

	<b>Dossier: 10800202216538</b>	
		<b>Aanwezig</b>
<b>1</b>	<b>NTS</b>	<b>X</b>
<b>2</b>	<b>Aanvraagformulier</b>	<b>X</b>
<b>3</b>	<b>Projectvoorstel</b>	<b>X</b>
<b>4</b>	<b>Bijlage beschrijving dierproeven</b>	<b>X</b>
<b>5</b>	<b>DEC-advies</b>	<b>X</b>
<b>6</b>	<b>Ontvangstbevestiging</b>	<b>X</b>
	<b>Evt. Vragen CCD aan aanvrager</b>	<b>X</b>
	<b>Evt. antwoorden aanvrager</b>	<b>X</b>
<b>7</b>	<b>Beschikking en vergunning</b>	<b>X</b>

## NIET-TECHNISCHE PROJECTSAMENVATTING

Naam van het project	Het verjongen van de rug: een remedie tegen rugpijn
NTS-identificatiecode	NTS-NL-068184 v.1, 27-12-2022
Land	Nederland
Taal	nl
Duur van het project, uitgedrukt in maanden.	60
Trefwoorden	Slijtage Rugpijn Stamcellen Vertaling Biomaterialen
Doel(en) van het project	Fundamenteel onderzoek: Spier- en skeletstelsel Omzettinggericht en toegepast onderzoek: Spier- en botandoeningen bij de mens Omzettinggericht en toegepast onderzoek: Ziekten en aandoeningen van dieren

## DOELSTELLINGEN EN VERWACHTE VOORDELEN VAN HET PROJECT

Beschrijf de doelstellingen van het project (bijvoorbeeld het aanpakken van bepaalde wetenschappelijke onduidelijkheden, of wetenschappelijke of klinische behoeften).	Het hoofddoel van het project is om een nieuwe therapie te ontwikkelen voor chronische rugpijn bij zowel mens als hond. Chronische rugpijn wordt veroorzaakt door een versleten tussenwervelschijf, wat kan leiden tot een hernia. Een patiënt met chronische rugpijn krijgt eerst pijnstillers. Wanneer die niet meer werken, is de enige optie een operatie. Daarbij wordt de tussenwervelschijf ofwel vervangen, ofwel weggehaald, waardoor de wervels aan elkaar groeien. Het herstel duurt lang en lukt lang niet altijd helemaal. Om operaties te voorkomen moet rugslijtage behandeld worden in een vroeg stadium. Het is van groot belang om nieuwe behandelmethoden te ontwikkelen: de maatschappelijke impact van chronische rugpijn is groot, en de bestaande behandelmethoden zijn niet afdoende. De ontwikkeling van de tussenwervelschijf wordt aangestuurd door signalen van bepaalde kleine deeltjes, moleculen. Deze signalen gaan we gebruiken om te proberen de versleten rug te verjongen in twee therapiën: (1) een combinatie van stamcellen en biomaterialen en (2) heel kleine synthetische bolletjes.
Welke potentiële voordelen kan dit project opleveren? Leg uit hoe de wetenschap vooruit kan worden geholpen of mensen, dieren of het milieu uiteindelijk voordeel kunnen hebben bij het project. Maak, waar van toepassing, een onderscheid tussen voordelen op korte termijn (binnen de looptijd van het project) en voordelen op lange termijn (die mogelijk pas worden bereikt nadat het project is afgerond).	Dit project heeft als doel om kennis uit het laboratorium te vertalen naar de patiënt die lijdt aan chronische rugpijn. Het betreft dus hier zowel mensen als honden. Honden hebben ook last van rugpijn en versleten tussenwervelschijven zoals mensen. Ons onderzoek draagt bij aan de wetenschappelijke kennis over de nieuwe therapieën die ontwikkeld worden, maar ook aan de verbetering van de behandeling en levenskwaliteit van zowel honden als mensen met chronische rugpijn.

**VOORSPELDE SCHADE**

<p>In welke procedures worden de dieren gewoonlijk gebruikt (bijvoorbeeld injecties, chirurgische procedures)? Vermeld het aantal en de duur van deze procedures.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- De proefdieren worden onderzocht om te kijken of ze rugpijn hebben en om uit te sluiten of ze andere kwalen hebben (denk aan artrose): dit wordt minimaal 4 maal gedaan en indien dit voor het welzijn van de hond nodig is vaker (15 minuten)</li> <li>- Bloedafname: maximaal 12 maal (5 minuten) om te kijken de behandeling een afstotingsreactie geeft in het lichaam</li> <li>- MRI-scan: 3 maal onder algehele narcose (45 minutes) om te kijken hoe de tussenwervelschijven reageren in de tijd op de behandeling</li> <li>- Tussenwervelschijven chirurgisch laten slijten onder algehele narcose (1.5 tot 2 uur). Dit is nodig om de behandeling te kunnen testen op sterk versleten tussenwervelschijven.</li> <li>- De behandelende stof injecteren in de tussenwervelschijf onder algehele narcose (1 tot 1.5 uur).</li> </ul>																
<p>Wat zijn de verwachte gevolgen/nadelige effecten voor de dieren, bijvoorbeeld pijn, gewichtsverlies, inactiviteit/verminderde mobiliteit, stress, abnormaal gedrag, en wat is de duur van die effecten?</p>	<p>In het onderzoek naar de behandeling van rugslijtage zullen we dieren moeten opereren onder algehele verdoving. Hiermee creëren we slijtage, wat matig ongerief zal geven. Voor de behandelingen krijgen de dieren een injectie in de tussenwervelschijf, wat licht ongerief geeft. Tot nu toe hebben we geen bijwerkingen gezien bij honden die gebruikt zijn in eerdere vergelijkbare studies.</p>																
<p>Welke soorten en aantallen dieren zullen naar verwachting worden gebruikt? Wat zijn de verwachte ernstgraden en de aantallen dieren in elke ernstcategorie (per soort)?</p>	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th rowspan="2" style="text-align: left;"><i>Soort:</i></th> <th rowspan="2" style="text-align: center;"><i>Totaal aantal</i></th> <th colspan="4" style="text-align: center;"><i>Geraamde aantallen naar ernstgraad</i></th> </tr> <tr> <th style="text-align: center;"><i>Terminaal</i></th> <th style="text-align: center;"><i>Licht</i></th> <th style="text-align: center;"><i>Matig</i></th> <th style="text-align: center;"><i>Ernstig</i></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Honden (Canis familiaris)</td> <td style="text-align: center;">21</td> <td style="text-align: center;">0</td> <td style="text-align: center;">0</td> <td style="text-align: center;">21</td> <td style="text-align: center;">0</td> </tr> </tbody> </table>	<i>Soort:</i>	<i>Totaal aantal</i>	<i>Geraamde aantallen naar ernstgraad</i>				<i>Terminaal</i>	<i>Licht</i>	<i>Matig</i>	<i>Ernstig</i>	Honden (Canis familiaris)	21	0	0	21	0
<i>Soort:</i>	<i>Totaal aantal</i>			<i>Geraamde aantallen naar ernstgraad</i>													
		<i>Terminaal</i>	<i>Licht</i>	<i>Matig</i>	<i>Ernstig</i>												
Honden (Canis familiaris)	21	0	0	21	0												
<p>Wat gebeurt er met de dieren die aan het einde van de procedure in leven worden gehouden?</p>	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th rowspan="2" style="text-align: left;"><i>Soort:</i></th> <th colspan="3" style="text-align: center;"><i>Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren</i></th> </tr> <tr> <th style="text-align: center;"><i>Hergebruikt</i></th> <th style="text-align: center;"><i>Teruggeplaatst</i></th> <th style="text-align: center;"><i>Geadopteerd</i></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td> </td> <td> </td> <td> </td> <td> </td> </tr> </tbody> </table>	<i>Soort:</i>	<i>Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren</i>			<i>Hergebruikt</i>	<i>Teruggeplaatst</i>	<i>Geadopteerd</i>									
<i>Soort:</i>	<i>Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren</i>																
	<i>Hergebruikt</i>	<i>Teruggeplaatst</i>	<i>Geadopteerd</i>														
<p>Geef de redenen voor het geplande lot van de dieren na de procedure.</p>	<p>In alle gevallen worden de dieren gedood om de weefsels te kunnen onderzoeken. We nemen contact op met andere onderzoeksgroepen om te zorgen dat zij ook organen en weefsels kunnen verzamelen. hiermee kunnen de dieren voor meerdere doelen gebruikt worden.</p>																

## TOEPASSING VAN DE DRIE V'S

<p><b>1. Vervanging</b> Beschrijf welke diervrije alternatieven op dit gebied voorhanden zijn en waarom zij niet voor het project kunnen worden gebruikt.</p>	<p>Onze groep verzamelt weefsels en cellen van overgebleven organen van dieren uit eigen studies en studies van andere groepen om laboratoriumonderzoek te doen. Dit leidt ertoe dat we pas in een zeer late fase van onderzoek overgaan op het gebruik van dierproeven.</p>
<p><b>2. Vermindering</b> Leg uit hoe de aantallen dieren voor dit project zijn bepaald. Beschrijf de stappen die zijn genomen om het aantal te gebruiken dieren te verminderen en de beginselen die zijn gebruikt bij het opzetten van de studies. Beschrijf, waar van toepassing, de praktijken die gedurende het hele project zullen worden toegepast om het aantal dieren die in overeenstemming met de wetenschappelijke doelstellingen werden gebruikt, tot een minimum te beperken. Deze praktijken kunnen bijvoorbeeld bestaan uit proefprojecten, computermodellen, het delen van weefsel en hergebruik.</p>	<p>Voorafgaand aan de laatste stap in een proefdier is er sterk geselecteerd met behulp van eerdere experimenten in het laboratorium, zodat alleen veelbelovende behandelingen worden getest. We testen meerdere behandelingen op één dier (dit is mogelijk aangezien de honden meerdere tussenwervelschijven hebben die we kunnen gebruiken), waardoor het totale aantal benodigde dieren sterk gereduceerd wordt. We hebben ons onderzoek zo ingericht dat we van iedere tussenwervelschijf die behandeld wordt alle informatie verzamelen. Hiermee zorgen we ook voor vermindering van dieren in het onderzoek. Hiernaast worden onbehandelde tussenwervelschijven ook verzameld voor het isoleren van cellen of doen van andere (biomechanische) tests. Andere onderzoeksgroepen worden in de gelegenheid gesteld niet benodigde weefsels en organen te verzamelen.</p>
<p><b>3. Verfijning</b> Geef voorbeelden van de specifieke maatregelen (bv. verscherpte monitoring, postoperatieve behandeling, pijnbestrijding, training van dieren) die in verband met de procedures moeten worden genomen om de welzijnskosten (schade) voor de dieren tot een minimum te beperken. Beschrijf de mechanismen om gedurende de looptijd van het project nieuwe verfijningstechnieken in gebruik te nemen.</p>	<p>Om nieuwe behandelingen te testen gebruiken we de hond, waarmee veel ervaring is opgedaan binnen onze groep met onderzoek naar rugslijtage. Voor de hond is veel bekend over pijn en pijnbestrijding. De hond heeft een ziektebeeld dat zeer vergelijkbaar is met de slijtage die we bij mensen zien. Verder onderzoeken we ook behandelingen voor rugslijtage bij de hond, die uiteraard het beste proefdier voor de eigen soort is. Door een lokale injectie met de behandeling te geven in plaats van een operatie wordt ongerief sterk beperkt.</p>
<p>Licht de keuze van de soorten en de bijbehorende levensstadia toe</p>	<p>De hond wordt beschouwd als een goed proefdier om versleten tussenwervelschijven te onderzoeken, aangezien hun tussenwervelschijven hetzelfde ziekteproces doorlopen als die van mensen. We zien in de praktijk veel honden met (lage) rugpijn. Met deze studie worden dus zowel mensen als honden met rugpijn geholpen. We gebruiken Beagles, die een constante en milde slijtage in alle tussenwervelschijven vertonen op een leeftijd van 1-3 jaar.</p>

**VOOR EEN BEOORDELING ACHTERAF GESELECTEERD PROJECT**

Project geselecteerd voor BA?	nee
Termijn voor BA	
<a href="#">Reden voor de beoordeling achteraf</a>	
Bevat ernstige procedures	
Maakt gebruik van niet-menselijke primaten	
Andere reden	
Toelichting van de andere reden voor de beoordeling achteraf	

**AANVULLENDE VELDEN**

Link naar de eerdere versie van de NTS buiten het EC-systeem	
--	--

Current version: 6.17.202210281736 (f264c44)Version date: 2022-10-28 17:36:40



## Aanvraag Projectvergunning Dierproeven *Administratieve gegevens*

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

### 1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in	10800
		<input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen	
1.2	Wat voor aanvraag doet u?	<input checked="" type="checkbox"/> Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 1.3	
		<input type="checkbox"/> Wijziging > Vul hiernaast het AVD nummer van uw vergunde project in en ga verder met vraag 2.1	
		<input type="checkbox"/> Melding > Vul hiernaast het AVD nummer van uw vergunde project in en ga verder met vraag 2.2	
1.3	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie Universiteit Utrecht	
		Titel, voorletters en achternaam van de portefeuillehouder	Titel Voorletters Achternaam <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw
		E-mailadres contactpersoon	info@ivd-utrecht.nl
		Titel, voorletters en achternaam van de diens gemachtigde (indien van toepassing)	Titel Voorletters Achternaam <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw
		E-mailadres gemachtigde	
	Vul de gegevens van het postadres in.	Straat en huisnummer	Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht 50
		Postcode en plaats	3584CJ UTRECHT
		Postbus, postcode en plaats	80125 3508TC UTRECHT
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.
		Functie	
		Afdeling	Chirurgie, dept Clinical Sciences, Faculteit Diergeneeskunde
		Telefoonnummer	

1.5	<i>(Indien van toepassing)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	E-mailadres	[REDACTED]
		(Titel) Naam en voorletters	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	
		Afdeling	
1.6	<i>(Indien van toepassing)</i> Vul hier de gegevens in van de persoon aan wie de portefeuillehouder de verantwoordelijkheid inzake de algemene uitvoering van het project en de overeenstemming daarvan met de projectvergunning heeft gedelegeerd.	E-mailadres	
		(Titel) Naam en voorletters	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	
		Afdeling	
1.7	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de Instantie voor Dierenwelzijn	Telefoonnummer	030-2531569
		E-mailadres	info@ivd-utrecht.nl
1.8	Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?	<input type="checkbox"/> Ja > <i>Stuur dan het ingevulde formulier Melding Machtiging mee met deze aanvraag</i> <input checked="" type="checkbox"/> Nee	

## 2 Over uw aanvraag

2.1	Gaat uw aanvraag over een <i>wijziging</i> op een vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn?	<input checked="" type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3 <input type="checkbox"/> Ja > Geef hier onder kort de wijziging en de onderbouwing daarvan weer. Geef in de originele formulieren (niet-technische samenvatting, projectvoorstel en bijlage dierproeven) duidelijk aan (bij voorbeeld in een andere kleur) waar de projectaanvraag wijzigt. Ga daarna verder met vraag 6.
2.2	Gaat uw aanvraag over een <i>melding</i> op een vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn?	<input checked="" type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3 <input type="checkbox"/> Ja > Geef hier onder weer wat deze melding inhoudt en ga verder met vraag 6

## 3 Over uw project

3.1	Wat is de geplande start- en einddatum van het project?	Startdatum	1 - 5 - 2023
		Einddatum (t/m)	30 - 4 - 2028
3.2	Wat is de titel van het project?	Notochordal cell-based therapies for disc regeneration	
3.3	Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	HHet verjongen van de rug: een remedie tegen ruggijn	
3.4	Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) van voorkeur?	Naam DEC	DEC Utrecht
		Postadres	Postbus 85500 3508 GA Utrecht
		E-mailadres	dec-utrecht@umcutrecht.nl

## 4 Factuurgegevens

4.1 (indien factuuradres afwijkt van de gegevens uit vraag 1.3) Vul de gegevens van het factuuradres in.	Naam: UU-ASC	Afdeling:
	Straat:	Huisnummer:
	Postcode:	Plaats:
	Postbus: 80.011	Postcode: 3508TA Plaats: UTRECHT
4.2 (optioneel) Vul hier het ordernummer van de instelling in.	E-mail: asc.factuur@uu.nl	
	Ordernummer: CB.841910.3.01.011	

## 5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?	Verplicht
	<input checked="" type="checkbox"/> Projectvoorstel Aantal bijlage(n) dierproeven 1
	<input checked="" type="checkbox"/> Niet-technische samenvatting
	Overige bijlagen, indien van toepassing
	<input type="checkbox"/> Melding Machtiging
	<input type="checkbox"/>

## 6 Ondertekening

6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD en per post naar de Centrale Commissie Dierproeven (voor adresgegevens zie website)	Ondertekening door de portefeuillehouder namens de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.8). De ondergetekende verklaart:
	<ul style="list-style-type: none"> <li>dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.</li> <li>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.</li> <li>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 C van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.</li> <li>dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.</li> <li>dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.</li> </ul>

Naam	[REDACTED]
Functie	[REDACTED]
Plaats	Utrecht
Datum	26 - 09 - 2022
Handtekening	[REDACTED]



## Formulier

### Projectvoorstel dierproeven

- Dit formulier gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
- Bij dit formulier hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
- Meer informatie vindt u in de 'Toelichting op de te gebruiken formulieren voor de aanvraag van een projectvergunning' op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10800
1.1 Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Universiteit Utrecht
1.3 Vul de titel van het project in.	Notochordal cell-based therapies for disc regeneration

### 2 Categorie van het project

2.1 In welke categorie valt het project?  <i>U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Fundamenteel onderzoek
	<input checked="" type="checkbox"/> Translationeel of toegepast onderzoek
	<input type="checkbox"/> Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
	<input type="checkbox"/> Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid of het welzijn van mens of dier
	<input type="checkbox"/> Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
	<input type="checkbox"/> Hoger onderwijs of opleiding
	<input type="checkbox"/> Forensisch onderzoek
	<input type="checkbox"/> 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 2.1 aangekruiste categorieën.

Low back pain (LBP) is strongly related to degeneration of the intervertebral disc (IVD; the structure present between the vertebral bodies of the spinal column), which is responsible for stability and flexibility of the spine. The disc consist of a gel like core, the nucleus pulposus (NP). The extracellular matrix of the NP consists mainly of proteoglycans (that attract water) and collagen type II. During degeneration, the NP loses its proteoglycans due to matrix catabolism. Consequently, the water binding, shock absorbing and movement enabling capacity of the NP is lost. Ultimately, IVD degeneration results in spinal instability

and bulging of the disc into the spinal canal. This can lead to compression of neural tissues, neurovascular invasion of the disc and inflammation, all inducing chronic pain (Biyani/Andersson 2004).

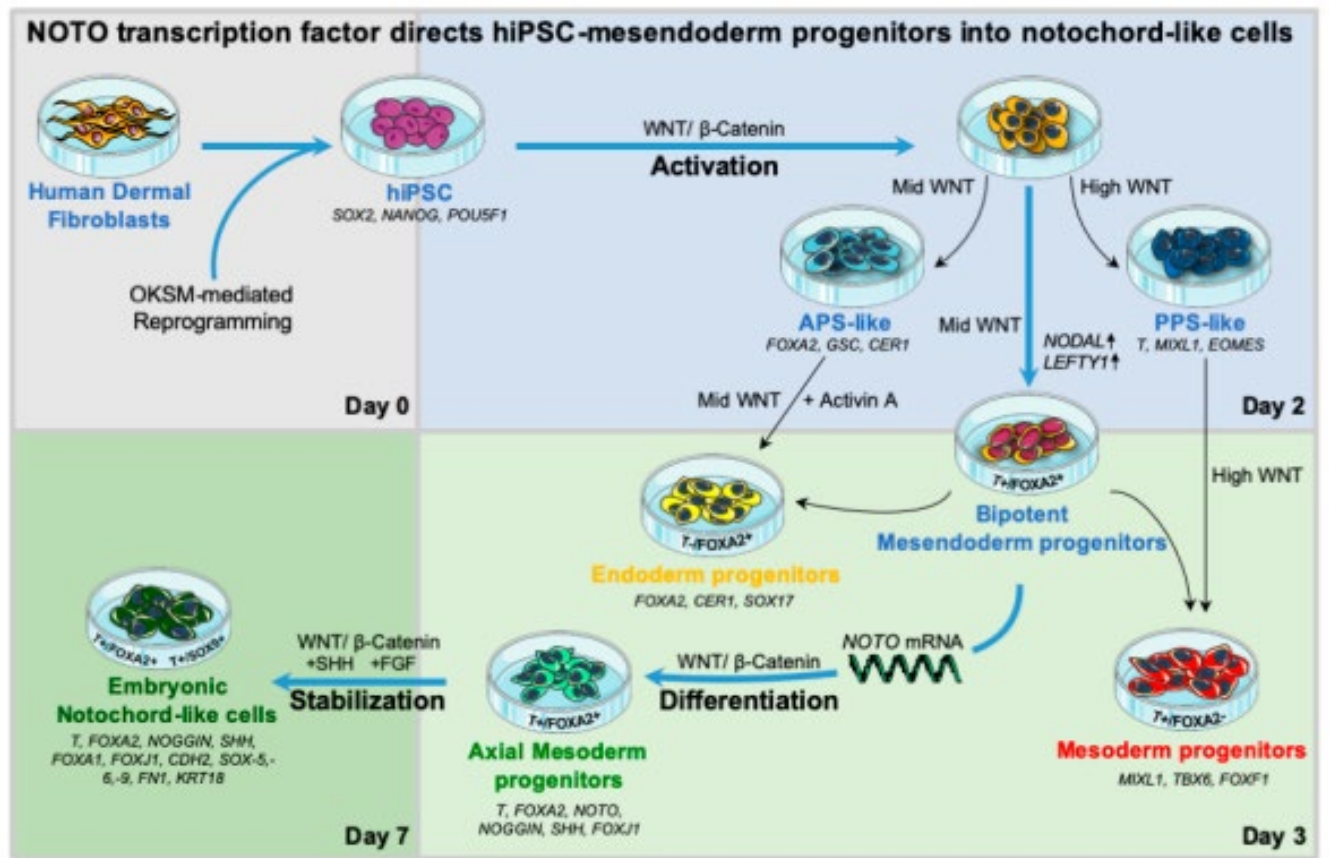
No curative treatment to halt or reverse IVD degeneration-induced LBP is currently available. The current treatments are not disease-modifying nor do they address the underlying cause of the disease. Patients with IVD degeneration initially receive conservative treatment including pain relief medication and physiotherapy. When IVD degeneration has progressed to a stage where pain and loss of function can no longer be managed, only major invasive surgery remains a last resort treatment option. Surgery includes spinal fusion or disc replacement, in which the entire IVD is removed and symptoms are suppressed (Romaniyanto et al. 2022). Last resort spinal surgery yields at best a suboptimal clinical outcome, and does not support a biological and hence functional repair of the diseased disc. For this reason, there is a vast clinical need for an IVD degeneration treatment that not only alleviates pain, but can halt and ultimately reverse IVD degeneration. For a curative LBP treatment, the main requirement is inhibiting the inflammatory/catabolic processes and restoring the IVD biomechanical function through tissue regeneration and repair. So far, research into regenerative therapies for IVD degeneration-induced LBP is mainly based on growth factors and transplantation of allogeneic adult mesenchymal stem cells (MSCs) (Schol & Sakai, 2019). These previous studies have shown promising results in terms of alleviating pain, however, they fail to induce biologic repair of the degenerated IVD, and thus surgery is only delayed.

During early mammalian development, a unique cell type resides in the NP of the IVD: the notochordal cell (NC). NCs secrete factors that are essential for IVD development, and stimulate mature NP cells to produce a healthy extracellular matrix. They replenish and instruct the NP cell population, act as a tissue specific progenitor cell and are considered to have anti-inflammatory and regenerative properties. In studied species that suffer from spontaneous IVD degeneration and LBP (such as humans and chondrodystrophic dogs), cells with NC morphology disappear before skeletal maturity is reached. Because chondrodystrophic dogs lose their NCs early in life, as humans do, we chose to use Beagle experimental dogs (chondrodystrophic dog breed). Since in these species IVD degeneration onset already starts early in life, a vital role for NCs in IVD homeostasis/maintenance is indicated. We have recently reviewed NC-based therapeutic strategies and their potential and we kindly refer to this work for further in depth reading (Bach et al. 2022).

The possibility for NCs to be used in a regenerative strategy is restricted due to limited availability of NC-rich NP tissue (since it is only present in fetal/young discs) which hampers its use as a therapy on a large scale. This is also ethically questionable. A promising cell type for larger scale use are induced pluripotent stem cells (iPSCs). These cells can be derived from any somatic cell type and possess unlimited self-renewal and differentiation potential. Therefore, the ultimate aim of the project is to repopulate IVD tissue with regenerative NC-like cells (NLC), derived from iPSCs (Bach et al. 2022) (Figure 1). This can potentially reverse IVD degeneration and achieve biologic and functional IVD restoration and is therefore the first main aim of this project.

It is anticipated that iPSC-based therapies will face quite some challenges and bottlenecks in their clinical translation which will delay their translation towards a first-in-man clinical studies. Examples of iPSC-specific challenges include: improving the differentiation efficiency, identifying NC-markers, purifying the differentiated cells, and importantly, maturing these into the desired NC phenotype that can thrive and exert therapeutic effects within the degenerate disc. Therefore, the second aim of the current project is to also explore whether, cell-free approaches can be developed building on the unique regenerative potential of NCs. This can be achieved via two avenues exploiting thereby the unique biological potential of

notochordal cells: (a) the specialized matrix NCs produce and (b) the extracellular vesicles secreted by NCs.



**Figure 1. NOTO transcription factor directs human induced Pluripotent Stem cell-derived mesendoderm progenitors to a notochordal fate.** Using human pluripotent stem cells, a two-step method was used to generate a stable NC-like population with a distinct molecular signature. Time-course analysis of lineage-specific markers shows that WNT pathway activation and transfection of the notochord-related transcription factor NOTO are sufficient to induce high levels of mesendoderm progenitors and favour their commitment toward the notochordal lineage. Source: Colombier, P.; Clouet, J.; Chariou, C.; et al. (2016): Generation of human nucleus pulposus cells from stem cells: First steps towards intervertebral disc regeneration., in: Osteoarthritis and Cartilage, Vol. 24, pp. S11–S12.

**Extracellular matrix:** It has been shown that extracellular matrices are required to provide the unique niche for optimal cell function. The specialized matrix produced by NCs has readily been shown to possess regenerative properties (Bach et al. 2018). Therefore, the project will, in parallel to the iPSC-NLCs, also encompass the development of smart biomaterials that build on the potential of the NC-matrix and will have the ability to serve as delivery vehicle, to provide a suitable matrix for instant mechanical support, and to enable optimal NLC regenerative function whilst further reviving the resident NP cells.

**Extracellular vesicles:** We demonstrated that NCs convey their regenerative potential via extracellular vesicles (EVs) (Bach et al., 2017) and identified vesicle-related proteins in porcine, canine, and human NC-conditioned media (Bach et al., 2016). EVs are small lipid bilayer-enclosed particles released by cells. They carry biologically active molecules produced by cells (e.g., mRNA, miRNA, DNA, protein, lipid) for intercellular signaling (Malda et al., 2016). The EV-cargo has been acknowledged for its therapeutic potential both in native and in fully synthetic vesicles serving as drug delivery vehicles (Elsharkasy et al., 2020; Reiner et al., 2017). EVs have recently attracted attention as potential targets for IVD regenerative therapies (Piazza et al., 2020). However, the use of natural EVs in clinical applications is challenging and

has drawbacks (Elsharkasy et al., 2020), including biologic variability, yield, cumbersome isolation, and challenging upscaling and storage to achieve industrial levels. Therefore, within this project we will select a set of NC-EV-biomolecules involved in regulation of nodes in the interconnected signaling pathways facilitating disc regeneration. To this end, we focus on two key nodes in the NC-signaling cascade which have been identified based on targeted proteomic analysis of the NC-EVs. These can be loaded in RNA form on FDA/EMA-approved lipid nanoparticles to develop a cell-free disc regeneration therapy.

### *References:*

- Bach, F. C., et al. (2016). Soluble and pelletable factors in porcine, canine and human notochordal cell-conditioned medium: Implications for IVD regeneration. *European Cells and Materials*, 32, 163–180. <https://doi.org/10.22203/eCM.v032a11>
- Bach, F., et al (2017). Notochordal-cell derived extracellular vesicles exert regenerative effects on canine and human nucleus pulposus cells. *Oncotarget*, 8(51), 88845–88856. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21483>
- Bach, F. C. et al. (2018): Biologic canine and human intervertebral disc repair by notochordal cell-derived matrix: From bench towards bedside, in: *Oncotarget*, Vol. 9, No. 41, pp. 26507–26526.
- Biyani, A.; Andersson, G. B. J. (2004): *Low Back Pain: Pathophysiology and Management*.
- Bach FC et al. (2022): Notochordal Cell-Based Treatment Strategies and Their Potential in Intervertebral Disc Regeneration *Front cell Dev Biol*. doi: doi: 10.3389/fcell.2021.780749.
- Elsharkasy, O. M., et al. (2020). Extracellular vesicles as drug delivery systems: Why and how? In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 159, pp. 332–343). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.04.004>
- Malda, J., et al. (2016). Extracellular vesicles - new tool for joint repair and regeneration. *Nature Reviews Rheumatology*, 12(4), 243–249. <https://doi.org/nrrheum.2015.170>
- Piazza, N., Dehghani, M., Gaborski, T. R., & Wuertz-Kozak, K. (2020). Therapeutic Potential of Extracellular Vesicles in Degenerative Diseases of the Intervertebral Disc. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8(April), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00311>
- Reiner, A. T., et al. (2017). Concise review: Developing best-practice models for the therapeutic use of extracellular vesicles. In *Stem Cells Translational Medicine* (Vol. 6, Issue 8, pp. 1730–1739). Wiley Blackwell. <https://doi.org/10.1002/sctm.17-0055>
- Romaniyanto et al. (2022): An update of current therapeutic approach for Intervertebral Disc Degeneration: A review article, in: *Annals of Medicine and Surgery*, Vol. 77, p. 103619.
- Schol J; Sakai D (2019): Cell therapy for intervertebral disc herniation and degenerative disc disease: clinical trials, *Int Orthop* 43(4):1011-1025. doi: 10.1007/s00264-018-4223-1.

## **3.2 Doel**

3.2.1 Beschrijf het directe en het uiteindelijke doel van het project. Beschrijf de bijdrage van het behalen van het directe doel aan het uiteindelijke doel.

- Indien het directe doel bestaat uit verschillende subdoelstellingen, benoem deze dan hier.

The proposed ethical application focuses on demonstrating proof of concept in a clinically-relevant large animal model of disc degeneration for the abovementioned approaches: (a) iPS-based and (b) cell-free RNA-based therapeutic strategy building on the regenerative potential of notochordal cells. These two aims are the ultimate objectives of the two main projects described below.

The ethical application concerns a project that is in its preclinical stage, where the two aforementioned approaches will be tested. Proof of concept, in this context, refers to demonstrating initial efficacy of the therapeutic approach in a clinically relevant large animal model of disc degeneration and is in essence a Go/NoGo study to further develop these strategies. The therapeutics developed are non-GMP but developed with GMP-compliance in mind, so that later on their production can be transferred to a GMP-environment. In the event beneficial effects at the tissue level are demonstrated, the therapeutic strategy will be improved further based on the fundamental knowledge we collect in parallel to the translational studies described. As such it is anticipated that we will take the step from bench to bedside with the aid of the described proof of

concept studies, whereafter we may need to go back to the bench again to improve, for example, the quality of the cell product (by for example enriching for a specific subpopulation of iPS-NLCs).

There are two main aims each embedded in a separate project:

The **first main aim** is embedded in a collaborative project that will develop and demonstrate the proof-of-concept for a new advanced therapy medicinal product (ATMP), based on a developmental biology-based therapeutic strategy using pluripotent stem cells (iPSC) and biomaterials.

To do this, we have defined three major objectives that culminate to the in vivo proof of concept:

1) Differentiate iPSCs towards notochordal-like cells (NLCs) which are specialized tissue specific progenitor cells with a critical role in rejuvenating the IVD

2) Develop smart biomaterials as a conductive microenvironment to prime iPSCs towards NLCs and instruct IVD regeneration.

3) Demonstrate proof of concept of the new advanced therapy in clinically relevant pre-clinical models.

The proposed ethical application will focus on this last objective. The human iPS cells will be employed in an xenogeneic approach in the dog model. The IVD is a large avascular organ and even in the stages of moderate IVD degeneration there are no blood vessels growing into the center of the IVD, the nucleus pulposus. As such, the human iPS cells will be injected under fluoroscopic guidance in the core of the IVD and will not come in contact with the innate immune system, and hence it is expected that their engraftment will not elicit an immune response. Over the course of the project we will monitor human antibodies in the blood circulation to confirm this.

The **second aim** of the project is, in parallel to the primary aim, and embedded in a collaboration developing a cell-free approach based on the biology of NCs to target moderate IVD degeneration of symptomatic low back pain patients. This is the stage that resident disc cells are not exhausted and can be revived through the pivotal NC-instructions delivered by the lipid nanoparticles that carry the RNA-instructions. To do this, the project has two major objectives:

1) Identify the cargo of the NC-EVs and reconstruct those in RNA form within lipid nanoparticles.

2) Demonstrate proof-of-concept of the cell-free approach in a clinically relevant pre-clinical model.

The nucleic acid sequence of the RNA instructions will be species-specific. In the dog studies proposed we will work with a model of disc degeneration, where degeneration is induced via partial removal of the nucleus pulposus causing moderate disc degeneration as documented by MRI. From previous studies (Bach et al. 2018) we know that in this disc degeneration model the resident cells have the capacity to respond to external stimuli and regenerate.

Bach, F. C. et al. (2018): Biologic canine and human intervertebral disc repair by notochordal cell-derived matrix: From bench towards bedside, in: *Oncotarget*, Vol. 9, No. 41, pp. 26507–26526.

### 3.2.2 Hoe wordt de haalbaarheid van het directe doel gewaarborgd?

*Why is this achievable:*

- 1) The iPS-based therapeutic approach is embedded in an international collaboration. The Horizon 2020 consortium comprises multidisciplinary teams with expertise in the development of advanced therapies and their translation from the bench to the bedside. Expertise represented is: iPSCs and stem cell biology, IVD biology, IVD degeneration-induced LBP, notochordal cells, biomaterials, high throughput ‘omics analyses, safety assessment, spine biomechanics, regenerative medicine, orthopaedic surgery, valorisation; ethics and regulatory affairs of advanced therapies and ATMPs.

- 2) One of the partners in the project already has a dedicated iPSC production site. They have successfully developed reliable reprogramming methods to generate iPSC from cells originating from various cells types including skin fibroblasts and blood-derived cells. In the project, iPSC have been generated from blood-derived cells using the established methods and methodology has been optimized to generate mesendoderm progenitor whereafter with appropriate stimulation these cells enter the notochordal cell lineage. The differentiation of iPSCs towards NLCs has been successfully demonstrated for fibroblast-derived immature iPSCs (Colombier et al. 2016) and over the course of the past three years similar results have been obtained for the iPSC lines generated within the consortium.
- 3) The consortium has selected two lead biomaterials that have been shown to mimic the IVD stem cell niche, thus enabling the iPSCs to undergo directed lineage and survive in the IVD once transplanted. The biocompatibility of these two lead biomaterials is currently being tested in a rat disc degeneration model by an EU partner and results are expected by November 2022. Furthermore, the two lead biomaterials will also be tested in a sheep model of disc degeneration by a European Partner together with the optimal cell dose. Preliminary results are expected by December 2022. In parallel final culture experiments are being conducted at the site of one Partner, who will be doing a head-to-head comparison of the two lead biomaterials with iPSCs. These three lines of actions will result into the selection of One lead biomaterials for a proof of concept study for which we apply for in this ethical application.
- 3) The project part that focuses on the cell-free approach employs nanoparticle technology that is FDA-approved and already in clinical practice. Furthermore, nanomedicine experts with extensive experience in manufacturing these nanoparticles are involved and will produce the nanoparticles to be used. The challenge within this part of the project lies in selecting the instructions to be provided in RNA form. These studies are ongoing and over the course of the coming 3 years, extensive analysis in the laboratory and in IVD tissues collected from cadaveric material will be used to confirm their bioactivity prior to taking the step towards translation in to the proposed large animal model.
- 4) The research group has gained previous experience with dog models for experimental IVD degeneration (n=25 dogs). The results of the previous translational studies have been published #. For the proposed study, the previously established protocols will be used to demonstrate the efficacy of the envisioned approaches (iPSC-based and cell-free nanomedicine) with up and running protocol for disc degeneration, and a comprehensive tool of read out parameters that will allow for complementary analysis of the effects at the tissue level, including read out parameters at the macroscopic, microscopic, imaging and biomechanical level from each disc studied.

#### References:

Colombier, P.; Clouet, J.; Chariou, C.; et al. (2016): Generation of human nucleus pulposus cells from stem cells: First steps towards intervertebral disc regeneration., in: Osteoarthritis and Cartilage, Vol. 24, pp. S11–S12.

#: doi: 10.1016/j.spinee.2018.10.014; doi: 10.1016/j.jconrel.2018.08.019; doi: 10.18632/oncotarget.25476; doi: 10.1002/term.2483

3.2.3 Is voor de uitvoering van dit project andere wet- en regelgeving van toepassing die een invloed zou kunnen hebben op het welzijn van de dieren en/of de haalbaarheid van het directe doel?

Nee

Ja > Geef aan welke wet-en regelgeving van toepassing is en beschrijf de effecten daarvan op het welzijn van de dieren en de haalbaarheid van het project.

Click or tap here to enter text.

### 3.3 Belang

### 3.3.1 Beschrijf het wetenschappelijk en/of maatschappelijk belang van de hierboven beschreven doelen.

#### **Social impact**

Low back pain related to IVD degeneration is an issue that commonly affects both man and dogs. Other species suffer too from back pain, like horses, however the underlying pathology is less well defined. However, for this specific application, it is anticipated that social impact will be primarily focused on the human patients with regard to the iPSC-based therapy. This relates to the costs that come with iPSC-based therapeutic approaches that render such application in veterinary medicine as more challenging from a business case perspective and as such, even though they could be developed for research purposes, the social impact of veterinary patients lies even further ahead.

The envisioned nanomedicine approach (RNA-delivery in lipid nanoparticles) is applicable to both human and dog low back pain patients, as the nucleic acid sequence can be adjusted to the specific sequence of the target species. From the FDA-approved Onpattro-patisiran (2017) delivering siRNA for treating a specific polyneuropathy to the new class mRNA-based vaccine products to combat COVID-19 (e.g., Pfizer-BioNTech and Moderna), lipid nanoparticles are increasingly becoming part of modern medicine. This opens opportunities to translate the proposed innovation into a clinically-feasible therapeutic strategy for the large human and dog low-back-pain patient population. RNA-delivery allows transient protein translation with negligible risk of random integration into the genome—a hazardous side-effect of virus-dependent gene delivery unacceptable for chronic diseases, like IVD-related chronic LBP.

Low back pain (LBP) is a leading cause of disability and morbidity worldwide (Hoy et al. 2014; Maher/Underwood/Buchbinder 2017). Although the cause of LBP is multifactorial, it is widely accepted that a major contributor to LBP is degeneration of the spine's intervertebral discs (IVDs) (Zheng/Chen 2015). It accounts for at least 40% (~280 million) of all LBP cases (Pang et al. 2018; Schwarzer/Aprill/Bogduk 1995), leading to an economic burden of ~€240 billion for the EU (Bevan 2015). The burden for individuals is more profound; patients are forced to retire prematurely, forcing more people out of their workplace than heart disease, diabetes, hypertension, neoplasm, respiratory diseases and asthma combined. As a result, LBP patients accumulate substantially less wealth (up to 87% less) than individuals without LBP (Schofield et al. 2011). Prevalence increases with age, and with the ageing demographic, the societal and economic burden associated with LBP is projected to increase substantially over the coming decades. For patients in which IVD degeneration has progressed to a stage where conservative means can no longer manage clinical symptoms, only surgery remains. This surgery includes spinal fusion or disc replacement, where the entire diseased IVD is removed and thus symptoms are suppressed (Romaniyanto et al. 2022). Last resort spinal surgery entails long term recovery periods with less than satisfactory outcomes; these operations carry profound risks, such as vertebrae not fusing (pseudoarthrosis), further damage to the adjacent IVD (adjacent segment disease), or pain at the site of bone graft harvest. In Europe alone, each year ~300,000 LBP patients require invasive surgery as last resort treatment, a number that places a significant burden on available resources in Health Systems Europe-wide. Even more so, there is an even greater patient population in earlier stages of the disease (~280 million) in need of intervention providing functional repair of the diseased IVD.

#### **Scientific relevance of the iPSC-based therapeutic approach:**

The current project aims at treating LBP associated with IVD degeneration by inhibiting inflammatory/catabolic processes and restoring the IVD biomechanical function through regeneration and repair. The project will generate in depth insight into the nature and biology of iPSC cells within the notochordal cell lineage and how they respond within the degenerative IVD environment. In addition, the

project addresses important technical bottlenecks regarding the use of iPSC technology, such as iPSC derivation, expansion and differentiation. To increase the chance for success of the iPSC-based therapy, a range, from early development to clinical-grade biomaterials, are being developed that closely mimic the IVD stem cell niche, thus enabling the iPSCs to expand, undergo directed lineage and survive in the IVD once transplanted. Even more so, a multitude of new technologies (including Pfirrmann Classifier for quantitative IVD degeneration analysis, Digiwest technology for high-throughput proteomics and tools for cell fate tracking and modulation of immunogenic responses to foreign iPSC) are being developed, improved and used to demonstrate the efficacy and safety of iPSC-based tissue regeneration. The current project will contribute by demonstrating efficacy and adding to the body of evidence regarding safety, including possible immunogenic response to human iPSCs, local tissue reaction on imaging and histology.

In summary, the consortium addresses several important translational bottlenecks in advanced therapy development and will demonstrate long term proof of concept with the proposed animal study. While the project will address these bottlenecks for the IVD degeneration-induced LBP, the methods and technologies to solve these bottlenecks can be further applied to the development of any other iPSC-based advanced therapy.

**Scientific relevance of the RNA-based nanomedicine approach:** Thus far lipid nanoparticles technology has been primarily used for systemic or targeted delivery by modifying the lipid nanoparticle surface. Currently, the clinical application of lipid nanoparticles is confined to infection, cancer and genetic disorders (Hou et al., 2021). The current project will show the feasibility of adapting lipid nanoparticles to the needs of a different tissue that has largely been ignored by the nanomedicine community. Furthermore, lipid nanoparticles delivering NC-instructions could improve lineage commitment and differentiation capacity of iPSC-NLC, chondrocytes and stem cells used in the cartilage and disc regeneration field.

#### *References:*

- Bevan, S. (2015): Economic impact of musculoskeletal disorders (MSDs) on work in Europe, in: Best Practice and Research: Clinical Rheumatology, Vol. 29, No. 3, pp. 356–373.
- Cheung, K. M. C.; Samartzis, D.; Karppinen, J.; Luk, K. D. K. (2012): Are “Patterns” of Lumbar Disc Degeneration Associated With Low Back Pain?, in: Spine, Vol. 37, No. 7, pp. E430–E438.
- Hoy, D.; March, L.; Brooks, P.; et al. (2014): The global burden of low back pain: Estimates from the Global Burden of Disease 2010 study, in: Annals of the Rheumatic Diseases, Vol. 73, No. 6, pp. 968–974.
- Maher, C.; Underwood, M.; Buchbinder, R. (2017): Non-specific low back pain, in: The Lancet, Vol. 389, No. 10070, pp. 736–747.
- Hou, X., Zaks, T., Langer, R., & Dong, Y. (2021). Lipid nanoparticles for mRNA delivery. In Nature Reviews Materials (pp. 1–17). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41578-021-00358-0>
- Pang, H.; Bow, C.; Cheung, J. P. Y.; et al. (2018): The UTE Disc Sign on MRI, in: Spine, Vol. 43, No. 7, pp. 503–511.
- Romaniyanto; Mahyudin, F.; Sigit Prakoeswa, C. R.; et al. (2022): An update of current therapeutic approach for Intervertebral Disc Degeneration: A review article, in: Annals of Medicine and Surgery, Vol. 77, p. 103619.
- Schofield, D. J.; Shrestha, R. N.; Percival, R.; et al. (2011) Early retirement and the financial assets of individuals with back problems doi: 10.1007/s00586-010-1647-8.
- Schwarzer, A. C.; Aprill, C. N.; Bogduk, N. (1995): The sacroiliac joint in chronic low back pain, in: Spine, Vol. 20, No. 1, pp. 31–37.
- Zheng, C. J.; Chen, J. (2015): Disc degeneration implies low back pain Theor Biol Med Model. doi: 10.1186/S12976-015-0020-3.

---

3.3.2 Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden wat hun belang is.

---

The results of the project will be relevant for the following stakeholders:

1) Canine and human IVD degeneration Patients

Up until now, no curative treatment is available to restore tissue integrity of the degenerated IVD. Currently an estimated 280 million patients suffering from IVD degeneration could be eligible for the proposed treatment. As such, a disease-modifying strategy to treat IVD degeneration patients, especially those at the earliest stages of the disease who are most likely to be at the peak of their life, will have a profound impact on their subsequent health and quality of life. In veterinary practice, IVD degeneration in dogs is a common reason for euthanasia in younger dogs. Implementing of the proposed therapy in the veterinary practice would result on a significant impact on canine health as well but for obvious reasons, that relate to iPSC-based therapies and inherent costs, this is in our opinion further away than the human application. Furthermore, as with other dog breeds where breeding is discouraged due to inherited craniofacial malformation causing breathing problems, similar approaches may be necessary to take in order to guide breeding (with the aid of genetic studies) or even discourage breeding of specific breeds.

2) The Scientific Community

The project as a whole will deliver new tools, technologies and methods to facilitate research on iPSC-based therapeutics for IVD degeneration and beyond. The efficacy studies employing the clinically relevant dog model will both generate and can potentially lead to a breakthrough in advanced therapy development for iPSCs guided by smart biomaterials.

3) Clinicians

There is a large clinical need for an effective and early treatment for IVD degeneration-induced LBP, which can prevent, slow down, or reverse the degenerative changes in the IVD. The proposed approach aims to offer a new solution. If the proposed therapy is successful in the dog model, a path forward will be sought to translate the findings into the human clinic. If it appears to be a feasible approach, the present work will generate new opportunities to motivate further development of veterinary iPSC-based therapies

4) Healthcare systems

IVD degeneration-induced LBP is a highly disabling condition affecting large populations of patients worldwide, whom are often in the prime of their lives. Currently available treatments have limited efficacy and do not produce predictable and lasting outcomes. Current costs to manage the symptoms of IVD degeneration-induced LBP are mostly directed at pain relief. The proposed treatment will provide a regenerative treatment strategy to allow the damaged disc to be restored to a functional state. With the delivery of this advanced therapy, IVD degeneration-induced LBP will no longer have to be a chronic disease with inadequate treatment, reducing the burden on healthcare systems.

5) Society

LBP has an annual worldwide socioeconomic impact of over €70 billion. It is known to be the leading cause of disability. IVD degeneration-induced LBP affects mainly individuals aged 25-60 years, i.e. those of a working-class age, and LBP is a leading chronic health problem which forces individuals to retire prematurely, reducing their quality of life and raising the socioeconomic impact over the years. An alternative and effective strategy to target this burden will have a profound effect on society.

6) Industry

The estimated global market for musculoskeletal disorder therapeutics is valued to be \$165 billion in 2020. This growth is driven by new developments that create new options for the treatment of several severe disabling orthopedic diseases. The nanotechnology and drug delivery market worldwide will grow to a projected US \$164 Billion by 2027 based on “Global Market Trajectory & Analytics”. The Regenerative Medicine sector saw venture capital investment grow from \$200 million in 2010 to \$14.6 billion in 2018. Showing the efficacy of the two proposed treatments (iPSC-based for moderate and severe disc degeneration and RNA-based for moderate disc degeneration) in a clinically relevant dog model, will be attractive for investors or industry focusing on developing novel treatments for IVD degeneration human patients.

7) Laboratory animals

The species selected because dogs, like humans, suffer from disc degeneration-related LBP. During the study, laboratory animals will be critically monitored during the procedure in order to ensure their positive welfare states (in the context of the 3Rs).

### 3.4 Strategie

3.4.1 Geef een overzicht van de algemene opzet van het project. Besteed aandacht aan de eventuele fasering in de uitvoering en de samenhang. Vermeld eventuele mijlpalen, keuzemomenten en beslisriteria.

An overview of the methodology used in the project is shown below.

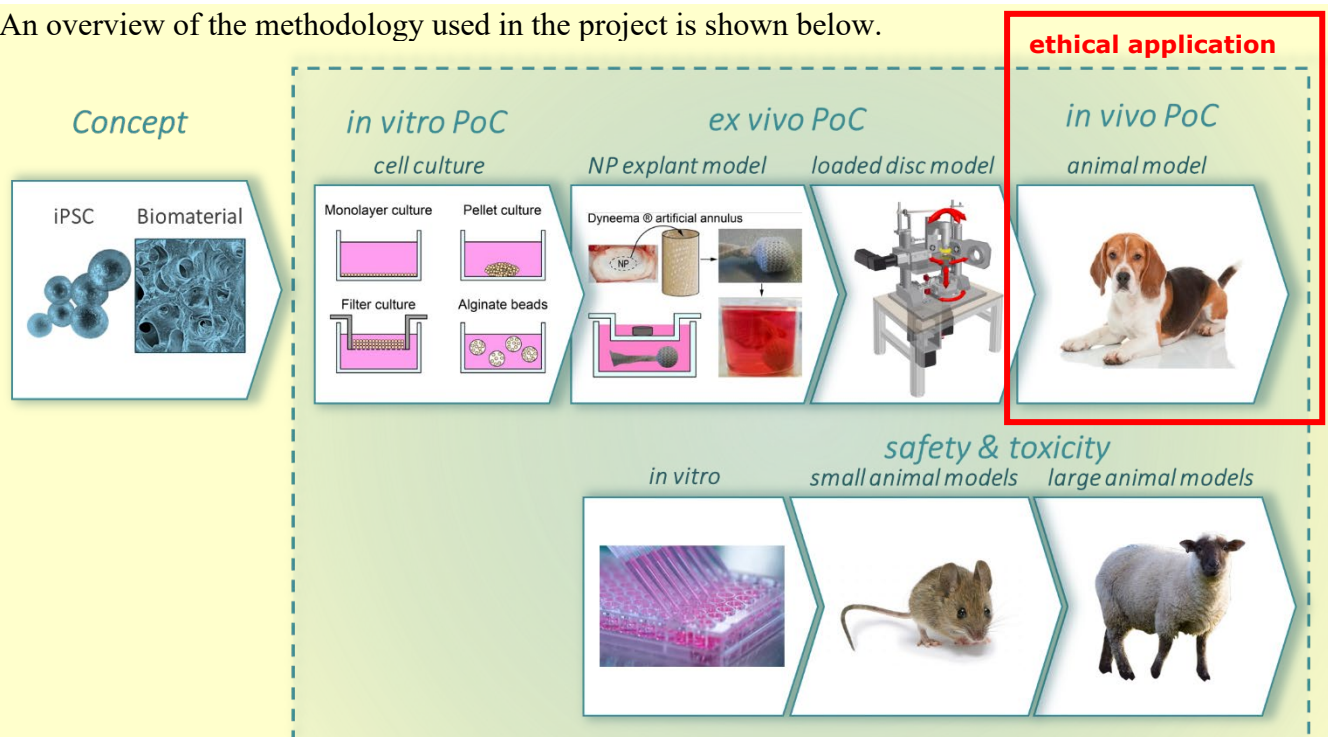


Figure 2. The overall project methodology and pathway from bench to bedside. The ethical application focuses only on the *in vivo* proof of concept. In parallel to ex vivo proof of concept studies, safety studies in rat and sheep models are conducted, which are not part of this project application.

The project encompasses the development of an innovative iPSC-based treatment for IVD degeneration-induced LBP. The project adopts a developmental biology approach where iPSCs are induced to become IVD specific progenitor cells. To increase the chance for success of the iPSC-based therapy, there is a need

to develop biomaterials to closely mimic the IVD stem cell niche, thus enabling the iPSCs to expand, undergo directed lineage and survive in the IVD once transplanted.

#### a) iPSC

To produce a regenerative cell-therapy, in the quantities required for the large IVD degeneration-induced LBP patient population, the project exploits iPSC technology to generate cells within the notochordal cell lineage (iPS-NLCs). To ensure that the developed iPSC line has optimal capacity for NLC differentiation and healthy IVD matrix production, two different sources for iPSC generation and differentiation towards iPS-NLC are being investigated: peripheral blood mononuclear cells (blood-derived iPSCs) and Tie2<sup>+</sup> expressing primary human progenitor IVD-derived cells (Tie2<sup>+</sup>-derived iPSCs). The minimally-invasive blood-derived iPSCs are considered an optimal source from a GMP and clinical application perspective. Tie2<sup>+</sup> derived iPSCs are being explored in parallel as it's suggested that iPSC retain epigenetic hallmarks of parental cells, thus may differentiate more efficiently to functional iPS-NLCs. The optimal cell source will be selected using predefined criteria and their safety and possible efficacy are assessed *ex vivo* in tissue culture models, in animal studies where the cells together with the selected biomaterials are studied for biocompatibility and cell behavior.

**Table 1. Key criteria for iPSC and iPS-NLC cell line selection.**

Criteria	Methods and markers
Reprogramming ability	Expression of pluripotency markers, <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> tri-lineage differentiation.
Appropriate NLC differentiation	Expression of Brachyury, Foxa2, Shh, Noggin (embryonic) and Sox9, KRT8, KRT18, CD24, Pax1 and FoxF1 (mature).
iPSC demonstrates genetic stability over long term culture	CNV analysis every 4 passages, karyotype analysis every 8 passages. Well known mutations are explored by a dedicated platform.
Transient expression of Noto- an established marker for cells of the early notochordal lineage	Semi-quantitative analysis (IF/IHC) single cell analysis (RNA-Seq)
Permanent expression of Brachyury, established marker of the notochordal lineage	Semi-quantitative analysis (IF/IHC), single cell analysis (RNA-Seq), targeted proteomics.
Expression of markers related to the healthy NP phenotype	IF/IHC and/or Digiwest (e.g. Brachyury, Foxa2, Shh, Noggin (embryonic) and Sox9, KRT8, KRT18, CD24, Pax1, and FoxF1 (mature)).
Production of healthy matrix	Proteoglycan and collagen content (quantitative and qualitative), IF/IHC glycosaminoglycans (GAGs), aggrecan and collagen type II, Digiwest targeted proteomics.
iPS-NLC population purity	Via NC-specific CD markers identified via single cell sequencing
Exert anabolic effects on degenerated NPs	DMMB (GAG), OH-proline (collagen), P2CP ELISA (coll-II), IHC (aggrecan, coll-I and coll-II), activity assays MMPs and ADAMTSs.
Exert anti-catabolic effects on degenerated NP cells	Targeted proteomic analysis by ELISA / Luminex technology (e.g. IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6, IL-8, PGE2, NO).

#### b) Biomaterials

As extracellular matrices are required to provide the unique cell niche for healthy cell differentiation, phenotypic stability and function, instructive and injectable smart biomaterials have been iteratively designed, developed and tested *in vitro*. We started off with five different biomaterials ranging for fully synthetic to semi-synthetic to naturally-derived biomaterials based

on the NC-matrix. Alongside commercially available biomaterials already in clinical practice were taken along to bench-mark the newly developed biomaterials. All the (non-commercial) biomaterials were assessed and optimized for: physicochemical properties (injectability, stability, degradability and degree of crosslinking), cytotoxicity (cellular viability, proliferation and apoptosis), biomechanical properties (gelation point, storage and loss modulus and viscosity), tuneable biomechanical properties. Two lead biomaterials have been selected to proceed with biocompatibility studies in rats by a Partner in the consortium; these results are expected by November 2022.

The pre-selected criteria for the biomaterial selection are outlined below:

1. Maintain cell viability and phenotype
2. Promote iPSC-NLC differentiation and extracellular matrix deposition
3. Hydrogel in a liquid state can be injected via bore needle, forms *in situ* hydrogel
4. Biomechanical properties of biomaterials capable of augmenting degenerate NP to normal
5. Safe delivery of iPSC-NLC to disc
6. Support tissue integration
7. *In vivo* biocompatibility demonstrated in a rat model by a consortium partner.

The characterisation methods were harmonised amongst relevant partners to enable a reliable comparison of the results. The screening methods are briefly outlined here

**Table 2. Screening methods chosen for biomaterials selection**

Test	Description
<b>Assessment of BM-MSCs viability post-injection and injectability (optimisation of cell density)</b>	Cell density: 1,5,10 x10 <sup>6</sup> cells/ml of biomaterial in liquid state Time points: 1 and 24 hours Alginate to be used as control alongside other biomaterials Use 27G needle
<b>Assessment of viability, morphology and phenotype of NCs post-injection (Note this relates to work completed within WP4 and will not be reported here)</b>	Cell density: 4x10 <sup>6</sup> cells/mL of the biomaterial in a liquid state to resemble disc environment Time points: 0, 1 and 2 weeks 27G needle
<b>Swelling capacity</b>	Priority A) Degenerate culture medium Priority B) Healthy/ Non-degenerate culture medium Time points: from 30 minutes to 2 weeks
<b>Gelation kinetics characterisation</b>	A time sweep at 37°C or temperature sweep measurement (depending on the hydrogel type). Commercial hydrogel used as control.
<b>Post-gelation rheological characterisation</b>	Frequency and amplitude sweeps on biomaterials kept in the degenerate medium at 37°C Time points: 2 and 24 hours Commercial hydrogel used as control.

*In vivo* experiments at our location are planned to be performed in the last stage of the project, assessing the efficacy of iPSC-NLC with the best performing biomaterial. To get to the point of this decision, two parallel actions are conducted that will complement each other:

1. IN VITRO: culture experiments are being conducted at the site of one Partner, who will be doing a head-to-head comparison of the two lead biomaterials with iPSCs.
2. EX VIVO: Biomechanical testing is conducted with a partner having specialized infrastructure for testing in a degenerate bovine IVD segments. Methodology has been set up and validated for a commercially available hydrogel which was also used in the *in vitro* testing.

3. IN VIVO: the two lead biomaterials will be tested in a sheep model of disc degeneration by a European Partner together with the optimal cell dose. Preliminary results are expected by December 2022. Based on this work; the best performing biomaterial will be used in the dog model, with the second lead biomaterial as a mitigation plan in case results are not ambiguous.

These three lines of actions, i.e. biomaterial biocompatibility, *in vitro*, *ex vivo* studies and *in vivo* sheep studies, will result into the selection of One lead biomaterials for a proof of concept study for which we apply for the first main aim of this ethical application, i.e. the iPSC-based therapeutic approach. To this end, the dog is selected as a clinically-relevant animal model being a model and a target species within the context of IVD-related low back pain. Beagle dogs will be purchased which as young adults have very mild IVD degeneration (on MRI) and are asymptomatic. Via partial removal of the NP, moderate disc degeneration is consistently induced. In this stage the IVD is still capable of responding to external stimuli provided and efficacy studies can be performed to demonstrate the ability of iPSC-NLCs to engraft and regenerate the NP.

With regard to the cell-free RNA-based therapeutic approach to be developed, similar criteria apply with regard to the key selection criteria of the biologic effect of the delivered nanomedicine at the cellular and tissue level of cadaveric degenerate discs. These are briefly outlined below:

Criteria	Methods and markers
<b>Regenerative effects on degenerate NP cells</b>	Expression of Brachyury, Shh, Sox9, KRT8, KRT18, CD24, Pax1 and FoxF1 to be demonstrated by Semi-quantitative analysis (IF/IHC) and/or RTqPCR
<b>Production of healthy matrix</b>	Proteoglycan and collagen content (quantitative and qualitative), IF/IHC glycosaminoglycans (GAGs), aggrecan and collagen type II, Digiwest targeted proteomics.
<b>Exert anti-catabolic effects on degenerated NP cells</b>	Targeted proteomic analysis by ELISA / Luminex technology (e.g. IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6, IL-8, PGE2, NO).

The RNA-dose to be injected in the dog disc will be estimated based on studies done in cadaveric bovine discs. These are large discs with a matrix composition similar to that of a Beagle dog disc and as such with the aid of GFP-mRNA we will be able to determine the volume and RNA dose to be delivered for transfection of the resident disc cells. Here too, the aforementioned dog studies will be conducted employing dog-specific nucleic acid sequences of the defined RNA instructions.

#### 3.4.2 Onderbouw de gekozen strategie.

In previous studies, it has already been shown that injection of cells alone into a degenerated disc does not result in a successful transplantation of these cells in the disc. This is most likely due to the harsh environment that the degenerated disc poses for the transplanted cells, e.g. no vascularization, hypoxic environment, low pH (Thorpe et al. 2018). Furthermore, cumulative evidence has lead us to the conclusion that the cell type to be used is also very important (Williams et al. 2021). Different cell types have been employed for cell-based therapies for IVD degeneration, rendering the commonly used mesenchymal stem cells as a less potent cell type with minimal viability within the degenerate disc, providing only for temporary pain relief. To increase chances for survival of the iPSC-NLCs as well as to provide an instructive environment for the cells, transplantation of the cells is combined with the injection of a biomaterial. First the biomaterials and the cells will be/have been, both separate and combined, thoroughly tested *in vitro* and *ex vivo*. This ensures the use of only the best cells and biomaterials in the proposed efficacy study. This will result in less experimental animals used for efficacy testing and will facilitate successful treatment.

*References:*

Thorpe, A. A.; Bach, F. C.; Tryfonidou, M. A.; et al. (2018): Leaping the hurdles in developing regenerative treatments for the intervertebral disc from preclinical to clinical, in: JOR Spine, Vol. 1, No. 3, p. e1027.

Williams, R. J.; Tryfonidou, M. A.; Snuggs, J. W.; Le Maitre, C. L. (2021): Cell sources proposed for nucleus pulposus regeneration, in: JOR Spine, Vol. 4, No. 4, p. e1175.

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

Volgnummer	Titel bijlage Beschrijving dierproef
1	Dog model of IVD degeneration
2	Click or tap here to enter text.
3	Click or tap here to enter text.
4	Click or tap here to enter text.
5	Click or tap here to enter text.
6	Click or tap here to enter text.
7	Click or tap here to enter text.
8	Click or tap here to enter text.
9	Click or tap here to enter text.
10	Click or tap here to enter text.



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u in de 'Toelichting op de te gebruiken formulieren voor de aanvraag van een projectvergunning' op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)
- Of neem telefonisch contact op (0900-2800028).

#### 1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10800	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Universiteit Utrecht	
1.3	Vul het volgnummer en de titel van de dierproef in.	Volgnummer	Titel dierproef
	<i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.3 van het format Projectvoorstel.</i>	1	Dog model of IVD degeneration

#### 2 Beschrijving dierproeven

##### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

At the initiation of the *in vivo* study, all experimental dogs may undergo a general clinical and orthopaedic examination and will be subjected to MRI analysis to determine the grade of IVD degeneration. Within the selected age range (described below), the majority of the disc has a Pfirrmann grade 2-3. Six weeks before the start of treatment, in up to 5 lumbar IVDs per dog, moderate IVD degeneration will be induced by partial nucleus pulposus (NP) removal. This procedure will induce a higher grade of IVD degeneration on MRI, leading to a score difference of at least 1 (Bach et al. 2018). At this grade of degeneration (Pfirrmann 3-4) the IVDs are still capable of responding to external stimuli and as such retain some of their regenerative capacity; the target of both therapies. To confirm that the procedure creates more degenerated discs, an MRI will be performed prior to initiation of the intended injectable therapy. Recently, a modified Pfirrmann Classifier for canine MRI data was developed which included also transitional grades (1.3, 1.7, 2.3, 2.7, 3.3, 3.7, 4.3, 4.7) next to the main grades (i.e. 1, 2, 3, 4, and 5) (Niemeyer et al. 2020), aiming at expressing uncertainties and tendencies of discs that do not fit exactly the algorithm described in the original classification. The Pfirrmann Classifier is ready for use for this animal experiment.

At T=0 (start of the treatment), the treatment-condition will be injected into the IVDs on the side contralateral to the annular puncture. The surgeon administering the injection is blinded to the treatment.

All injections will be done under fluoroscopic guidance to confirm correct position of the needle tip prior to injection.

At T=6 months, the in vivo experiment will be terminated and animals will be euthanized, samples will be collected and analysed. This time point has been selected to have a relative “long-term” outcome compared to follow ups reported in literature in other large animals studies (i.e. often 3 months follow up or even shorter). Hereby we will be able to demonstrate that the effect is relatively long lasting.

### **Read-out parameters:**

#### In vivo

Potential regenerative effects will be studied by obtaining conventional T2-weighted images and quantitative MR imaging in a longitudinal manner. At all timepoints, i.e. at T=-6 weeks (baseline, at induction of disc degeneration), at T=0 (time of treatment) and T=6 months (follow-up after treatment), the following read out parameters will be determined:

- Grading of mid-sagittal slices of T2-weighted images (Bergknut et al. 2011) to determine degree of IVD degeneration
- Disc height index (DHI) will be calculated on T2W images for each IVD (Bach et al. 2018).
- For analysis of quantitative MR images, T2 values will be computed by calculating the mean signal intensity in each range of interest containing the nucleus pulposus.

Furthermore, all imaging modalities are examined by a certified veterinary radiologist for other pathologies, including modic changes of the vertebral bone. The radiologist is blinded to the treatment.

In addition, for the iPSC-based therapeutic approach, blood samples are collected longitudinally to determine the presence/absence of anti-human antibodies generated against the human iPSC-NLCs. Considering the dynamics of an innate immune response (i.e. the detection of IgM at early phases and IgG at later phases), base line measurements (prior to surgery) will be collected, as well as blood samples between 2 weeks and 6 months post injection, with an approximate interval of 4 weeks depending on their detection.

#### Post-mortem

After euthanasia, computed tomography will be performed to evaluate the presence of extradiscal bone formation, one of the possible complications of intradiscal treatment with bioactive factors and/or cells.

Within 2 hours after euthanasia, and once tissues have been collected from regional lymph nodes, liver, spleen, kidney, heart and testis in the male animals to evaluate possible innate immune responses, the vertebral column (T12-S1) will be harvested and processed for analysis. The following analyses will be done:

- *Ex vivo* validation of biomechanical properties of the treated degenerated canine discs will be performed by a portable spine tester. The lumbar spines are utilized with flexibility-test (Range of Motion, Neutral Zone, Stiffness, disc height) and compared to control spine motion segments (i.e. non-degenerated and degenerated).
- Thereafter, the vertebral column will be further divided in separate spinal units ( $\frac{1}{2}$  vertebra – endplate – IVD – endplate –  $\frac{1}{2}$  vertebra). Each unit will be transected sagittally into two identical parts. One part will be used for biochemical and biomolecular analyses of the NP and AF separately in order to determine transcriptional regulation by the treatment and the regenerative response in terms of matrix remodelling. Also, cytokine levels in the tissue digests will be determined on this tissue level. The other part, after macroscopic evaluation (Thompson score), will be fixed, decalcified, and subjected to histopathological evaluation (Boos scoring and (immuno)histochemical stainings) of midsagittal region of the IVD including the NP, AF, cartilaginous EP, and subchondral bone.

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

The animals used in the study will undergo the following treatments:

- Clinical and orthopedic examination: is performed 4 times during the study and more often if needed to determine the welfare status of the animals (15 minutes).
- Blood sampling: is performed at max 12 times during the study (5 minutes) to allow for analysis of possible immune response to the xenogeneic treatment.
- MRI: will be performed max 3 times under general anaesthesia (45 minutes). MRI is performed in order to detect degenerative changes and the regenerative response of the treated IVDs in a longitudinal manner.
- Nucleotomy is done under general anesthesia through a surgical approach in order to induce disc degeneration. This procedure is conducted once at the initiation of the study. The procedure takes approximately 1.5 to 2 hours per animal, including recovery.
- All strategies employed within this project rely on the employment of minimally invasive injectable treatments guided by fluoroscopy to ensure correct placement of the needle. The injection of the treatment-condition is administered once under general anaesthesia. The procedure takes approximately 1.5 to 2 hours per animal, including recovery.
- Euthanasia at termination of the experiment (5 minutes)

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

Considering that the iPS-NLC performance is the most essential one, each experimental round will be employing the combination of these cells with one of the selected biomaterials.

Each experimental round will include at least the following treatment-conditions for the iPSC-based therapeutic approach to be tested:

- 1) Mild degenerate control: no degeneration is induced, no treatment
- 2) Moderate degenerate control: induced degeneration, no treatment
- 3) Moderate degenerate treatment: a combination of the iPS-NLCs + biomaterial
- 4) Moderate degenerate biomaterial: the biomaterial alone

As is known from previous studies, cells without biomaterial will not survive the harsh environment of the degenerated IVD. Therefore, the cells alone will not be injected into the discs as they will not engraft. In the studies that will involve exploring the efficacy of the RNA-based approach, testing conditions will be adjusted accordingly.

Power analysis is performed with the aid of the freely available software G\*power 3.1.9.2. Power analysis is performed on the primary read out parameter: glycosaminoglycan (GAG) content/mg disc tissue. Based on a statistical power of 85% and an alpha error level of confidence corrected for the number of relevant comparisons between groups set at 0.008. In previous study, in the canine model of IVD degeneration an effect size of 1 was obtained on the primary parameter after NCM treatment. Since the tested biomaterials will include NCM, we assume a similar effect size for the current studies.

Based on these parameters, a total sample size of 21 is calculated to conduct three separate and independent studies, two studies at max demonstrating efficacy of iPS-NLCs delivered with the best two performing biomaterials of the consortium (please note that the second best lead biomaterial will only be studied if the results of the 1<sup>st</sup> lead biomaterial are ambiguous), a third study showing proof of principle of a set of RNA-instructions. The project does not intend to directly compare efficacy between iPS- and RNA-based treatment as such a comparison is irrelevant and targets different aspects of disc regeneration.

In each study, in order to minimize the number of animals employed per study and to minimize the dog effect as random effect, we employ a block design of the study. Hence, in this specific example, six beagle dogs would be assigned to address the specific aims by means of longitudinal quantitative MR imaging and post-mortem biomolecular, biochemical, and histological analysis. Given that we cannot exclude a drop out of one of the treatment groups, we will include one extra dog in the study to ensure n=6 per treatment group, amounting to a total of 7 dogs per study. As such, a total of 3x7 dogs are estimated to be needed.

#### Example of groups within each dog – block design

- A -Healthy controls
- B -Degenerate control
- C - iPS-NLC + biomaterial
- D - Biomaterial alone



✗ Nucleotomy at alternate levels  
In this particular example L7-S1 is omitted as it may behave biomechanically differently

**Example of a study design.** Within each lumbar dog spine in the particular study, 4 treatment conditions are needed to have the appropriate controls for the treatment being tested (i.e. iPS-NLC+biomaterial). Each dog receives all 4 treatment conditions, they are randomized within each dog with regard to the IVD segment being injected.

## B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, levensstadia, geschatte aantallen per levensstadium, geslacht, genetische wijzigingen en, indien van belang voor het behalen van de doelstelling, de te gebruiken stam.

Volgnr.	Diersoort	Herkomst	Levensstadium	Aantal	Geslacht	Genetisch gewijzigd	Stam
1	Dog	Harlan or Marshal laboratories (certified breeder)	1-3 years	21	Male and female	No	Beagle

Onderbouw de bovengenoemde keuzes.

Diersoort	The canine animal model is considered to be a suitable model to study the process of IVD degeneration: like humans, dogs suffer from spontaneous IVD degeneration, and the degenerative process involves similar clinical, macroscopic, histopathological, and biochemical changes as humans (Bergknut et al. 2012). Canine patients with back pain and neurologic deficits due to IVD disease are common in the veterinary clinical practise. Hence the dog serves as a preclinical model for translation towards the “first in man” studies, while it serves also the veterinary patient.
Herkomst	Only a limited number of laboratories has dogs available in the mentioned age range. If there is a possibility of purchasing the Beagle dogs from a European source, this will be preferred as it is minimizes travelling discomfort for the animals.
Levensstadia	This age range results into a cohort of animals with early degenerated IVDs with a Pfirrmann score of 2-3 (Bach et al. 2018).
Aantal	Taking into consideration all the objectives described in this project we estimate to use <ul style="list-style-type: none"> <li>• 14 dogs for the iPS-NLC. Within the project it is our intention to eventually select out of the battery of biomaterials being developed, a maximum of two promising candidates which will be studied in combination with the iPS cell lines</li> </ul>

	<p>rendering the best results in iPS-NLC differentiation. Considering practical limitations in terms of performing such experiments with an extensive series of in vivo and post-mortem read out parameters, we anticipate to be able to handle groups of up to 7 dogs per experimental round.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 7 dogs for the RNA-based approach. We anticipate that the latest early in year 5 of the application period we will be ready to test the developed nanomedicine in the dog model.</li> </ul>
Geslacht	Regarding the sex of animals: There is very limited evidence with regard to the role of gender in experimental animals and its possible effects on IVD degeneration primarily because this has not been consistently studied in the literature. In chondrodystrophic dogs, like the experimental Beagle, there is no male/female predisposition for the development of disc disease in canine patients (Smolders et al 2013), hormonal effects are considered irrelevant to the model. Even more so, there is no gender predilection also for the human population of patients with IVD disease (Siemionow et al. 2011). In our studies we aim at having a sex ratio of 1:1 in the study cohort in order to have both sexes represented in the study.
Genetisch gewijzigd	Not applicable.
Stam	<p>Beagle dogs are categorized as a chondrodystrophic dog breed . These breeds are well known to develop spontaneously IVD degeneration at relatively young age. Dogs suffering from IVD degeneration also develop clinical signs as a results of the IDD (Bergknut et al. 2011). These breeds are therefore considered as a suitable model for IDD in humans and there is a lot of historical data on the dog IDD model.</p> <p><i>References:</i>  Bach, F. C.; Tellegen, A. R.; Beukers, M.; et al. (2018): Biologic canine and human intervertebral disc repair by notochordal cell-derived matrix: From bench towards bedside, in: Oncotarget, Vol. 9, No. 41, pp. 26507–26526.  Bergknut, N.; Auriemma, E.; Wijsman, S.; et al. (2011): Evaluation of intervertebral disk degeneration in chondrodystrophic and nonchondrodystrophic dogs by use of Pfirrmann grading of images obtained with low-field magnetic resonance imaging, in: American Journal of Veterinary Research, Vol. 72, No. 7, pp. 893–898.  Bergknut, N.; Rutges, J. P. H. J.; Kranenburg, H. J. C.; et al. (2012): The dog as an animal model for intervertebral disc degeneration?, in: Spine, Vol. 37, No. 5, pp. 351–358.</p>

### C. Huisvesting en verzorging

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

Já

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

We follow the regulations described in bijlage III of 2010/63/EU. Solitary housing is only indicated immediately after the surgery to prevent from possible wound healing complications. Depending on the recovery on the 1st day after surgery and how comfortable they are with the skin sutures this may have to be extended to a maximum of 7 days.

### D. Pijn en welzijnsaantasting

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

Nee

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Click or tap here to enter text.

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

Pain management is done with proper intra-operative pain medication administered with continuous intravenous infusion based on protocols set up in collaboration of certified anesthesiologist. Pain medication is only needed in the direct post-operative period of maximal 7 days. Initial pain medication will consist on the use of NSAIDs. If necessary those will be combined with opioids. Pain management is evaluated on a daily basis in the direct post-operative period based on performance and wellbeing of the animals. Occasionally wound healing may be delayed or wounds may become superficially infected; in that case the dog may have to be housed solitary for a short period of time. On the long term, i.e. after the first 7 days upon induction of disc degeneration, and the 7 days immediately after intra-discal injection of the treatment, animals do not experience discomfort nor do they exhibit pain that interferes with their welfare and daily life activities. Therefore we expect that pain medication will not be necessary. This has to do with the fact that the disc degeneration induced is moderate and does not translate to clinically-perceived back pain based on behavioral and clinical assessment. We have observed this in all previous studies conducted with the same animal model.

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Clinical signs related to the animal model may include paraparesis, paralysis, unilateral lameness of the hind limb, proprioceptive disorders, urinary incontinence  
In all previous studies performed by our group, employing similar techniques and treatments, we have not observed dogs suffering from these clinical signs.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

These neurologic signs are related to herniation of the degenerated intervertebral disc and can vary dependent on the location of the herniation. Other possible reasons for unexpected pain, is discospondylitis caused by local of infection of the treated disc.

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

In case of the neurologic signs, other than acute paralysis, treatment is initiated primarily consisting of anti-inflammatory medication and if needed decompressive surgery of the allocated IVDs. In the latter, the decompressed IVDs will be excluded from the study, while the other IVDs and the allocated treatment group can be followed up until termination of the experiment.

To minimize the possible risks of discospondylitis, strict aseptic procedure are used during surgery and during intra-discal injections, the materials injected are sterile and samples are being collected of those materials to also perform additional bacteriological assessment, in the event problems do occur. Discospondylitis can be treated with oral antibiotics and pain medication.

## **E. Humane eindpunten**

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

Nee > Ga verder met vraag F.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

If general clinical signs are observed indicating severe discomfort animals are euthanized. Humane endpoints include: acute paralysis. In case of the other neurologic signs, they are considered a human

endpoint when the neurologic status of the dog is not improving after initiation of proper treatment (as described under section “D”. Neurologic examinations is in that case conducted according to the modified Griffiths scale in which zero is defined as a normal neurologic examination and five is defined as a nonambulatory tetraplegia without deep nociception (Griffiths 1982; Wheeler & Sharp 2005). A grade “five” in this scale is definitely considered a humane endpoint. In the working protocol we will include a detailed decision tree on the possible scenarios that may result into deciding that the humane endpoint is applicable for the lower grades, where we include severity of pain and severity of the neurologic grade and the cause of this complication based on diagnostic imaging, for example MRI of the lumbar spine. For situations where the decision tree may not provide for a clear cut decision we will contact the Local Welfare Body and discuss to reach a decision.

Griffiths I. Spinal disease in the dog. In Pract. 1982 Mar;4(2):44-52. doi: 10.1136/inpract.4.2.44.

Wheeler SJ, Sharp NJ. Patient examination Wheeler SJ, Sharp NJ. Small Animal Spinal Disorders, Diagnosis and Surgery. 2nd ed. Philadelphia, PA: Elsevier-Mosby; 2005:32.

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

The likely incidence is estimated at 2% based on clinical cases of spinal surgery. We already have performed similar experiments in the past with at least n=28 dogs and have not experienced any incidents that required the implementation of humane endpoints.

#### F. Classificatie van ongerief

Benoem de experiment gebonden factoren die bijdragen aan het ongerief en geef voor elk van deze factoren aan hoe het ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig'. Geef per diersoort en behandelgroep het cumulatieve ongerief aan in percentages van het totale aantal dieren.

All dogs (100%) will undergo the following treatments during the experiment:

- Clinical and orthopedic examination: mild procedure.
- Blood sampling: mild procedure
- MRI: mild procedure
- Nucleotomy : moderate procedure
- Injection of the treatment conditions: moderate procedure
- Euthanasia : mild procedure

Cumulative score: moderate (matig)

#### G. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging	These studies cannot be replaced with simple in vitro models or explant tissue cultures given that we need to translate the treatment strategies not only in a tissue-context but also a disease dependent-context where multiple signalling pathways are deranged. We address the challenges of this collaborative project by employing as a final step of translation the unique spontaneous diseased canine model, the use of cutting edge biomolecular techniques and strong implementation of the 3Rs.
Vermindering	Up to 5 IVDs can be treated within in one experimental animal, indicating that up to 5 treatment groups can be included in a randomized block design study. The research group plans the experiment in an efficient way so that, were possible, experiments can be combined in order to minimize the number of animals. In the aforementioned example, we depict a study design where 4 treatment conditions are tested. We strive to test a minimum of 4 different treatment conditions in each dog

	study, and if needed combine studies together to achieve this minimum of 4 with a maximum of 5 IVD segments per dog.
Verfijning	Supervision of surgeries and postoperative care, anaesthesia, postoperative analgesia, and imaging are supervised by veterinary specialists in surgery, anaesthesia, and diagnostic imaging. Post mortem analysis is performed by state-of-the-art and up-and-running techniques of histology, biomolecular, and biochemical analysis.

Zijn er nadelige milieueffecten te verwachten?

Nee

Ja > Benoem de te verwachten milieueffecten en geef aan welke maatregelen zijn genomen om deze tot een minimum te beperken.

Click or tap here to enter text.

### H. Hergebruik

Worden er dieren ingezet die eerder in een andere dierproef zijn gebruikt?

Nee > ga verder met vraag I.

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

Click or tap here to enter text.

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

Nee

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

Click or tap here to enter text.

### I. Herhaling

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

Not applicable

### J. Plaats waar de dierproef wordt uitgevoerd

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

Nee > Ga verder met vraag K.

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

Click or tap here to enter text.

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

Click or tap here to enter text.

## 3 Einde Experiment

### K. Bestemming van de dieren bij einde experiment

Worden de dieren gedood?

Nee > Beschrijf de bestemming van de dieren.

Click or tap here to enter text.

Ja > Geef aan waarom de dieren worden gedood.

It is necessary to sacrifice the dogs at the end of the experiment, to gain insight in the biomechanical, biomolecular, biochemical and histopathological processes in the intervertebral disc. In addition the ability of the iPS-NLCs/RNA-based therapy to inhibit the catabolic environment will be demonstrated at tissue level. These analyses can only be performed post mortem.

Indien dieren worden gedood, wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van Richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Click or tap here to enter text.

Ja > Betreft het een dodingsmethode die alleen onder specifieke voorwaarden mag worden toegepast?

Nee> Beschrijf de dodingsmethode

At T=6 months after treatment, the dogs will be brought under general anesthesia, after which an overdose will be administered to achieve death.

Ja > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Click or tap here to enter text.

Indien dieren worden gedood, maar niet in het kader van de proef, geef aan of herplaatsing is overwogen en waarom hiervan is afgezien.

Click or tap here to enter text.

**A. Algemene gegevens over de procedure**

1. Aanvraagnummer : AVD10800202216538
2. Titel van het project : Notochordal cell-based therapies for disc degeneration
3. Titel van de NTS : Het verjongen van de rug: een remedie tegen rugpijn

## 4. Type aanvraag:

- nieuwe aanvraag projectvergunning  
 wijziging van vergunning met nummer :

## 5. Contactgegevens DEC

- Naam DEC : DEC Utrecht  
Telefoonnummer contactpersoon : 06-31118069  
Emailadres contactpersoon : dec-utrecht@umcutrecht.nl

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

- ontvangen door DEC: 28-10-2022  
 aanvraag compleet:  
 in vergadering besproken: 02-11-2022  
 anderszins behandeld:  
 termijnonderbreking(en) van / tot : 07-11-2022 / 08-11-2022  
 besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:  
 aanpassing aanvraag:  
 advies aan CCD: 24-11-2022

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

## 8. Eventueel horen van aanvrager

- Datum: 02-11-2022
- Plaats: Utrecht
- Aantal aanwezige DEC-leden: 5
- Aanwezige (namens) aanvrager: Verantwoordelijk onderzoeker
- Gestelde vragen en verstrekte antwoorden: De DEC heeft de onderzoekers o.a. gehoord over de betekenis van proof of concept, het doel, de belanghebbenden, de verwachte pijn en benodigde medicatie na behandeling en het kwantificeren van de criteria bij de HEP.
- Hieruit zijn onderstaande vragen, zoals vermeld bij punt A9, voortgekomen, die schriftelijk aan de onderzoekers werden voorgelegd.
- Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag.

## 9. Correspondentie met de aanvrager

- Datum vragen: 07-11-2022

- Datum antwoord: 08-11-2022
- Strekking gestelde vragen en antwoorden:

#### *Projectvoorstel*

3.1 Achtergrond: Het doel is meerdere keren verspreid in de aanvraag beschreven, maar volgens de DEC zou de tekst van 3.1 wat logischer kunnen leiden naar het doel zoals vermeld in 3.2. Wilt u dit hier verduidelijken?

*Dit heb ik nu verduidelijkt door de achtergrond te linken met de twee hoofddoelen van het project.*

3.1 Achtergrond: U geeft aan dat de aanvraag een proof of concept betreft. Kunt u aangeven wat u hier mee bedoelt (o.a. qua doorontwikkeling)?

*Ik heb hier uitleg toegevoegd in sectie 3.2 met een voorbeeld van wat hiermee bedoeld wordt.*

3.4 Strategie: In figuur 2 vermeld u het schaap. De DEC vindt dit verwarrend aangezien het schaap geen onderdeel van deze projectvergunningaanvraag uitmaakt. U heeft dit toegelicht aan de DEC. Het is voldoende als in de tekst kort wordt aangegeven dat elders (geen onderdeel van deze aanvraag) testen in schapen worden of al zijn gedaan.

*De laatste zin is nu verwijderd en in de figuur zelf wordt nu aangegeven welke deel onder deze aanvraag valt.*

#### *Bijlage 1*

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: De dieren worden na afloop van het experiment gedood. Wilt u bij het overzicht van de behandelingen bij 'post-mortem' ook de euthanasie vermelden?

*Euthanasie wordt nu vermeld.*

B. De dieren: Deze aanvraag betreft 21 honden. Is er een kans op een aanvraag (amendement) voor extra honden voor dit onderzoek?

*Een kans op een aanvraag voor extra dieren voor dit onderzoek in de vorm van een amendement kan ik niet geheel uitsluiten over de looptijd van 5 jaar en in de context van de projecten die het aangaat. We zijn zorgvuldig in het voorafgaand werk en het bewijs dat we verzamelen voordat we een Go moment bereiken voor een proefdierstudie in het beschreven model en ervaring leert dat deze trajecten meerdere jaren duren.*

*Aangezien de cel-gebaseerd strategie al veel verder in zijn ontwikkeling is, anticiperen we een maximum van twee studies waarbij ofwel een tweede biomateriaal getest zal worden of wel zal een verbetering plaatsvinden op het cel-gedeelte van de behandeling door voortschrijdend inzicht uit het fundamenteel onderzoek dat parallel hieraan plaats vindt. Voor het cel-vrij nanomedicijn is onze schatting dat we pas in jaar 4/5 van deze aanvraag zo ver zijn om het te testen in het diermodel. Na schatting zal dus een verzoek voor "extra honden" voor dit onderzoek in de vorm van een nieuwe projectaanvraag ingediend worden.*

D. Pijn en welzijnsaantasting: De DEC vraagt zich af of er echt helemaal geen pijn te verwachten is bij de hond na de behandeling, en of er niet toch onderhoudsmedicatie nodig is? Mogelijk niet in de acute fase maar dan wel na enkele maanden in de chronische fase. De tussenwervelschijven worden tenslotte aangetast en niet vervangen. Wilt u dit, mede op basis

van uw eerdere ervaring, beargumenteren en het benoemen indien u geen pijn bij de honden verwacht, geen pijnstilling geeft en dagelijks monitort op gedrag?

*Pijn ten gevolge van de ingreep (dat wil zeggen het induceren van tussenwervelschijf degeneratie en in tweede instantie door de benadering waarmee we de intra-discole injectie geven) wordt verwacht de eerste dagen direct erna. De tussenwervelschijf degeneratie die we induceren is mild en progressief wordt hij matig tot ernstig op weefsel niveau in een verloop van 6 maanden die zo'n studie bestrijkt. In de weken na de inductie van tussenwervelschijf degeneratie ervaren de dieren geen pijn waarneembaar op gedragsindicaties en klinisch onderzoek van de wervelkolom. Dit hebben we zo ervaren in de studies hieraan voorafgaand met alle dieren, waarbij in gedrag- en klinische parameters (zoals gewicht) en in klinisch onderzoek van de rug geen indicaties waren voor onderhoudsmedicatie. Dit wordt nu kort toegelicht in de aanvraag.*

E. Humane eindpunten: U heeft aangegeven t.a.v. de neurologische verschijnselen met een beslisboom te werken. Kunt u dit bij de HEP kwantificeren en specifiek de criteria benoemen? En vermelden dat dit ook in het werkprotocol uitgewerkt wordt?

*Er wordt nu duidelijk gemaakt dat bij een graad V van de Griffiths score, welke ook gebruikt wordt om hondenpatiënten te beoordelen tijdens een behandeltraject, het HEP bereikt wordt. Voor alle andere situaties zal er in het werkprotocol een gedetailleerd beslisboom opgenomen worden waarbij we uitleggen hoe we hierin pijn en neurologisch aanval in meenemen en beslissing nemen in de context van klinisch onderzoek die aangevuld wordt door aanvullende diagnostiek van de rug vaak door middel van imaging (bv MRI). In gevallen waar het beslisboom toch niet eenduidig zal blijken zullen we met het IvD contact opnemen en hierover overleggen.*

F. Classificatie van ongerief: De DEC zou graag voor de volledigheid ook hier de euthanasie vermeld zien omdat doden licht ongerief veroorzaakt. Wilt u dit toevoegen?

*Deze is toegevoegd in de betreffende sectie.*

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

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

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

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

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

1. Degeneratie van de tussenwervelschijf, de intervertebrale disc (IVD) veroorzaakt zowel bij mensen als bij chondrodystrofische honden uiteindelijk chronische lage rugpijn en functieuitval waar tot op heden, behalve pijnmedicatie, fysiotherapie of ingrijpende symptoomonderdrukkende spinale chirurgie, geen behandeling voor is. De behoefte aan een behandeling, die naast pijnverlichting ook de degeneratie kan stoppen of zelfs omkeren, is daarom zeer groot. In de

dierenpraktijk komen, net als in de humane praktijk, vaak patiënten met rugpijn en neurologische aandoeningen als gevolg van IVD-degeneratie en ook hier is er zeker de behoefte aan een effectieve behandeling. Dit project is een vervolg op eerder vergunde aanvragen waaronder AVD10800202115543 *A novel bio-lubricating agent for relief of osteoarthritis symptoms* en AVD10800202114750 *Proof-of-concept: A novel biomimetic artificial intervertebral disc (BioAID)*.

In deze studie wordt de werking van twee therapeutische benaderingen voor de behandeling van versleten tussenwervelschijven onderzocht 1) de notochordale cellen (NC) en de op iPSC gebaseerde benadering waarbij de pluripotente stamcel gedifferentieerd kan worden tot NC-achtige cellen en 2) de celvrije op RNA gebaseerde benadering. Het gaat in eerste instantie om een *in vitro* voortraject en vervolgens om *proof of concept* testen in de hond, waarbij nadat de dieren gedood zijn, *ex vivo* onderzoek wordt gedaan naar het effect van de interventie. Als proefdier is voor een chondrodystrofisch hondenras, de Beagle, gekozen omdat dit ras op relatief jonge leeftijd spontaan IVD-degeneratie kan ontwikkelen, vergelijkbaar met de humane situatie. De hond dient in deze studie als een preklinisch model voor de vertaling naar de "first in man" studies, waarbij de hond zowel proef- als doeldier is. Anderhalve maand voor de start van de behandeling zal bij de proefdieren een matige IVD-degeneratie worden geïnduceerd door gedeeltelijke verwijdering van de nucleus pulposus (NP). Vervolgens wordt de therapeutische stof in de tussenwervelschijf geïnjecteerd, waarna het dier zes maanden wordt gevolgd en vervolgens wordt gedood voor histologisch onderzoek.

De aanvraag, waarin parallel twee benaderingen voor behandeling van degeneratie van de tussenwervelschijf worden onderzocht, die beide aansluiten bij de hoofddoelstelling, komt het meest overeen met voorbeeld 3A uit de Handreiking "Invulling Definitie Project". Het is duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De DEC is ervan overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over voortzetting van het project en dat er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

2. Voor zover de DEC bekend, is er geen mogelijk tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de dierexperimenten in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën, te weten fundamenteel en toegepast onderzoek, sluiten aan bij de hoofddoelstellingen.

#### *Belangen en waarden*

4. Het directe doel van het project is in een klinisch relevant diermodel *proof-of-concept* aantonen van twee behandelingen voor IVD-degeneratie, namelijk de op iPSC gebaseerde therapie en de celvrije op RNA gebaseerde therapeutische strategie, voortbouwend op het regeneratieve

potentieel van notochordale cellen. Het uiteindelijke doel van het project is te komen tot een werkzame behandelingsmethode voor mensen en honden die lijden aan degeneratie van de tussenwervelschijf. Door deze behandeling kan de kwaliteit van leven van de patiënt worden verhoogd. De DEC is van mening dat er een duidelijke relatie is tussen het directe en het uiteindelijke doel, en dat het doel gerechtvaardigd is in de context van de diergeneeskundige zorg en de behoeften vanuit de humane (orthopedische) gezondheidszorg voor een verbetering van de therapie van chronische lage rugpijn bij de mens.

5. De belangrijkste belanghebbenden in dit onderzoeksproject zijn: de proefdieren, de mensen en dieren met lage rugpijn (als gevolg van IVD-degeneratie), onderzoekers, medici van (dieren)klinieken en de industrie. De proefdieren, de honden, hebben er belang bij gevrijwaard te blijven van de experimenten en een vroegtijdige dood. De hond als doeldier heeft, net als de humane patiënt met lage rugpijn, juist een groot belang bij de ontwikkeling van een adequate therapie omdat een afdoende behandeling tot op heden ontbreekt. Ook de artsen in de gezondheidszorg hebben een groot belang bij het kunnen bieden van een therapie met een langdurig effect waarmee de chronische pijn van hun patiënt, verholpen kan worden. Voor de individuele onderzoeker en samenwerkingspartners kan het van belang zijn om aansprekende onderzoeksresultaten te boeken, maar in de uiteindelijke afweging kent de DEC daar weinig gewicht aan toe. Voor de (farmaceutische) industrie in het algemeen kan het commerciële aantrekkelijk zijn om te investeren in het doorontwikkelen van een werkzame therapie. In deze fase zijn er echter geen bedrijven direct betrokken bij het onderzoek.
6. De aanvrager geeft aan niet te verwachten dat er zich nadelige effecten op het milieu voordoen als gevolg van dit onderzoek. De DEC ziet, kijkend naar de aard van het onderzoek, geen aanleiding om aan te nemen dat zich toch nadelige effecten zullen voordoen.

#### *Proefopzet en haalbaarheid*

7. De kennis en kunde, mede door jarenlange ervaring met vergelijkbare studies, van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd en dragen eraan bij dat de doelstellingen behaald kunnen worden, dat aan de 3V-beginselen voldaan kan worden en dat voorkomen kan worden dat mens, dier en milieu negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven.
8. Het project is goed opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en de *in vivo* en post-mortem uitkomstparameters sluiten logisch en helder aan bij de aangegeven doelstellingen. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de fundamentele en toegepaste doelstelling (*proof of concept*) binnen het kader van het project.

#### *Welzijn dieren*

9. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
- Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
  - Niet-menselijke primaten (10e)
  - Dieren in/uit het wild (10f)
  - Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I EU richtlijn)
  - Zwerfdieren (10h)
  - Hergebruik (1e lid 2)
  - Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
  - Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
  - Dodingsmethode niet volgens bijlage IV EU richtlijn (13c lid 3)
10. De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de EU richtlijn. Solitaire huisvesting van de dieren kan, ook naar de mening van de DEC, na de operatie noodzakelijk zijn om complicaties (zoals infecties) ten aanzien van de wondgenezing te voorkomen en zal tot maximaal zeven dagen duren.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Ondanks dat er voor alle dieren sprake is van meerdere factoren die bijdragen aan het ongerief, namelijk de klinische en orthopedische onderzoeken, de bloedafnames, de MRI's, de eventuele korte solitaire huisvesting (zie C10), en onder algehele anesthesie de nucleotomie, de injectie en de uiteindelijke euthanasie, is de DEC van mening dat er in totaliteit geen sprake is van ernstig maar van matig ongerief.
- De onderzoeker heeft aangegeven dat uit eerder opgedane ervaring met hetzelfde model in de hond blijkt dat de dieren na een postoperatieve herstelperiode waarin pijnbestrijding wordt gegeven, geen pijn zullen hebben en er in die studie geen indicatie was voor onderhoudsmedicatie. De DEC heeft gediscussieerd over de mogelijke pijnervaring na het aantasten van de tussenwervelschijf en de benodigde medicatie. De onderzoeker heeft voldoende toegelicht dat de tussenwervelschijf degeneratie die men induceert mild is en er geen pijn te verwachten is. Desondanks kunnen er neurologische symptomen (zoals paraparese, eenzijdige kreupelheid van de achterpoot of urine-incontinentie) optreden of discospondylitis ontstaan. Daarom zal het gedrag en welzijn van de honden dagelijks gemonitord worden en bij afwijkend gedrag zal pijnstilling toegediend worden.
12. De integriteit van de dieren wordt met name fysiek aangetast door het, onder algehele anesthesie, operatief induceren van IVD-degeneratie, injecteren en vroegtijdig doden ten behoeve van de studie. Het induceren van een defect dat tot degeneratie van de tussenwervelschijf leidt kan op den duur leiden tot een vermindering van de zelfredzaamheid en tot verandering in gedrag (door fysieke beperkingen).
13. De humane eindpunten, acute verlamming of andere onbehandelbare neurologische symptomen (graad V van de ook in de veterinaire praktijk gehanteerde Griffiths score),

zijn in de bijlage dierproeven goed gedefinieerd en het percentage dieren (2%, op basis van klinische gevallen bij spinale chirurgie) dat naar verwachting een humaan eindpunt bereikt is goed ingeschat. De kans op het bereiken van een humaan eindpunt is derhalve bij een totaal aantal van 21 dieren klein.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn en dat er eerst uitgebreid *ex vivo* onderzoek plaatsvindt met overgebleven organen van dieren uit eigen of andere studies. Hierdoor zijn pas in een later stadium proefdieren nodig.
15. Het aantal te gebruiken dieren, 14 honden voor de iPS-NLC en 7 honden voor de op RNA gebaseerde aanpak, is realistisch ingeschat en er is een heldere strategie om ervoor te zorgen dat tijdens het project met het kleinst mogelijke aantal dieren wordt gewerkt waarmee nog een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Binnen één proefdier kunnen meerdere (maximaal vijf) lumbale IVD's worden behandeld. Indien mogelijk worden de experimenten gecombineerd zodat het aantal dieren tot een minimum beperkt blijft.
16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project is zodanig opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Anesthesie, postoperatieve pijnbestrijding en *imaging* vinden plaats onder begeleiding van veterinaire specialisten op het gebied van chirurgie, anesthesie en diagnostische beeldvorming.
17. Er is geen sprake van wettelijk vereist onderzoek.

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

18. Dieren van beide geslachten zullen in gelijke mate worden ingezet.
19. De dieren worden in het kader van het project gedood voor de (pathohistologische) controle op extradisciale botvorming, de verzameling van weefsels waaronder lymfeklieren, lever, hart en nieren op eventuele pathologische afwijkingen en tot slot voor de algehele analyse van de wervelkolom (T12-S1) waardoor op weefselniveau inzicht verkregen kan worden in de processen in de tussenwervelschijf en de werking van de iPS-NLCs en de op RNA gebaseerde therapie. De dieren worden na zes maanden onder algehele narcose op een passende wijze, in overeenstemming met bijlage IV van de EU richtlijn, gedood.
20. De vraag over hergebruik is niet van toepassing omdat de dieren gedood worden in het kader van het experiment. De organen en weefsels van de proefdieren kunnen na de experimenten wel door meerdere onderzoeksgroepen gebruikt worden.

NTS

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

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

1. De morele vraag die de DEC dient te beantwoorden is of het belang van de doelstelling van dit onderzoek, namelijk het in een klinisch relevant diermodel aantonen van *proof-of-concept* met betrekking tot twee therapeutische interventies voor IVD-degeneratie, opweegt tegen de onvermijdelijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de gebruikte proefdieren.
2. Er vindt een aanzienlijke aantasting van welzijn en integriteit van de proefdieren plaats, met matig ongerief. Indien de hierboven genoemde doelstelling behaald wordt, dan zal dit project er toe bijdragen dat er wetenschappelijk gezien meer inzicht wordt verkregen in de verschillende aspecten van toepassing van iPS-cellen en op daarvan afgeleide RNA-gebaseerde benaderingen voor regeneratie van weefsels. Vanuit sociaal en medisch gezichtspunt is vooral van belang dat dit onderzoek uitzicht biedt op een nieuwe (curatieve) behandeling voor mensen en honden met chronische (lage) rugpijn als gevolg van degeneratie van de tussenwervelschijven. Het is aannemelijk dat de fundamentele en translationele doelstelling behaald zal worden. Daarvoor is de inzet van proefdieren noodzakelijk, maar de onderzoekers doen al het mogelijke om het ongerief voor de dieren en het aantal dieren tot een minimum te beperken.
3. Er is tot op heden geen adequate behandelmethodede voor de veelvoorkomende lage rugpijn als gevolg van slijtage van de tussenwervelschijf. Met de kennis die wordt verworven met deze studie is een behandeling voor de vele mensen én honden die hierdoor chronische rugpijn ervaren mogelijk wel te realiseren en de kwaliteit van leven te verhogen. Op grond van het bovenstaande is de DEC van oordeel dat het onderzoek naar (de werking van) de iPS-NLCs en RNA gebaseerde therapie een substantieel belang vertegenwoordigt en dat dit belang opweegt tegen de aantasting van het welzijn en de integriteit van de proefdieren. De relatie tussen het directe en het uiteindelijk doel is voldoende helder. Het is aannemelijk dat de directe doelstelling behaald zal worden. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn, dat het doel niet met minder dieren behaald kan worden, dat de gebruikte aanpak de meest verfijnde is en dat er geen sprake zal zijn van onbedoelde negatieve effecten voor mens, dier en milieu als gevolg van de dierproeven. Het gebruik van de proefdieren zoals beschreven in de aanvraag is daarmee gerechtvaardigd.

#### **E. Advies**

1. Advies aan de CCD  
 De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

- De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden.
  - 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 is gebaseerd op consensus..

3. Er zijn geen knelpunten/dilemma's naar voren gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies.



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag



Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 93118  
2509 AC Den Haag  
centralecommissiedierproeven.nl  
0800 789 0789  
info@zbo-ccd.nl

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD10800202216538

**Bijlagen**

2

Datum 28 oktober 2022

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 28 oktober 2022. Het gaat om uw project "Notochordal cell-based therapies for disc regeneration". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD10800202216538. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

**Wacht met de uitvoering van uw project**

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

**Factuur**

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

**Meer informatie**

Heeft u vragen, kijk dan op [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl), stuur een e-mail naar [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl) of neem telefonisch contact met ons op: 0800 789 0789.

**Datum:**

28 oktober 2022

**Aanvraagnummer:**

AVD10800202216538

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

**Bijlagen:**

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur



### Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10800  
Naam instelling of organisatie: Universiteit Utrecht  
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: [REDACTED]  
Postbus: 12007  
Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]  
Functie: Professor  
Afdeling: Chirurgie, dept Clinical Sciences, Faculteit Diergeneeskunde  
Telefoonnummer: [REDACTED]  
E-mailadres: [REDACTED]

### Over uw aanvraag

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

### Over uw project

Geplande startdatum: 1 mei 2023  
Geplande einddatum: 30 april 2028  
Titel project: Notochordal cell-based therapies for disc regeneration  
Titel niet-technische samenvatting: Het verjongen van de rug: een remedie tegen rugpijn  
Naam DEC: DEC Utrecht  
Postadres DEC: Postbus 85500 3508 GA Utrecht  
E-mailadres DEC: dec-utrecht@umcutrecht.nl

### Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1.467,-  
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

### Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen:  Projectvoorstel  
 Beschrijving Dierproeven  
 Niet-technische samenvatting

**Ondertekening**

Naam:

[REDACTED]

Functie:

[REDACTED]

Plaats:

Utrecht

Datum:

26 september 2022



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

UU-ASC  
Postbus 80.011  
3501 TA UTRECHT  


**Centrale Commissie  
Dierproeven**  
Postbus 93118  
2509 AC Den Haag  
centralecommissiedierproeven.nl  
0800 789 0789  
info@zbo-ccd.nl

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD10800202216538  
**Bijlagen**  
2

Datum 28 oktober 2022  
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**  
Factuurdatum: 28 oktober 2022  
Vervaldatum: 27 november 2022  
Factuurnummer: 2216538  
Ordernummer: CB.841910.3.01.011

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD10800202216538	€ 1.467,00

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 te 's Gravenhage.

**From:** [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)  
**To:** [Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht; CvB postmap \(UBD BS\)](#)  
**Cc:** [redacted] [dec-utrecht@umcutrecht.nl](mailto:dec-utrecht@umcutrecht.nl)  
**Subject:** Aanhouden AVD10800202216538  
**Date:** maandag 5 december 2022 16:55:31

---

Geachte [redacted]

Op 28-10-2022 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Notochordal cell-based therapies for disc regeneration" met aanvraagnummer AVD10800202216538. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In dit bericht leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

### **Welke informatie nog nodig**

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

### **Niet technische samenvatting**

U spreekt in de NTS bij de keuze van de diersoort over de universiteitskliniek. Hierdoor zal makkelijk te achterhalen dat het hier om Utrecht gaat. Kunt u 'universiteitskliniek' weghalen om de NTS anoniem te maken?

### **Onduidelijkheden**

U geeft in de bijlage dierproeven bij E aan dat bij observatie van klinische verschijnselen het dier wordt geëuthanaseerd bij ernstig ongerief. Kunt u hierbij specifiek benoemen op welke criteria u let om ernstig ongerief uit te sluiten?

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

### **Opsturen binnen veertien dagen**

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van dit bericht op. U kunt dit aanleveren via NetFTP.

### **Wanneer een beslissing**

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Mocht u vragen hebben, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,  
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

Marjolein Brouwer-van Olderen  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

.....  
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag

.....  
T: 0800 789 0789

E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)

Dit bericht kan informatie bevatten die niet voor u is bestemd. Indien u niet de geadresseerde bent of dit bericht abusievelijk aan u is gezonden, wordt u verzocht dat aan de afzender te melden en het bericht te verwijderen.

De Staat aanvaardt geen aansprakelijkheid voor schade, van welke aard ook, die verband houdt met risico's verbonden aan het elektronisch verzenden van berichten.

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

The State accepts no liability for damage of any kind resulting from the risks inherent in the electronic transmission of messages.



Bezoekadres: [REDACTED]

Postadres: [REDACTED]

Aan: CCD (centrale commissie dierproeven)

**Faculteit Diergeneeskunde**

**Department of Clinical Sciences**

**Ons kenmerk:** 0119.MTR/MdB/2.15

**Uw kenmerk:**

**E-mail:** [REDACTED]

**Datum:** 13 december 2022

**Onderwerp:** Aanhouden AVD10800202216538

**Telefoon**

[REDACTED]

**Blad**

Blad 1 van 1

Geachte commissie leden, hieronder treft u een puntsgewijs response in blauwe tekst op de gesteld vragen tav aanvraag AVD10800202216538, *Notochordal cell-based therapies for disc degeneration*.

**Vragen:**

Niet technische samenvatting

U spreekt in de NTS bij de keuze van de diersoort over de universiteitskliniek. Hierdoor zal makkelijk te achterhalen dat het hier om Utrecht gaat. Kunt u 'universiteitskliniek' weghalen om de NTS anoniem te maken?

*Response: we hebben de referentie naar de universiteitskliniek verwijderd en vervangen door "in de praktijk". Hartelijk dank voor het opmerken van dit aspect.*

**Onduidelijkheden**

U geeft in de bijlage dierproeven bij E aan dat bij observatie van klinische verschijnselen het dier wordt geëuthanaseerd bij ernstig ongerief. Kunt u hierbij specifiek benoemen op welke criteria u let om ernstig ongerief uit te sluiten?

*Response: Bij D benoemen we alle klinische verschijnselen (paraparesis, paralysis, unilateral lameness of the hind limb, proprioceptive disorders, urinary incontinence) waar we op letten om te identificeren of er een situatie ontstaat die te maken heeft met HEP. Deze zijn onderdeel van de gemodificeerde Griffith's score die gebruikt wordt in de neurologische evaluatie van een hond met letsel aan zijn ruggenmerg. We hebben sectie E aangepast om dit te verduidelijken gemarkeerd met "groene tekst" om de wijzigingen zichtbaar te maken voor de commissie.*

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

Universiteit Utrecht

[Redacted]

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 93118  
2509 AC Den Haag  
centralecommissiedierproeven.nl  
0800 789 0789  
info@zbo-ccd.nl

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD10800202216538

**Bijlagen**

3

Datum 19 december 2022

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [Redacted]

Op 28 oktober 2022 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Notochordal cell-based therapies for disc regeneration" met aanvraagnummer AVD10800202216538. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

**Beslissing**

Wij keuren uw aanvraag goed. Uit artikel 10a, eerste lid van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) volgt daarom dat het is toegestaan om uw project uit te voeren binnen de gestelde vergunningsperiode. Deze vergunning wordt afgegeven voor de periode van 1 mei 2023 tot en met 30 april 2028.

De onderbouwing van deze beslissing vindt u onder 'Overwegingen'.

**Procedure**

*Advies dierexperimentencommissie*

Wij hebben advies gevraagd bij de dierexperimentencommissie DEC-Utrecht (hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 24 november 2022. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

*Nadere vragen aanvrager*

Op 5 december 2022 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft tijdig antwoord gegeven. Het verzoek om aanvullingen had betrekking op de humane eindpunten en het aanpassen van de Niet Technische Samenvatting. Uw reactie is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

**Overwegingen**

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de DEC, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

**Datum:**

19 december 2022

**Aanvraagnummer:**

AVD10800202216538

**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 93118, 2509 AC 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. Nadat u een bezwaarschrift heeft ingediend kunt u een voorlopige voorziening vragen bij de voorzieningenrechter van de rechtbank in de vestigingsplaats van de vergunninghouder. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisende situatie.

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 vergunninghouder valt.

**Meer informatie**

Heeft u vragen, kijk dan op [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl), stuur een e-mail naar [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl) of neem telefonisch contact met ons op: 0800 789 0789.

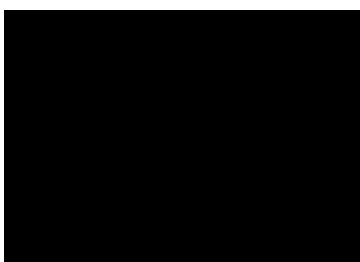
**Datum:**

19 december 2022

**Aanvraagnummer:**

AVD10800202216538

Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:

**Bijlagen:**

- Projectvergunning
- DEC-advies
- Weergave wet- en regelgeving



# Projectvergunning

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

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan  
Naam: Universiteit Utrecht  
Adres: Postbus 12007  
Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT  
Deelnemersnummer: 10800

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 mei 2023 tot en met 30 april 2028, voor het project "Notochordal cell-based therapies for disc regeneration" met aanvraagnummer AVD10800202216538, na advies van dierexperimentencommissie DEC-Utrecht. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]. Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 28 oktober 2022
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 24 november 2022;
  - b Bijlagen dierproeven
    - 3.4.3.1. Dog model of IVD degeneration, zoals ontvangen op 13 december 2022;
  - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 13 december 2022;
  - d Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 24 november 2022
  - e De aanvullingen op uw aanvraag, zoals ontvangen op 13 december 2022.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief
<b>3.4.3.1. Dog model of IVD degeneration</b>			
	Honden (Canis familiaris) / Beagle	21	100,0% Matig

### Geldende voorschriften

Wij wijzen u op onderstaande geldende voorschriften, die volgen uit artikel 1d, vierde lid, artikel 10, eerste lid en/of artikel 10a3 van de wet.

- Go/ no go momenten worden voor aanvang van elk experiment afgestemd met de IvD.
- Het is verboden 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.
- Het is verboden dierproeven te verrichten voor een doel waarvan het belang niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend.
- Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.



**Aanvraagnummer:**  
AVD10800202216538

## 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, derde lid van de wet. Uit artikel 10b, eerste lid van de wet 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, eerste lid van de wet de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven. Artikel 10b, tweede en derde lid van de wet schrijven 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 van de wet 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

**Aanvraagnummer:**  
AVD10800202216538

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

### **Einde van een dierproef**

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

Volgens artikel 13b van de wet 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 13c van de wet 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 13d van de wet 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.

### **Levensloofdossier**

Voor iedere hond, kat en niet-menselijke primate moet volgens artikel 15a van de wet een levensloofdossier bijgehouden worden.