens wordt onderzocht of dit ook farmacologisch geremd kan worden (indien er geen KO muis beschikbaar is, wordt met deze stap begonnen). Indien dit mogelijk blijkt wordt gekeken of de inhibitor ook therapeutisch gebruikt kan worden (nadat longfibrose

zich al ontwikkeld heeft). Na het vaststellen van de betrokkenheid van de nieuwe pathway/mediator wordt het onderliggende mechanisme verder onderzocht. Tenslotte worden de belangrijkste bevindingen getest in een tweede longfibrose model. Bij iedere stap naar het volgende experiment is een Go/No Go beslissing ingebouwd. Bij een niet significant verschil wordt geen vervolg onderzoek gedaan naar het volgende subdoel. Dit maakt de aanvraag tot een navolgbaar geheel. Het project lijkt haalbaar, afgaande op het voorwerk en de ervaring van deze onderzoekers, de omvang en de aangegeven tijdsspanne.

Het is helder welke handelingen en ongerief individuele dieren zullen ondergaan in de dierproeven die nodig zijn om de subdoelen te bereiken.

Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

2. Geef aan of er aspecten in deze aanvraag zijn die niet in overeenstemming zijn met wet- en regelgeving anders dan de Wod? Denk hierbij aan bijvoorbeeld de Flora en fauna wet en Wet dieren. Indien van toepassing, leg uit om welke aspecten het gaat en waarom hier sprake van is.

> Niet, voor zover kan worden opgemaakt uit de aanvraag.

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

> De aangekruiste doelcategorieën sluiten aan bij de hoofddoelstelling. Er wordt fundamenteel onderzoek gedaan naar de rol van nieuwe pathways/mediatoren in de ontwikkeling van longfibrose. Er wordt ook onderzoek gedaan naar potentiële geneesmiddelen die de longfibrose kunnen remmen. Dit maakt het onderzoek zowel fundamenteel als translationeel.

Belangen en waarden

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

> Het directe doel van het project is inzicht te verkrijgen over de rol van nieuwe pathways/mediatoren in longfibrose en het vaststellen van de onderliggende mechanismen.

Het uiteindelijke doel van het project is om betere medicatie te ontwikkelen die longfibrose tegen kan gaan of zelfs kan verminderen. Het directe doel vormt een logisch en onmisbaar deel van de route naar het uiteindelijke doel en heeft daardoor een reële relatie.

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

> De belangrijkste belanghebbenden in dit fundamentele en translationele project dat gericht is op het verkrijgen van meer inzicht in de rol van nieuwe pathways/mediatoren in longfibrose, zijn de proefdieren, de onderzoekers en de patiënten die longfibrose ontwikkelen.

Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: de dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress en pijn ondervinden. Waarden die voor de onderzoekers bevorderd worden: zij zullen kennis

verkrijgen. Ook zullen de carrièremogelijkheden van de onderzoekers verbeteren door publicaties en mogelijk patenten.

Waarden die voor patiënten met longfibrose bevorderd worden: het ontwikkelen van therapieën die de ontwikkeling van longfibrose kunnen remmen of zelfs kunnen verminderen.

6. Geef aan of er sprake kan zijn van substantiële milieueffecten. Zo ja, benoem deze, leg uit waarom daar sprake van kan zijn en of geef aan of deze effecten afgedekt worden door specifieke wetgeving.

> Er is geen sprake van substantiële milieueffecten, voorzover de DEC dit kan overzien.

Proefopzet en haalbaarheid

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

> De IvD ziet erop toe dat alle personen die bij dit onderzoek betrokken zullen zijn, zowel de analisten en onderzoekers die de experimenten gaan uitvoeren, als de onderzoekers die het project hebben vormgegeven en opgeschreven, voldoen aan de wettelijke eisen van deskundigheid en kennis.

De onderzoeksgroep heeft veel ervaring met het voorgestelde muismodel voor longfibrose. De onderzoekers hebben het bleomycine longfibrose model gepubliceerd en volledig ontwikkeld en zijn bewezen bekwaam in dit onderzoek

Wij achten de kennis en kunde van de onderzoeksgroep voldoende gewaarborgd.

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

> De opzet van het project en van alle experimenten die worden ingezet voor elk van de subdoelen, is logisch en goed te begrijpen. De aangegeven doelstelling kan met deze experimentele aanpak behaald worden. Er wordt gestart met een "proof-of-principle" proef waarin de betrokkenheid van een gen in de ontwikkeling van longfibrose in een KO-muis bepaald wordt. Vervolgens wordt onderzocht of dit ook met een farmacologische remmer behaald kan worden, daarna wordt een behandelingsprotocol ontwikkeld en wordt onderzocht of het ook therapeutisch gebruikt kan worden (na het ontstaan van longfibrose). Indien dit het geval is wordt ook het onderliggende mechanisme verder onderzocht. Tenslotte wordt onderzocht of de bevindingen bevestigd kunnen worden in een tweede proefdiermodel voor longfibrose, om de translatie naar de kliniek te verbeteren. Dit project is goed opgezet en kan leiden tot het behalen van de doelstelling.

Welzijn dieren

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

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

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

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

> Er is voldaan aan bijlage III

11. Beoordeel of het ongerief als gevolg van de dierproeven realistisch is ingeschat en geclassificeerd, waarbij uitgegaan wordt van de kans op angst, pijn, stress en/of ziekte bij individuele dieren (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*).

> Ongeriefinschatting is in overleg met de IvD tot stand gekomen, met gebruikmaking van de Toelichting Codering Ongerief

12. Geef aan op welke wijze de integriteit van de dieren wordt aangetast (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*). (*zie bijlage I voor voorbeeld*).

> De "heelheid" van het dier wordt niet aangetast zodanig dat sprake is van vermindering of ontneming van soortspecifieke eigenschappen.

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

> De humane eindpunten zijn helder gedefinieerd (uiterlijke kenmerken/>15% gewichtsverlies+tekenen van ongerief/>20% zonder tekenen van ongerief), en de inschatting van het percentage dieren (<10% in intranasale bleomycine model en 10% in het systemische bleomycine model) dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken is per dierproef, op basis van ervaring van de onderzoeksgroep, realistisch ingeschat.

14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn? Onderbouw uw antwoord (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).
- > De samenhang tussen epitheliale cellen, fibroblasten, endotheliale cellen en cellen van het immuunsysteem is zeer complex. Dit kan niet worden nagebootst in een *in vitro* model. Vervanging van de aangevraagde dierproeven is hierdoor niet mogelijk, maar waar mogelijk maken de onderzoekers gebruik van *in vitro* experimenten, patiëntmateriaal of de literatuur om de meest geschikte mediators/pathways te selecteren voordat er een dierproef gedaan wordt.
15. Beoordeel of het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en of er een heldere strategie is om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Onderbouw uw antwoord (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).
- > De aantallen dieren zijn ingeschat op basis van een power van 80% en een tweezijdige alpha van 0.05. De variatie en het te behalen verschil wordt, waar mogelijk, ingeschat op basis van eerdere experimenten om een zo klein mogelijke groeps grootte te gebruiken. Als deze gegevens niet beschikbaar zijn, dan wordt er gerekend met een variatie van 35% en een verschil van >50%. Dan zijn er acht muizen per groep nodig. Hierdoor wordt een realistische schatting gemaakt voor het aantal dieren dat nodig is om een statistisch significant verschil te behalen.
16. Beoordeel of het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project zodanig is opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd? Licht uw antwoord toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).
- > In dit project wordt anesthesie toegepast en worden de muizen goed in de gaten gehouden op het vertonen van tekenen van ongerief. Er zullen iets oudere muizen gebruikt worden, zodat ze wat zwaarder zijn. De behandeling met bleomycine veroorzaakt gewichtsverlies en eerdere proeven lieten zien dat zwaardere muizen minder gewichtsverlies laten zien dan lichtere muizen. Muizen die gewichtsverlies laten zien zullen geweekt voer aangeboden krijgen. De humane eindpunten zijn duidelijk geformuleerd, waarmee de mate van verfijning verder is geborgd.
17. Beoordeel, indien het wettelijk vereist onderzoek betreft, of voldoende aannemelijk is gemaakt dat er geen duplicatie plaats zal vinden en of de aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om tijdens de uitvoering van het project te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt. Onderbouw uw antwoord.
- > n.v.t.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd? Geef ook aan welke maatregelen verder zijn getroffen om bij fok of aankoop van dieren het aantal in voorraad gedood te beperken (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3; zie bijlage I voor voorbeeld*).
- > Zowel mannelijk als vrouwelijke dieren zullen in gelijke mate worden ingezet.
19. Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef). Indien dieren gedood worden, geef aan of en waarom dit noodzakelijk is voor het behalen van de doelstellingen van het project. Indien dieren gedood wor-

den, geef aan of er een voor de diersoort passende dodingsmethode gebruikt wordt die vermeld staat in bijlage IV van de richtlijn. Zo niet, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht dit toe. Indien van toepassing, geeft ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

> De dieren worden in het kader van de proef gedood volgens een methode van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Doden is noodzakelijk omdat in het kader van het experiment de weefsels uit het dier moeten worden gehaald voor analyse.

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

> n.v.t.

NTS

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

> Ja, deze is in overleg met de afdeling communicatie van de vergunninghouder bewerkt met het oog op de begrijpelijkheid.

D. Ethische afweging

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

Rechtvaardigt het verkrijgen van meer inzicht in de rol die nieuwe pathways/mediatoren spelen in het ontwikkelen van longfibrose en het verkrijgen van inzicht in de onderliggende mechanismen, het matige ongerief dat de muizen als proefdieren in het onderzoek zullen ervaren?

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

De belangrijkste belanghebbenden in dit fundamentele en translationele project dat gericht is op ***het bevestigen of weerleggen van de potentiële rol van nieuwe pathways/mediatoren in longfibrose en het vaststellen van de onderliggende mechanismen***, zijn op korte termijn de proefdieren en de onderzoekers.

Op lange termijn bestaan de belanghebbenden uit de patiënten die lijden aan longfibrose. De muizen worden door dit onderzoek geschaad omdat het pijn en stress veroorzaakt. In

de muizenmodellen worden maximaal 1000 muizen gebruikt die een matig ongerief ondergaan.

De andere groep direct belanghebbenden, namelijk de onderzoekers, zullen door dit onderzoek hun fundamentele kennis en inzichten vergroten, welke gedeeld zullen worden met het wetenschappelijke veld. Aanvullende belangen van onderzoekers zouden kunnen zijn dat meewerken aan dit onderzoek hun carrièremogelijkheden vergroot door publicaties en dat zij nieuwe vindingen mogelijk kunnen patenteren.

Minder direct aanwezig zijn de waarden en belangen van patiënten. De inzichten die dit onderzoek zal opleveren, kunnen op termijn een belangrijke bijdrage leveren aan de ontwikkeling van nieuwe therapieën voor longfibrose. In dit onderzoek worden ook specifieke remmers onderzocht die zouden kunnen leiden tot een therapie voor patiënten. Dit valt echter buiten het directe onderzoeksdoel van deze studie.

Hoewel maximaal 1000 muizen matig ongerief zullen ondergaan, acht de DEC dit gerechtvaardigd vanwege de verwachte gunstige gevolgen van dit onderzoek. De gekozen longfibrose modellen zullen matig ongerief veroorzaken in de muizen, maar de DEC erkent dat deze modellen de meest geschikte modellen zijn om deze vraagstelling in te beantwoorden. Het maatschappelijke belang van deze projectaanvraag is dat er meer inzicht komt in de onderliggende mechanismen in het ontstaan van longfibrose. Er worden verschillende farmacologische remmers onderzocht op hun potentie om longfibrose te voorkomen en zelfs te verbeteren als longfibrose zich al ontwikkeld heeft. De toepassing van dit inzicht in de behandeling van longfibrose zal nog jaren duren en ligt buiten dit voorstel. Het wetenschappelijke belang is in dit project duidelijk geformuleerd en dit projectvoorstel zal hier direct aan bijdragen.

De DEC waardeert de vermeerdering van fundamentele kennis over de etiologie van longfibrose op korte termijn als het meest zwaarwegende gevolg dat tegenover het maximaal matige ongerief van 1000 muizen staat. Dat het onderzoek ook nog maatschappelijke gevolgen heeft doordat de inzichten verkregen uit dit onderzoek in de toekomst kunnen worden gebruikt voor de behandeling van longfibrose weegt ook mee, zij het in mindere mate.

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

Betere behandelmogelijkheden voor longfibrose

De DEC is van mening dat het belang van het verkrijgen van nieuwe inzichten in de potentiële rol van nieuwe pathways en mediators in het ontwikkelen van longfibrose en inzicht in de onderliggende mechanismen (het wetenschappelijk belang), en op langere termijn, de bijdrage aan nieuwe therapieën voor longfibrose (het maatschappelijke belang), het matige ongerief dat de maximaal 1000 muizen in dit onderzoek zullen ervaren, rechtvaardigt.

De DEC acht het aannemelijk dat de doelstelling behaald zal worden. De kennis en kunde van de onderzoekers is aanwezig. Het wetenschappelijke belang van de doelstelling is duidelijk geformuleerd en zal de directe opbrengst zijn van dit onderzoek. Het maatschappelijke belang van de doelstelling is dat er meer inzicht komt in de onderliggende mechanismen van longfibrose en dat de effectiviteit van specifieke remmers onderzocht zal worden. De onzekerheid dat deze kennis daadwerkelijk bijdraagt aan een nieuwe therapie, is meegewogen in het advies. Voorafgaande

resultaten uit *in vitro* werk, patiëntmateriaal of de literatuur zullen gebruikt worden om nieuwe pathways en mediators te selecteren voor verder onderzoek in proefdieren.

Om de doelstelling te bereiken worden muizen als proefdieren gebruikt. Het matige ongerief dat de muizen ondergaan, komt door het veroorzaken van de longfibrose (bleomycine induceert een ontsteking en veroorzaakt verlies in eetlust en daardoor gewichtsverlies). De vraagstelling kan het beste beantwoord worden in een model voor longfibrose. De bleomycine geïnduceerde longfibrose modellen worden algemeen gebruikt in longfibrose onderzoek. De bevestiging van de resultaten in een tweede longfibrose model vergroot de kans dat het succesvol zal zijn in de kliniek. Het tweede model is ook door bleomycine geïnduceerd maar wordt systemisch toegediend. Dit is de beste keus omdat dit een ander ontstekingspatroon geeft in de long dan het intranasale model, andere "schade inductie" modellen zijn vergelijkbaar met het acute intranasale bleomycine model. De noodzaak van het gebruik van longfibrose modellen weegt mee in de afweging tussen het matige ongerief van de dieren ten opzichte van de belangen.

De onderzoekers beperken het ongerief van de dieren door verschillende maatregelen (veel ervaring met de modellen, duidelijk geformuleerde humane eindpunten met voldoende controle momenten, aanbod van gewoekt voer bij gewichtsverlies, en er worden zwaardere muizen gebruikt die minder gewichtsverlies laten zien dan lichtere muizen).

De DEC is bovendien van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven wetenschappelijke doelstellingen en dat de gekozen strategie en de experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen de kaders van het project. De DEC is er verder van overtuigd dat de aanvrager voldoende kennis en kunde heeft om de doelstelling te behalen. Tevens verwacht de DEC op basis van deze aanvraag dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om zowel het ongerief van de dieren alsmede het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken. De aanvrager heeft volgens de DEC overtuigend aangegeven dat gebruik van muizen voor het behalen van het directe doel noodzakelijk is en dat er geen geschikte proefdiervrije alternatieven mogelijk zijn.

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

E. Advies

1. Advies aan de CCD

☐ **De DEC adviseert de vergunning te verlenen.**

☐ De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden

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

☐ Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist

- ☐ Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...
- ☐ De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
 - ☐ De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen
 - ☐ De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...
 - ☐ De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...
- 2. Het uitgebrachte advies kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt in de DEC. Indien gebaseerd op een meerderheidsstandpunt, specificeer het minderheidsstandpunt op het niveau van verschillende belanghebbenden en de waarden die in het geding zijn (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.A; zie bijlage I voor voorbeeld*).

Dit DEC-advies is unaniem tot stand gekomen.

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

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academic Medical Center Amsterdam

Meibergdreef 31
1105 AZ AMSTERDAM



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD118002017845

Bijlagen

2

Datum 14 februari 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 14 februari 2017. Het gaat om uw project "Novel treatment options for pulmonary fibrosis". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD118002017845. 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:

14 februari 2017

Aanvraagnummer:

AVD118002017845

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
14 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD118002017845

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 11800
Naam instelling of organisatie: Academic Medical Center Amsterdam
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 343362777
Straat en huisnummer: [REDACTED]
Postcode en plaats: 1105 AZ AMSTERDAM
IBAN: NL68RABO0136166741
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: AMC

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u?

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

Datum:

14 februari 2017

Aanvraagnummer:

DEC18002017845

Over uw project

Geplande startdatum:

1 januari 2018

Geplande einddatum:

31 december 2022

Titel project:

Novel treatment options for pulmonary fibrosis.

Titel niet-technische samenvatting:

Betere behandelmogelijkheden voor longfibrose.

Naam DEC:

DEC AMC

Postadres DEC:

Meibergdreef 31

E-mailadres DEC:

[REDACTED]

Betaalgegevens

De leges bedragen:

€ 1.287,-

De leges voldoet u:

na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen:

- ☒ Projectvoorstel
☒ Beschrijving Dierproeven
☒ Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen:

- ☒ DEC-advies

Ondertekening

Naam:

[REDACTED]

Functie:

[REDACTED]

Plaats:

Amsterdam

Datum:

10 februari 2017



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

AMC crediteurenadministratie
Postbus Postbus 400
1115 ZJ Duivendrecht



**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
AVD118002017845

Bijlagen

2

Datum 14 februari 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 14 februari 2017
Vervaldatum: 16 maart 2017
Factuurnummer: 170845
Ordernummer: Kostenplaatsnummer [REDACTED]

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD118002017845	€ 1.287,00

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.

**Centrale Commissie Dierproeven**

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academic Medical Center Amsterdam

Meibergdreef 31
1105 AZ AMSTERDAM
|||||

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD118002017845
Bijlagen
1

Datum 5 april 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 14 februari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Novel treatment options for pulmonary fibrosis." met aanvraagnummer AVD118002017845. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

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

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

U kunt met uw project "Novel treatment options for pulmonary fibrosis." starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 januari 2018 tot en met 31 december 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC AMC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 14 februari 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

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

Datum:
5 april 2017
Aanvraagnummer:
AVD118002017845

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:

Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Academic Medical Center Amsterdam

Adres: Meibergdreef 31

Postcode en plaats: 1105 AZ AMSTERDAM

Deelnemersnummer: 11800

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 januari 2018 tot en met 31 december 2022, voor het project "Novel treatment options for pulmonary fibrosis." met aanvraagnummer AVD118002017845, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC AMC. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Associate professor.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 14 februari 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 27 februari 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 27 februari 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 14 februari 2017, ontvangen op 14 februari 2017.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1. Intranasal bleomycin-induced pulmonary fibrosis				In het hele project worden maximaal 1000 dieren gebruikt.
	Muizen (Mus musculus) /	1.000	100% Matig	
3.4.4.2. Systemic bleomycin-induced pulmonary fibrosis				In het hele project worden maximaal 1000 dieren gebruikt.
	Muizen (Mus musculus) /	1.000	100% Matig	

Voorwaarden

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

Aanvraagnummer:

AVD118002017845

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

In artikel 10, lid 1 sub a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen 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:

AVD118002017845

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:
AVD118002017845

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.