

**Aanvraagnummer:**

AVD 20172144-1

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.

## Centrale Commissie Dierproeven



01 DEC 2020

## Aanvraag

### Projectvergunning Dierproeven

#### Administratieve gegevens

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

## 1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 11500 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen															
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table border="1"> <tr> <td>Naam instelling of organisatie</td> <td>UMC Utrecht</td> </tr> <tr> <td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td> <td>10.2.e.eng</td> </tr> <tr> <td>Kvk-nummer</td> <td>30244197</td> </tr> </table>	Naam instelling of organisatie	UMC Utrecht	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	10.2.e.eng	Kvk-nummer	30244197									
Naam instelling of organisatie	UMC Utrecht																
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	10.2.e.eng																
Kvk-nummer	30244197																
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	<table border="1"> <tr> <td>Straat en huisnummer</td> <td>Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht</td> </tr> <tr> <td>Postbus</td> <td>80125</td> </tr> <tr> <td>Postcode en plaats</td> <td>3508TC Utrecht</td> </tr> <tr> <td>IBAN</td> <td>NL27INGB0000425267</td> </tr> <tr> <td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td> <td>Universiteit Utrecht</td> </tr> </table>	Straat en huisnummer	Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht	Postbus	80125	Postcode en plaats	3508TC Utrecht	IBAN	NL27INGB0000425267	Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Utrecht					
Straat en huisnummer	Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht																
Postbus	80125																
Postcode en plaats	3508TC Utrecht																
IBAN	NL27INGB0000425267																
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Utrecht																
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1"> <tr> <td>(Titel) Naam en voorletters</td> <td>10.2.e.eng</td> <td><input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td colspan="2">Wetenschappelijk projectleider</td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td colspan="2">10.2.e.eng</td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> <td colspan="2"></td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td colspan="2">10.2.e.eng@s@umcutrecht.nl</td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters	10.2.e.eng	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.	Functie	Wetenschappelijk projectleider		Afdeling	10.2.e.eng		Telefoonnummer			E-mailadres	10.2.e.eng@s@umcutrecht.nl	
(Titel) Naam en voorletters	10.2.e.eng	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.															
Functie	Wetenschappelijk projectleider																
Afdeling	10.2.e.eng																
Telefoonnummer																	
E-mailadres	10.2.e.eng@s@umcutrecht.nl																
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1"> <tr> <td>(Titel) Naam en voorletters</td> <td></td> <td><input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td colspan="2"></td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td colspan="2"></td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> <td colspan="2"></td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td colspan="2"></td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters		<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie			Afdeling			Telefoonnummer			E-mailadres		
(Titel) Naam en voorletters		<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.															
Functie																	
Afdeling																	
Telefoonnummer																	
E-mailadres																	

- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.
- |                             |                               |   |
|-----------------------------|-------------------------------|---|
| (Titel) Naam en voorletters | 10.2 .e. en g                 | <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
| Functie                     | Principal investigato         |   |
| Afdeling                    | 10.2 .e. en g                 |   |
| Telefoonnummer              |                               |   |
| E-mailadres                 | 10.2 .e. en g  @umcutrecht.nl |   |
- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?
- Ja > Stuur dan het ingevulde formulier Melding Machtiging mee met deze aanvraag
- Nee

## 2 Over uw aanvraag

- 2.1 Wat voor aanvraag doet u?
- Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3
- Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
- Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2 | AVD1150020174288
- Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
- Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3
- 2.2 Is dit een wijziging voor een project of dierproef waar al een vergunning voor verleend is?
- Ja > Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier
- Nee > Ga verder met vraag 3
- 2.3 Is dit een melding voor een project of dierproef waar al een vergunning voor is verleend?
- Nee > Ga verder met vraag 3
- Ja > Geef hier onder een toelichting en ga verder met vraag 6

## 3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- |            |               |
|------------|---------------|
| Startdatum | 1 - 2 - 2018  |
| Einddatum  | 31 - 1 - 2023 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Immune receptor mediated control of tumors
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Immuun receptor therapie tegen kanker
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- |             |                               |
|-------------|-------------------------------|
| Naam DEC    | DEC Utrecht                   |
| Postadres   | Postbus 85500 3508 GA Utrecht |
| E-mailadres | dec-utrecht@umcutrecht.nl     |

## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1389,= Lege
- Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
- Via een eenmalige incasso
- Na ontvangst van de factuur
- Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*

01 DEC 2020

## 5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
- Verplicht
- Projectvoorstel
- Niet-technische samenvatting
- Overige bijlagen, indien van toepassing
- Melding Machtiging
- 

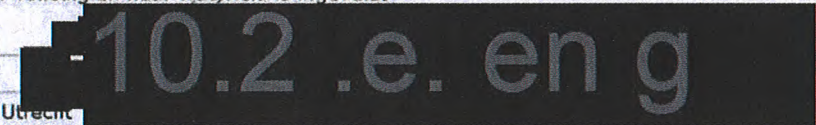
## 6 Ondertekening

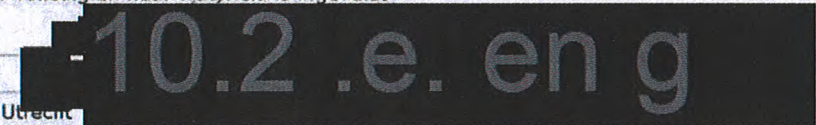
- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:

Centrale Commissie  
Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag

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

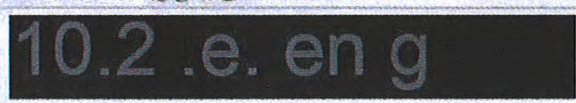
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
- dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan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

Naam 

Functie 

Plaats Utrecht

Datum 23 - 11 - 2020

Handtekening 

Date approval IvD Utrecht: 16-11-2020  
+ stamp



Instantie voor  
Dierenwelzijn  
Utrecht

bezoekadres  
Bolognalaan 50  
3584 CJ Utrecht

postadres  
Postbus 80125  
3508 TC Utrecht

01 DEC 2020  
10:30:2531389  
info@ivd-utrecht.nl  
www.ivd-utrecht.nl

## Modification form through the IvD Utrecht

Mail to [info@ivd-utrecht.nl](mailto:info@ivd-utrecht.nl)

CCD-number: AVD1150020174288	Serial number modification	13
Date: 18-09-2020		
Title of the Project: Immune receptor mediated control of tumours		
Type procedure <sup>1</sup> : all and title:		
Final date license: 31-01-2023		
Concerns modification in:		
Aanvraagformulier CCD <input type="checkbox"/>	Project proposal <input type="checkbox"/>	Appendix Description Animal Procedures <input checked="" type="checkbox"/> NTS <input checked="" type="checkbox"/> Work protocol <input type="checkbox"/>
If modification Work protocol:		
Number work protocol <sup>2</sup>	Title work protocol	
Nature of the modification:		
Adjust cumulative discomfort percentages in the different appendices of the project AVD1150020174288		
Reason for modification:		
As discussed with IVD, the cumulative discomfort percentages for the different appendices of the project AVD1150020174288 that we estimated when the project was written differ from the actual discomfort observed when performing the experiments. For this reason, we would like to adjust those percentages to more realistic values.		
Number of animals granted for this type of experiment		
Number of animals mentioned in this work protocol:		
Discomfort estimated in original protocol:	see attachments	
Discomfort estimated in modified protocol:	see attachments	
Name responsible scientist (art. 9):	10.2.e.eng	
Name responsible performer		
Name applicant of modification:	10.2.e.eng	
Email applicant:	10.2.e.eng@umcutrecht.nl	applicant: 10.2.e.eng
Not to be filled in by the applicant:		
This concerns:	<input type="checkbox"/> Internal only <input type="checkbox"/> Report to CCD	<input checked="" type="checkbox"/> Assessment CCD
	Concerns extra procedure under terminal anaesthesia: <input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No	
If internal:	Replacement WP required: <input type="checkbox"/> yes <input type="checkbox"/> no	<input checked="" type="checkbox"/> n.a.
	Replacement procedures list required: <input type="checkbox"/> yes <input type="checkbox"/> no	<input checked="" type="checkbox"/> n.a.
Stipulations: none		

<sup>1</sup> This number should match the number of the *Appendix Description Animal Procedures* from the original application.

<sup>2</sup> (PRIS) study number and serial number



Instantie voor  
**Dierenwelzijn**  
Utrecht

Modification overview (is filled in by the IVD):

n.a.

01 DEC 2020



Instantie voor  
**Dierenwelzijn**  
Utrecht

Centrale Commissie Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK s-GRAVENHAGE

bezoekadres  
Bolognalaan 50  
3584 CJ Utrecht

postadres  
Postbus 80125  
3508 TC Utrecht  
T (030) 253 15 69  
info@ivd-utrecht.nl  
www.ivd-utrecht.nl

uw kenmerk AVD1150020174288

ons kenmerk

datum 19 november 2020

onderwerp Wijziging projectvergunning

Mijne Dames en Heren,

Bijgaand zend ik u een wijziging van bovenstaande projectvergunning. De vergunninghouder is helaas pas volgende week in de gelegenheid het aanvraagformulier te ondertekenen. Het ondertekende formulier zal z.s.m. worden nagezonden.

#### **Correspondentieadres**

Ik verzoek u vriendelijk de correspondentie aan portefeuillehouder te verzenden aan de Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht. Daarvoor kan in de adressering direct onder de naam van de portefeuillehouder worden vermeld: t.a.v. de Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht, Postbus 80125, 3508 TC Utrecht. Bij e-mail correspondentie graag [info@ivd-utrecht.nl](mailto:info@ivd-utrecht.nl) in CC plaatsen.

#### **Facturering**

De vergunninghouder zal de leges voor de bijgaande aanvraag voldoen aan de CCD na ontvangst van de factuur. Ik wil u vriendelijk doch dringend verzoeken op de factuur **onderstaand factuuradres te gebruiken** en daarbij het vetgedrukte grootboeknummer vermelden.

#### **Factuuradres**

UU -ASC  
postbus 80.011  
3508 TA Utrecht  
o.v.v. **10.2 .e. en g**

Ik verzoek u vriendelijk de factuur alleen digitaal in te dienen. Via die route kunnen de leges het snelst worden voldaan. Hiervoor kunt u gebruik maken van het volgende e-mail adres: [asc.factuur@uu.nl](mailto:asc.factuur@uu.nl). Daarnaast vraag ik u [info@ivd-utrecht.nl](mailto:info@ivd-utrecht.nl) in CC te plaatsen.

Met vriendelijke groet

**10.2 .e. en g**

**10.2 .e. en g** Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht

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

1. Aanvraagnummer : AVD1150020174288
2. Titel van het project : Immune receptor mediated control of tumours
3. Titel van de NTS : Immuun receptor therapie tegen kanker: effectief en veilig
4. Type aanvraag:
  - nieuwe aanvraag projectvergunning
  - wijziging van vergunning met nummer : 2

#### 5. Contactgegevens DEC

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

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

- ontvangen door DEC: 23-11-2020
- aanvraag compleet:
- in vergadering besproken: 22-12-2020
- anderszins behandeld: ambtelijk per email 23-11-2020
- termijnonderbreking(en) van / tot : 02-12-2020/14-12-2020
- besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
- aanpassing aanvraag:
- advies aan CCD: 23-12-2020

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

8. Eventueel horen van aanvrager: n.v.t.

#### 9. Correspondentie met de aanvrager

- Datum vragen: 02-12-2020
- Datum antwoord: 14-12-2020
- Gestelde vragen en antwoorden:

Zou u de volgende vragen willen beantwoorden / toelichten?

- De percentages per klasse ongerief zijn gewijzigd, waardoor niet alleen het aantal dieren met matig ongerief is toegenomen, maar ook het aantal dieren met ernstig ongerief. In de oorspronkelijke aanvraag was het cumulatieve ongerief ingeschat op basis van ervaring en in overleg met de IvD. Wat maakt dan dat u nu dit ongerief wilt / moet bijstellen?

*In the original application, we estimated the discomfort based on previous studies experience and consultation with IvD. However, after running recent studies under this project, we realized that the initial percentage calculated do not count for the cumulative*



*discomfort due to procedures performed in total. Therefore, as suggested by IvD, we adjusted these percentage in the project (DEC) to streamline it with current situation so that the percentages can reflect more realistic values. This means that many studies will have moderate discomfort where we originally write mild discomfort. Furthermore, we adjusted the level of severe discomfort based on what we have seen in the studies so far. In appendix 1, we have seen slightly higher percentage of severe discomfort due to weight loss after irradiation (3%), hence we have adjusted this percentage to 5% to be on the safe side. In the other Appendices 2 and 3, the percentages are significantly lower than we originally expected. We reason that due to the increased experience of our team and discussions with IvD we got more experienced in early detecting mice that have signs of paralysis in combination with appearance, weight, adjusted way of walking (have a scoring system) and therefore are sacrificed before the HEP and don't reach severe discomfort. For appendix 4, we have performed only 1 experiment, hence, kept the expected level of severe discomfort as expected before.*

- U geeft in de oorspronkelijke aanvraag aan dat 41% van de dieren een HEP zal bereiken, dat % is niet aangepast in de wijziging terwijl er een fors aantal dieren meer ernstig ongerief zal ondergaan. Kunt u uitleggen waarom voor deze dieren geen HEP toegepast kan worden zodat het % gelijk blijft en dus het aantal dieren niet hoeft te verschuiven van 1 naar 5% of dit aanpassen en onderbouwen?

*As stated above, we mainly adjusted the Severe discomfort to be higher in Appendix 1 (1% to 5%), while in the other Appendices the Severe discomfort are the same or lower than the original percentages. We did not adjust the HEP advantages, since we kill most animals before the HEP is reached and as such this percentages still reflect the original calculations, where 41% of the mice will reach HEP due to tumour growth and the remaining 59% of mice tumour burden is low. 59% of animals don't reach the HEP, because at the moment the animal is sacrificed for the collection of tissues is before the HEP or due to the treatment effect the HEP is not reached or the experiment is ended before the HEP is reached. From 41% of mice that reach HEP, around 5% of them will have severe discomfort. The change of percentages in the discomfort level is based on cumulative discomfort with consideration of total procedures performed overall.*

- De antwoorden hebben niet 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. De voorgestelde wijziging is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een wijziging op een bestaande vergunning.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Er zijn geen DEC-leden betrokken bij het betreffende project.

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

1. De aanvraag is toetsbaar en heeft voldoende samenhang. Het uitgangspunt van de onderzoekers is een nieuw soort immunotherapie, gericht tegen bepaalde receptoren op kanker cellen. De tot nu toe toegepaste klassieke immunotherapieën met antistoffen tegen zogenaamde checkpoint inhibitors (membraan antigenen voorkomend op immuuncellen welke

betrokken zijn bij het aan- of uitzetten van de immunologische reactie) en met zg. Chimere Antigeen Receptor (CAR) T-cellen (een klasse T-cellen die in vitro zijn getransfecteerd met receptoren tegen tumorantigenen) zijn succesvol. Deze vorm van immunotherapie werkt goed en vooral tegen tumoren met een hoge zogenaamde 'mutational load', dus met veel mutaties. Maar tumoren met een lage 'mutational load' zoals bijv. acute myeloïde leukemie zijn veel minder gevoelig voor deze vormen van immunotherapie.

De onderzoekers hebben in voorgaande projecten een nieuw soort immunotherapie ontwikkeld welke gebruik maakt van een populatie T-cellen (██████████) die natuurlijkerwijze al betrokken is bij de afweer tegen tumoren. Deze klasse van T-cellen kan tumorcellen van gezonde cellen onderscheiden, niet door hun mutaties als kankercel, maar op basis van kleine veranderingen in het lipide metabolisme van de kankercel. Deze klasse T-cellen zou dus ook effectief kunnen zijn bij tumoren met een lage mutational load.

De onderzoekers hebben dit concept al in het laboratorium ontwikkeld door deze T-cellen te transfecteren met de gewenste receptor en deze tot expressie te brengen. Deze specifieke ██████████ (10.1 c en 10.2 g) zijn in vitro gekloneerd en gekweekt (██████████). Deze eerste ██████████ wordt momenteel in patiënten verder onderzocht. Intussen hebben de onderzoekers diverse ██████████ (10.1 c en 10.2 g) ontwikkeld welke onderzocht zijn op tumor specifieke cytotoxiciteit.

De Commissie heeft uitvoerig stilgestaan bij deze aanvraag vanwege de uitgebreide immunologische kennis welke nodig is om deze aanvraag te begrijpen, maar is unaniem van mening dat de aanvraag zeer goed is opgeschreven. Het gaat hier om zeer hoogwaardig onderzoek waar al veel zorgvuldig vooronderzoek aan vooraf is gegaan in de selectie en werkzaamheid van de ██████████-cel (10.1 c en 10.2 g). Het is logisch dat de verdere werking nu in vivo moet worden onderzocht op tumoren met een lage mutational load. Het ligt dan ook voor de hand om dit in muismodellen met tumoren te doen, waarbij in de muizen dan humane tumoren worden geïnduceerd/geïmplantend en het muizen immuunsysteem genetisch is uitgeschakeld (gehumaniseerde muizen). De aanvraag is daardoor een toetsbaar en navolgbaar geheel, welke het meeste lijkt op voorbeeld 1 uit de "Handreiking Invulling Definitie Project".

*Niet gewijzigd t.o.v. de oorspronkelijke aanvraag.*

2. Voor zover de DEC bekend, is er geen mogelijk tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de dierexperimenten in de weg zou kunnen staan.

*Niet gewijzigd t.o.v. de oorspronkelijke aanvraag.*

3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën sluiten aan bij de hoofddoelstellingen. Hoewel de termen werkzaamheid en veiligheid onderdeel zijn van deze aanvraag is de Commissie van mening dat het hier geen wettelijk voorgeschreven onderzoek betreft voor registratie doeleinden van een nieuwe immunotherapie, maar vooronderzoek om uiteindelijk op basis van werkzaamheid en veiligheid intern de juiste kandidaat te kiezen voor verdere ontwikkeling en trials in de mens. Volgens de onderzoekers is voor dit type onderzoekers geen verder wettelijk verplicht onderzoek noodzakelijk.

*Niet gewijzigd t.o.v. de oorspronkelijke aanvraag.*

### *Belangen en waarden*

4. Het directe doel van het project is het onderzoeken van nieuwe immuuntherapieën met bepaalde T-cel klonen tegen bepaalde type tumoren in muismodellen. Het uiteindelijke doel van het project is patiënten met een tumor welke niet gevoelig is voor een behandeling met antistoffen of CAR T-cellen te behandelen met in het laboratorium gekweekte **10.1 c en 10.2 g** T-cellen (klonen) welke verschillen kunnen "zien" in lipide metabolisme van de tumorcel en daarnaast een specifiek antigeen op de tumor herkennen hetgeen leidt tot cytotoxiciteit van de tumor cel. Daarvoor is het eerst nodig het biologische werkingsmechanisme op te helderen en het mechanisme achter de specifieke biodistributie (hoe komen de gekloonde T-cellen in voldoende mate bij de tumor)? De T-cellen worden gecoat met bepaalde nanopartikels om de distributie te optimaliseren en de werking aan te kunnen tonen. Verder is het belangrijk dat de therapie veilig is en de T-cellen alleen de tumor aanvallen en geen andere cellen. Als laatste stap voor de beslissing of de T-cel kloon geschikt is voor verdere ontwikkeling is het belangrijk of deze in voldoende mate kan worden gewekt met methodieken welke vallen onder Good Manufacturing Procedures omdat alleen deze productie methode volgens de autoriteiten toegelaten zal worden voor humane therapieën. De DEC is daarom van mening dat er in voldoende mate een samenhangende relatie is tussen het directe doel en het uiteindelijke doel.  
*Niet gewijzigd t.o.v. de oorspronkelijke aanvraag.*

5. De belangrijkste belanghebbenden in dit onderzoeksproject zijn: proefdieren, onderzoekers, en kankerpatiënten. De morele waarden die voor het proefdier in het geding zijn: de implantatie van een humane tumor en het daarmee gepaard gaande ongerief van de operatie en de groei van de tumor. De morele waarden die voor de onderzoekers worden bevorderd zijn: het verkrijgen van meer fundamentele kennis over het gebruik van specifieke T-cel populaties voor de behandeling van bepaalde tumoren. De morele waarden die voor de patiënten worden bevorderd is dat er in potentie nieuwe behandelmethoden beschikbaar komen met tumor specifieke cytotoxische T-cellen als immunotherapie voor tumoren welke niet of slecht reageren op bijv. een behandeling met antistoffen tegen checkpoint inhibitors.  
*De belanghebbenden zijn niet van gewijzigd t.o.v. de oorspronkelijke aanvraag, maar het ongerief dat de proefdieren zullen ondergaan wel. Daarom is er een nieuwe schade baten afweging gemaakt bij D2.*

6. De aanvrager geeft niet aan nadelige effecten op het milieu te verwachten. De DEC ziet geen aanleiding om aan te nemen dat zich toch nadelige effecten zullen voordoen.  
*Niet gewijzigd t.o.v. de oorspronkelijke aanvraag.*

### *Proefopzet en haalbaarheid*

7. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn ruim 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. Er is heel

veel vooronderzoek verricht in het laboratorium met o.a. celkweken, en organoid modellen waardoor veel dieren bespaard zijn. De betrokken onderzoekers zijn zeer ervaren op dit gebied. *Niet gewijzigd t.o.v. de oorspronkelijke aanvraag.*

8. Het project is goed opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten logisch en helder aan bij de aangegeven doelstellingen en de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Zoals bij C1 al uitgelegd, hebben de onderzoekers al veel in vitro vooronderzoek gedaan. Op basis van die resultaten worden kandidaten gekozen voor verdere werkzaamheid in de verschillende tumormodellen (onderhuids, uitzaaiingen en orthotopische tumoren). De gekozen strategie is voor de Commissie helder en heeft als zodanig geen vragen opgeroepen. Wel heeft de Commissie gediscussieerd over de te gebruiken tumormodellen. Er wordt niet echt toegelicht welke tumormodellen gebruikt zullen worden, maar onderzoekers leggen uit dat ze zullen kiezen voor modellen die bepaalde humane tumoren het beste benaderen. Voor het ongerief van de muis kan het type tumor echter wel uitmaken en ook wat de plaats is (orthotoop, subcutaan, etc.) waar de tumor geïnjecteerd wordt. Maar de DEC is van mening dat het ongerief goed is afgebakend en dat de keuze over welke tumormodellen gebruikt gaan worden zorgvuldig genomen wordt. Verder geven onderzoekers nog aan dat ze zelf geen modellen willen gaan opzetten, maar gebruik zullen maken van reeds bestaande en goed beschreven en gevalideerde tumormodellen. De DEC is derhalve van mening dat het voor de ethische afweging niet uitmaakt dat de tumormodellen niet genoemd worden.

*Tijdens en na de uitvoering van experimenten is gebleken dat het cumulatieve ongerief hoger moest worden ingeschat dan van tevoren was verwacht. Dit vanwege het cumulatieve aantal handelingen en vanwege de effecten van de totale lichaamsbestraling. Omdat men verwacht dat het aantal dieren met matig ongerief om die reden zal toenemen, is een nieuwe ethische afweging noodzakelijk. De DEC heeft hierover nog enkele aanvullende vragen gesteld en de IvD om een toelichting gevraagd. De IvD heeft toegelicht dat men, met name de dieren die door de bestraling ernstig in gewicht afnemen, proteïne verrijkt voer geeft en/of geweekt voer als extra maatregel om het afvallen zoveel mogelijk te voorkomen.*

#### *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. *Niet gewijzigd t.o.v. de oorspronkelijke aanvraag.*
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is *na aanpassing van aantallen dieren per categorie voor deze wijziging nu* realistisch ingeschat en geclassificeerd. De onderzoekers hebben de diverse aspecten van pijn en ander ongerief per ingreep goed beschreven in de bijlagen. Ze beschrijven ook welke observaties bijdragen aan het ongerief en hoe dat door hen geclassificeerd wordt. Ook geven ze aan welke complicaties ze verwachten bij de tumorgroei en wanneer ze om die reden een humaan eindpunt gaan toepassen. Deze door de onderzoekers ingeschatte mate van ongerief is geen aanleiding geweest voor een discussie hierover door de Commissie. *Zie ook de opmerking bij C8.*
12. De integriteit van de dieren wordt fysiek aangetast door de implantatie van de tumor en de groei daarna en de behandeling van de tumor. Ook zal de meting van de tumorgroei onder beeldvormende techniek de dieren in hun fysieke welzijn aantasten omdat zij (kort) worden verdoofd. Ondanks deze fysieke aantasting kunnen de dieren wel hun normale gedrag vertonen. Deze aantastingen in fysiek welzijn zijn onvermijdelijk als de proeven in deze opzet worden uitgevoerd. *Niet gewijzigd t.o.v. de oorspronkelijke aanvraag.*
13. De humane eindpunten zijn in de bijlage dierproeven goed gedefinieerd en het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt bereikt is goed ingeschat. De beschreven humane eindpunten volgen de 'code practice' voor kankeronderzoek en beschrijven met name de grootte van de tumor of het gaan bloeden of zweren. De genoemde aantallen zijn aangepast na vragen van de commissie en is een schatting gebaseerd op de praktijk. *Er worden humane eindpunten verwacht door het ernstig afvallen van dieren na bestraling, maar het totale aantal dieren met ernstig ongerief wordt lager, omdat de verwachting is dat het ongerief voor de hieronder beschreven verschijnselen minder zal worden.* Daarnaast zou de behandeling met de T-cellen een zogenaamde graft versus host reactie (GvH) kunnen oproepen. Deze wordt beoordeeld op basis van een gevalideerd score systeem. Ook in dat geval is een humaan eindpunt onvermijdelijk. De onderzoekers geven aan dat dit bij 2 van de 5 behandelgroepen zou kunnen optreden. Het getal berust op eerdere observaties in voorafgaande experimenten en dit lijkt de commissie redelijk ingeschat.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn om uiteindelijk een betrouwbare uitspraak te kunnen doen over de werkzaamheid van de behandeling van tumoren met cytotoxische T-cellen. Daarnaast is het belangrijk uit te zoeken of deze therapie ongewenste bijwerkingen heeft. *Niet gewijzigd t.o.v. de oorspronkelijke aanvraag.*

15. Het aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en er is een heldere strategie om ervoor te zorgen dat tijdens het project met het kleinst mogelijke aantal dieren wordt gewerkt waarmee nog een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Er is een duidelijk uitgewerkte strategie met beslismomenten voor verder onderzoek. De aantallen zijn daarnaast statistisch onderbouwd. En hebben geen aanleiding gegeven tot discussie bij de Commissieleden tijdens de behandeling van deze aanvraag. *Niet gewijzigd t.o.v. de oorspronkelijke aanvraag.*
16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project is zodanig opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. De betrokken onderzoekers hebben zeer veel ervaring met muis-tumor modellen. Doordat de groei van de tumoren ook met beeldvormende technieken wordt gevolgd, is niet te verwachten dat dieren onnodig leiden doordat tumoren inwendig te ver doorgroeien.  
*Zie ook toelichting bij C 8.*
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. *Niet gewijzigd t.o.v. de oorspronkelijke aanvraag.*
19. De dieren worden in het kader van het project gedood om dat het humane eindpunt is bereikt, of omdat de tumor en organen moeten worden uitgenomen voor verdere analyse. De dieren worden volgens een, bijlage IV van de EU richtlijn, passende methode gedood. *Niet gewijzigd t.o.v. de oorspronkelijke aanvraag*
20. De vraag over hergebruik is niet van toepassing omdat de dieren gedood worden in het kader van het experiment. *Niet gewijzigd t.o.v. de oorspronkelijke aanvraag.*
- NTS*
21. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd. *Niet gewijzigd t.o.v. de oorspronkelijke aanvraag.*

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

1. De morele vraag die de DEC dient te beantwoorden is of het belang van dit onderzoek, namelijk kunnen bepaalde specifieke T-cel klonen worden gebruikt als nieuwe immunotherapie voor tumoren met een lage mutatie, de onvermijdelijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de gebruikte proefdieren kan rechtvaardigen.
2. Er vindt een *grotendeels* aanzienlijke aantasting van welzijn en integriteit van de proefdieren plaats met licht, matig of ernstig ongerief. *Als gevolg van deze wijziging zijn de aantallen dieren per klasse ongerief gewijzigd naar: 9% licht; 82% matig en 9% ernstig ongerief*

Indien de hierboven genoemde doelstellingen behaald worden, dan zal dit project er toe bijdragen dat de onderzoekers meer wetenschappelijk inzicht hebben verkregen in deze nieuwe generatie immunotherapie en dat patiënten welke tumoren hebben welke nu niet of slecht gevoelig zijn voor de behandeling met de klassieke immunotherapie dan wel effectief behandeld zou kunnen worden. Het is aannemelijk dat de fundamentele & 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. De Commissie is zeer onder de indruk van alle resultaten welke tot u toe al zijn behaald met in vitro methoden. De directe link van het onderzoeksteam met de kliniek is van grote waarde voor gebruik van de resultaten in de klinische praktijk op langere termijn. *De commissie heeft opnieuw beoordeeld of zij voor deze wijziging, waarmee het ongerief van grotendeels licht naar grotendeels matig toeneemt, tot een andere afweging komt. De commissie is echter unaniem van mening dat de toename van de ongeriefsinschatting haar niet tot een ander afweging brengt en is derhalve nog steeds van mening dat het ongerief minder zwaar weegt dan de belangen van onderzoekers en patiënten.*

3. Op grond van het bovenstaande is de DEC van oordeel dat de behandeling van bepaalde tumoren met tumor specifieke cytotoxische T-cellen een essentieel belang vertegenwoordigt en dat dit essentiële belang opweegt tegen de grotendeels aanzienlijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de proefdieren. 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.



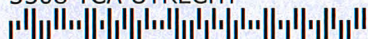
> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

UMC Utrecht

10.2 .e. en g

Postbus 80125

3508 TCA UTRECHT



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 93118

2509 AC Den Haag

centralecommissiedierproeven.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

info@zbo-ccd.nl

**Onze referentie**

Aanvraagnummer

AVD1150020174288-2

**Bijlagen**

3

Datum 12 januari 2021

Betreft Beslissing Wijziging projectvergunning Dierproeven

Geachte 10.2 .e. en g

Op 19 november 2020 hebben wij uw aanvraag voor een wijziging op een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Immune receptor mediated control of tumors" met aanvraagnummer AVD1150020174288-2. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

### **Beslissing**

Wij keuren uw wijzigingsaanvraag goed. Uit artikel 10a, eerste lid van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) volgt daarom dat het vanaf de datum van deze brief is toegestaan om de aangevraagde projectwijziging uit te voeren binnen de gestelde vergunningsperiode. Deze vergunning is afgegeven voor de periode van 1 februari 2018 tot en met 31 januari 2023.

Aan de vergunning hebben wij de volgende voorwaarde verbonden op grond van artikel 10a1, tweede lid van de wet.

### *Beoordeling achteraf*

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk januari 2024 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

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



## **Procedure**

**Datum:**

12 januari 2021

**Aanvraagnummer:**

AVD1150020174288-2

### *Advies dierexperimentencommissie*

Wij hebben advies gevraagd bij de dierexperimentencommissie DEC Utrecht (hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 23 december 2020. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

### *Nadere vragen aanvrager*

Op 30 december 2020 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft tijdig antwoord gegeven. Het verzoek om aanvullingen had betrekking op onduidelijkheden in de inschatting van het ongerief. 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.

### *Beoordeling achteraf*

Na afloop van het project moet er een beoordeling plaatsvinden zoals bedoeld in artikel 10a1, eerste lid, onder d en artikel 10a1, derde lid van de wet. De reden van deze beoordeling achteraf is dat in dit project dieren ernstig ongerief ondergaan. Beoordeling achteraf is nodig vanwege ernstig ongerief bij een deel van de dieren. Deze beoordeling zal uiterlijk januari 2024 plaatsvinden. Meer informatie over de eisen die gesteld worden bij de beoordeling achteraf vindt u in de bijlage 'Weergave wet- en regelgeving'.

## **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: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:

10.2 .e. en g

drs. F. Braunstahl  
Algemeen Secretaris

**Bijlagen:**

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

**Datum:**  
12 januari 2021  
**Aanvraagnummer:**  
AVD1150020174288-2



# Projectvergunning

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

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan  
Naam: UMC Utrecht  
Adres: Postbus 80125  
Postcode en plaats: 3508 TCA UTRECHT  
Deelnemersnummer: 11500

deze wijziging in de projectvergunning voor het tijdvak 1 februari 2018 tot en met 31 januari 2023, voor het project "Immune receptor mediated control of tumors" met aanvraagnummer AVD1150020174288-2, na advies van dierexperimentencommissie DEC Utrecht. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Wetenschappelijk projectleider. Voor de uitvoering van het project en voor de overeenstemming ervan met de verleende projectvergunning is Principal investigator verantwoordelijk. Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 19 november 2020
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 5 december 2017;
  - b Bijlagen dierproeven
    - 3.4.4.1 Humanized tumour models: subcutaneous, zoals ontvangen op 16 november 2020;
    - 3.4.4.2 Humanized tumour models: metastatic, zoals ontvangen op 16 november 2020;
    - 3.4.4.3 Humanized tumour models: orthotopic, zoals ontvangen op 16 november 2020;
    - 3.4.4.4 Humanized mouse models: safety testing, zoals ontvangen op 16 november 2020;
  - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 16 november 2020;
  - d Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 23 december 2020
  - e De aanvullingen op uw aanvraag, zoals ontvangen op 12 januari 2020.

Aanvraagnummer: AVD1150020174288-2

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief
<b>3.4.4.1 Humanized tumour models: subcutaneous</b>			
	Muizen (Mus musculus)	2.600	1,0% Ernstig / 5,0% Ernstig 9,0% Matig / 75,0% Matig 90,0% Licht / 20,0% Licht
<b>3.4.4.2 Humanized tumour models: metastatic</b>			
	Muizen (Mus musculus)	4.050	20,0% Ernstig / 15,0% Ernstig 40,0% Matig / 80,0% Matig 40,0% Licht / 5,0% Licht
<b>3.4.4.3 Humanized tumour models: orthotopic</b>			
	Muizen (Mus musculus)	1.775	18,0% Ernstig / 10,0% Ernstig 45,0% Matig / 80,0% Matig 37,0% Licht / 10,0% Licht
<b>3.4.4.4 Humanized mouse models: safety testing</b>			
	Muizen (Mus musculus)	1.625	1,0% Ernstig 45,0% Matig / 99,0% Matig 54,0% Licht / 0,0% Licht

**Aanvraagnummer:** AVD1150020174288-2

## **Voorwaarden**

### *Beoordeling achteraf*

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk januari 2024 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

### **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:**

AVD1150020174288-2

## 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:**

AVD1150020174288-2

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 blijvende schade zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.

Volgens artikel 13b 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.

**Beoordeling achteraf**

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



## Form

### Project proposal

- This form should be used to write the project proposal for animal procedures.
- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate

#### 1 General information

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

#### 2 Categories

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

#### 3 General description of the project

##### 3.1 Background

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

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

The immune system is a crucial part of many pathological processes. In the case of infectious diseases, the immune system is involved in the neutralization of the pathogens but can also be the target for



several viruses (e.g. HIV, EBV). The role of the immune system in the development and the control of tumours is appreciated more and more. A promising new therapeutic approach against several tumour types aims at the activation of one's own immune system against one's tumour (immuno-oncology). Additionally, the presence of the immune system is a key component in the development of cardiovascular diseases like atherosclerosis. In order to reliably study these pathologies, the presence of a fully functioning immune system is therefore crucial. It is well known that several profound differences exist between the mouse and the human immune system making the results obtained in immunocompetent mice difficult to translate directly to the human situation.

To address this major issue, several labs around the world teamed up to develop and improve human immune system (HIS) mice. HIS mice are generated by engrafting human hematopoietic stem cells (HSC) into severely immunocompromised mice. The development of these models started with the discovery of the SCID mutation which prevents the development of mouse T cells. These mice supported the engraftment of human peripheral blood mononuclear cells (PBMC). This allowed several groups to study HIV infection in a mouse model, which was previously impossible as murine cells are not susceptible to HIV. Several other murine mutations further dampened the mouse immune system by preventing the development of T and B cells (for instance  $Rag2^{-/-}$ ) and NK cells (for instance  $IL2Rg^{-/-}$ ). Nowadays two strains (Balb/c  $Rag2^{-/-}Il2Rg^{-/-}$  - BRG and Nod SCID  $IL2Rg^{-/-}$  - NSG or NOG) are widely used to generate HIS mice. These mice support the engraftment of human HSCs that will develop into all human hematopoietic lineages *in vivo*. Such models are widely used in many domains (Shultz et al., Nat Rev Immunol 2007).

Several labs, including ours, continued to develop new strains to better support human hematopoietic engraftment by the addition of human factors (HLA molecules, cytokines). These "next generation" HIS mice, together with the more traditional NSG/NOG and BRG, can be used to study several fields of biomedical research. For example, our team is currently collaborating with teams working on HIV infection and latency, atherosclerosis formation and treatment, and immuno-therapeutic approaches against several leukaemia's and solid tumours. We routinely produce HIS mice to allow our collaborators to perform their research under their own licence, however for these projects we developed and validated new models when they were not available. Generating HIS mice requires complex logistics and expertise to reach reliable engraftment of human cells (breeding of the mice, obtaining human hematopoietic stem cells, irradiation of the mice, intra-hepatic injection, maintenance of the mice in a sterile environment...). This is difficult for a lab to set up for a single experiment. Commercial suppliers can provide humanized mice but often with limitations; they usually provide a limited number of models that are not necessarily suited for all research purposes and their price is often prohibitive for academic labs. We have set up a working environment and have the expertise in house to produce a wide range of HIS mice models for researchers.

In this project, we aim to apply our long-standing experience to produce HIS mice for licensed researchers to perform their experiments. We will help them select the best model for their research and help them develop new models when required.

### 3.2 Purpose

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

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

The main objective of this project is to produce high quality HIS mice to be used by researchers under their own licenses. Further we will test new HIS mice models that would be required for a specific research project (for instance, validation of HIS mice on a new mouse strain adapted to cardiovascular research).

Based on our previous work, we know that our objective is achievable. Our lab has long-standing experience producing and improving HIS mouse models and we have the infrastructure, the logistics and the expertise to do so. 10.2 .e. en g

### 3.3 Relevance

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

In this project, we will produce HIS mice to allow researchers to perform experiments with an optimal model under their own licenses.

The scientific and social relevance will therefore depend on the experiments carried out with the mice produced within each specific project. Based on our ongoing collaborations, here is the scientific and social relevance of some of the projects carried out with the HIS mice we have produced.

#### Scientific relevance:

- Immunology: understanding the developmental process of immune cells, their plasticity and their involvement in several pathologies (e.g. allergy, COPD, Asthma, auto-immune diseases.)
  - Infectious diseases: characterisation of immune cells serving as an HIV reservoir during anti-retroviral treatment.
  - Cardiovascular diseases: understanding which immune cells are involved in the development of cardiovascular diseases.
- Oncology: characterization of cells within the tumour micro-environment and their influence on tumour growth.
- Immunization: characterization of the effect of new immunization strategies on the immune system.

#### Social relevance:

In the different areas described above HIS mice can be used to test new promising drugs against currently incurable life-long diseases like autoimmune disease or HIV infection, life threatening conditions like tumours and cardiovascular diseases. These are among the leading causes of death in the world and have severe economic impact on societies (therapy, special care, inability to work...). Finding a new efficacious drug would prevent deaths and could improve the quality of life of millions of people. The ability to test a new drug candidate in HIS mice allows us to predict the interaction of the drug with the immune system revealing potential adverse side effects that would otherwise be only observed in the first injection in a human volunteer.

### 3.4 Research strategy

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

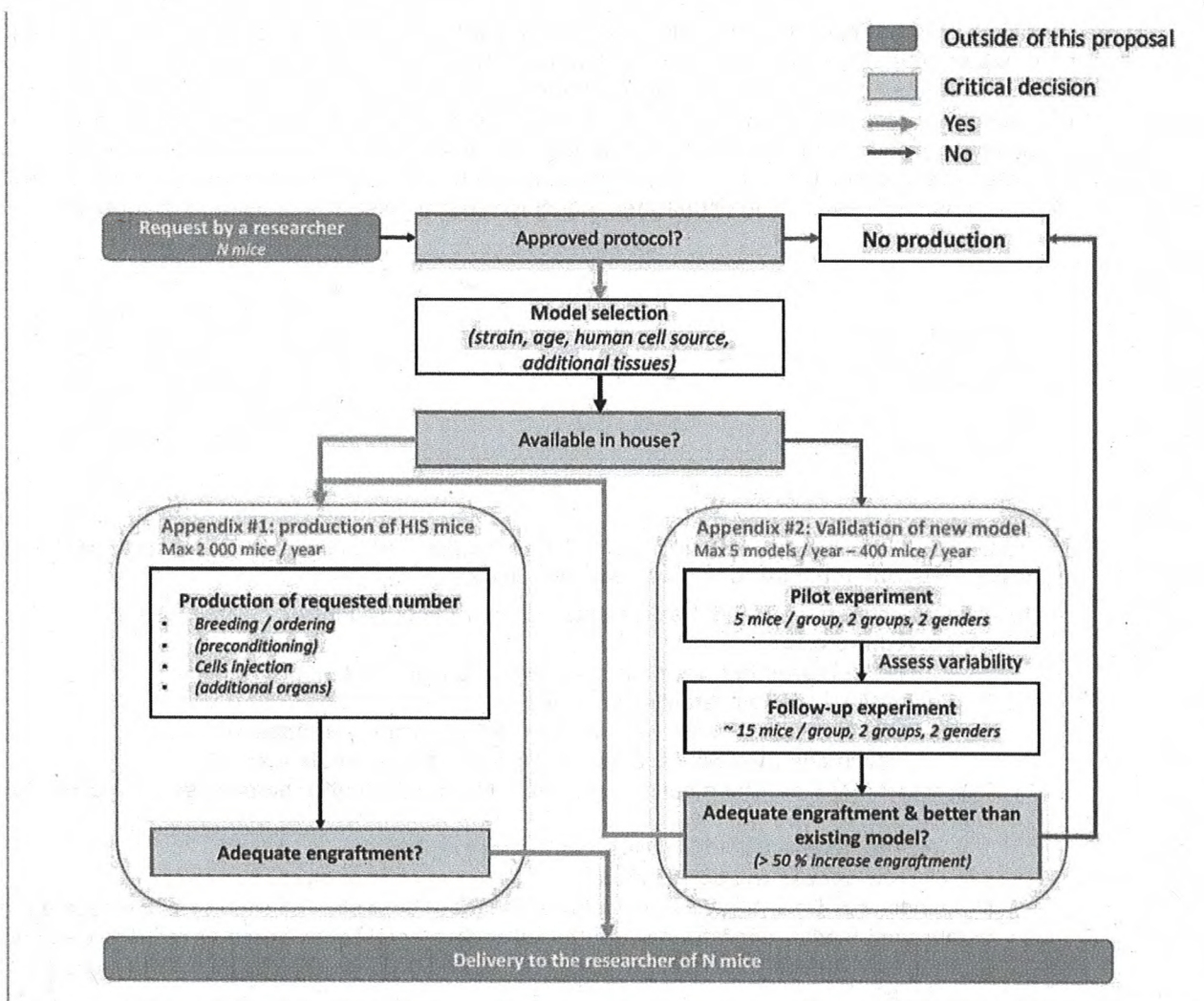
The goal of this project is to produce HIS mice for researchers who will perform subsequent experiments under their own licence.

If we have experience with the model requested, we will produce these mice under appendix #1. Mice with adequate engraftment of human cells in the peripheral blood will be transferred to the researcher.

If the researcher requires a new or custom model, we will first validate this model under appendix #2.

Once validated (adequate engraftment and/or better than existing models), we will add this model to our portfolio and produce the number of mice requested under appendix #1.

The following figure sums up the design and the number of mice involved in this project.



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

Upon request of HIS mice from a researcher, we will extensively review the literature to evaluate if the best model for this research is available in house or needs to be validated as indicated in the figure of 3.4.1.

A model is described as a combination of strain, preconditioning condition, cells to be injected and potential additional organ to be implanted.

If a validated model is in place in our lab, we will produce HIS mice under appendix #1.

Under this appendix, we will use immunodeficient mice from different strains depending on the research question at hand. The choice of the strain has no consequences for the discomfort and the number of animals used in this appendix. These mice will be obtained from our own breeding or from a certified breeder. When working with newborns, we will mostly use mice from our own breeding instead of shipping pregnant females in order to reduce their stress. Indeed, we are working with strains with high level of stress (e.g. JAX NSG mice) and working with locally bred mice result in less discomfort and dropouts.

Mice will then be engrafted with human hematopoietic stem cells. In most cases, mice will be pre-conditioned by sublethal irradiation or chemotherapy in order to create niches available to allow engraftment of human stem cells in the bone marrow. Additional supporting cells such as human stromal cells or hematopoietic cells may be engrafted in order to favour the development of the human immune cells within the mice. Several weeks after stem cell engraftment (usually 8 to 12 weeks), the engraftment of the human cells will be assessed in the blood of the animals. If the level is satisfactory

(usually >20% human cells in the blood) those mice will be transferred to the researchers to perform their experiments. Mice with lower level of humanization are not suited to perform experiment as the number of human cells is too low to be functionally active.

If a model is not already validated in our lab we will, under appendix #2, establish its validity. A new model could include a new strain of mice, a new source of stem cells or new supporting cells/organs engrafted in the mice. The procedure will be similar to the one described in appendix #1. We will compare this new model to an established model in order to assess its validity and superiority.

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

The following points are critical decision points. They are depicted in the figure in 3.4.1.

- Approved protocol?
  - o If the researcher has no licence, no production will be performed.
- Is the model requested established or new?
  - o Established in house: we will produce the mice under appendix #1.
  - o New model: we will validate the model under appendix #2.
- [Appendix #1] Does the mouse have adequate engraftment of human cells (usually >20% of human cells)?
  - o Yes: mouse will be delivered to the researcher.
  - o No: mouse will be sacrificed.
- [Appendix #2] Does the new model have adequate engraftment and is an improvement over our established model (engraftment >50% better than established strain or reduced discomfort)?
  - o Yes: we add this model to our portfolio and produce the requested mice under appendix #1
  - o No: No production of HIS mice is performed with this model.

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

Serial number	Type of animal procedure
1	Production of HIS mice
2	Validation of new models
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	

## Format DEC-advies

---

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

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

### A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer AVD 10.2 .e. en g 20172325-3
2. Titel van het project Production of Human Immune System Mice
3. Titel van de NTS Het produceren van muizen die een humaan immuun systeem (HIS) hebben.
4. Type aanvraag:
  - nieuwe aanvraag projectvergunning
  - wijziging van vergunning met nummer AVD 10.2 .e. en g 20172325
5. Contactgegevens DEC:
  - naam DEC 10.2 .e. en g
  - telefoonnummer contactpersoon 10.2 .e. en g
  - e-mailadres contactpersoon 10.2 .e. en g
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
  - ontvangen door DEC
  - aanvraag compleet
  - in vergadering besproken 21 september 2017/17 oktober 2019
  - anderszins behandeld
  - termijnonderbreking(en) van / tot
  - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
  - aanpassing aanvraag
  - advies aan CCD 28 oktober 2019
7. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.

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

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

8. Eventueel horen van aanvrager nvt
- Datum
  - Plaats
  - Aantal aanwezige DEC-leden
  - Aanwezige (namens) aanvrager
  - Gestelde vraag / vragen
  - Verstrekt(e) antwoord(en)
  - Het horen van de aanvrager heeft wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag
9. Correspondentie met de aanvrager nvt
- Datum
  - Gestelde vraag/vragen
  - Datum antwoord
  - Verstrekt(e) antwoord(en)
  - De antwoorden hebben wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag
10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC) nvt
- Aard expertise
  - Deskundigheid expert
  - Datum verzoek
  - Strekking van het verzoek
  - Datum expert advies
  - Advies expert

## B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

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

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

>ja

2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag ~~een wijziging op een bestaande vergunning~~.

3. Is de DEC competent om hierover te adviseren?

>ja

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

>nee

## C. Beoordeling (inhoud)

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

Deze aanvraag heeft als hoofddoelstelling het produceren van muizen met een humaan immuunsysteem (HIS muizen) voor dierproeven die vergund zijn in losstaande aanvragen. De hoofddoelstelling bestaat uit twee deeldoelstellingen:

- 1) het produceren van HIS muizen voor onderzoek;
- 2) ontwikkelen van nieuwe modellen.

De aanvraag is toetsbaar door de concrete hoofddoelstelling en heeft voldoende samenhang. De aanvraag komt overeen met voorbeeld 4B. Zowel het produceren van

bestaande modellen als het ontwikkelen van nieuwe modellen dragen beiden bij aan het helder omschreven en duidelijk omljnd hoofddoel.

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

>nvt

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

De aangekruiste doelcategorie (toegepast onderzoek) sluit het beste aan bij de hoofddoelstelling. Er worden muizen geproduceerd die een humaan immuunsysteem hebben. Deze muizen zullen gebruikt gaan worden in het kader van translationeel onderzoek. Echter deze aanvraag betreft enkel het produceren van deze muizen en het ontwikkelen van nieuwe modellen, indien daar vraag naar is. Het translationele onderzoek ligt buiten deze projectaanvraag, maar omdat de dieren in het kader van dit type onderzoek geproduceerd worden vindt de DEC deze categorie het beste aansluiten bij de (uiteindelijke) doelstelling.

#### *Belangen en waarden*

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

Het directe doel (het produceren van muizen met een humaan immuunsysteem) heeft een directe en reële relatie met het uiteindelijke doel (het verrichten van biomedisch onderzoek binnen verschillende onderzoeksvelden). De DEC acht het directe doel gerechtvaardigd binnen de context van het gebruik van deze dieren voor biomedisch onderzoek.

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

De belangrijkste belanghebbenden in dit project, zijn de proefdieren, de HIS-muisfaciliteit en de onderzoekers van de instelling waaraan de HIS-muisfaciliteit verbonden is. De proefdierfaciliteit treedt op als leverancier van muizen met een humaan immuunsysteem voor vergunde dierproeven. De proefdierfaciliteit heeft een financieel belang bij het verrichten van deze werkzaamheden maar draagt ook bij aan een maatschappelijk belang. Het produceren van HIS-muizen binnen de eigen instelling maakt het mogelijk om hoogstaand onderzoek te verrichten. De proefdieren binnen deze aanvraag worden geschaad omdat ze ontvankelijk gemaakt worden voor het ontwikkelen van een humaan immuunsysteem d.m.v. chemotherapie of bestraling. Deze conditionering veroorzaakt matig ongerief.

De onderzoekers van de instelling hebben een belang bij het produceren van deze HIS-muizen binnen de eigen instelling. Het gebruik van deze HIS-muizen is noodzakelijk voor het verrichten van onderzoek naar de reactie van het humaan immuunsysteem op therapeutische middelen. Dit zal hun inzicht vergroten. Daarnaast is er een financieel belang omdat onderzoek met HIS-muizen als ze buiten de instelling gemaakt zouden worden, financieel niet haalbaar zou zijn.

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

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

#### *Proefopzet en haalbaarheid*

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

Het maken van de HIS-muizen wordt gedaan door kundig personeel van de HISmuis faciliteit. Deze HISmuisfaciliteit heeft al jaren ervaring in het produceren van deze muizen voor de instelling. De IvD ziet er op toe dat alle personen die betrokken zijn bij de productie van deze muizen voldoen aan de wettelijke eisen van kennis en deskundigheid.

De kennis en kunde van de biotechnici en de betrokken onderzoekers worden geborgd door de ruime ervaring met het maken van de HIS-muizen. De DEC heeft daarom geen twijfel of er voldoende kennis en kunde aanwezig is om te blijven voldoen aan de 3V-beginselen en negatieve effecten op mens, dier of milieu te voorkomen gedurende de looptijd van dit project.

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

Deze vraag is niet van toepassing op deze aanvraag. Echter het is belangrijk om op te merken dat de productie afgestemd wordt op de vraag naar HIS-muizen door onderzoekers. In het geval er een bekend model nodig is, zal dit onder bijlage 1 geproduceerd worden. In het geval er vraag is naar een nieuw model, moet dit eerst gevalideerd worden (bijlage 2). Als het getransplanteerde immuunsysteem voor minstens 20% is aangeslagen (dus >20% humane cellen en <80% muizen immuunsysteemcellen) dan wordt het model als bruikbaar gedefinieerd.

#### *Welzijn dieren*

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

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



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

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

Er wordt voldaan aan bijlage III.

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

Het bijzondere aan deze aanvraag is dat deze aanvraag alleen gericht is op het produceren van de HISmuizen en niet op het verdere gebruik van de dieren in dierproeven. Het cumulatieve ongerief *binnen* deze aanvraag is realistisch ingeschat. Het ongerief zal voor de meeste dieren matig zijn omdat de dieren geconditioneerd moeten worden om het humane immuunsysteem te laten aanslaan. Om dit te bereiken worden de muizen bestraald of met een chemotherapie behandeld. In een gedeelte van de muizen wordt er ook een extra operatie uitgevoerd waarbij stukjes weefsel getransplanteerd worden op de rug. De ongeriefinschatting is in overleg met de IvD tot stand gekomen, met gebruikmaking van de Toelichting Codering Ongerief. De DEC meent dat de inschatting van matig ongerief juist is. In de ingediende wijziging staat dat ongeveer 5% van de muizen zal sterven aan acuut hartfalen ten gevolge van de bestraling. Deze muizen worden 's ochtends dood in de kooi gevonden terwijl ze de dag er voor geen symptomen vertoonden. Dit is ingeschat als ernstig ongerief. Hierbij wordt de aanbeveling van FELASA gevolgd waarbij het ongerief van een dood gevonden dier in de kooi ingeschat moet worden als ernstig tenzij het aannemelijk gemaakt kan worden dat het dier niet geleden heeft. Acuut hartfalen kan leiden tot het acuut stoppen van het pompen van het hart, waarna de dood al na enkele minuten intreedt. Bij het vinden van een dier dood in de kooi is het sterfproces niet gezien. Het is daarom moeilijk in te schatten of dit als matig of inderdaad als ernstig ongerief zou moeten worden ingeschat. De DEC heeft nu meegewogen dat het ongerief door acute pijn voorafgaand aan het sterven relatief kort maar ernstig zou kunnen zijn.

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

De "integriteit" van het dier wordt aangetast doordat er een humaan immuunsysteem geïntroduceerd wordt in de muis en additioneel ook stukjes weefsel getransplanteerd zullen worden d.m.v. een operatie. In de periode waarin het immuunsysteem moet aanslaan, hebben de dieren ongerief doordat ze bestraald zijn of met chemotherapie behandeld zijn en omdat ze moeten herstellen van de operatie. Dit ongerief zal het gedrag en het algehele welzijn van de dieren negatief beïnvloeden.

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

De criteria voor humane eindpunten zijn gedefinieerd op algemene tekenen van onwelzijn van dieren, moeite met ademen, gewichtsverlies (>15%), verslechterde motoriek, tumoren, uitgezette buik of bleke oren (bloedarmoede). Deze criteria zullen

dieren beschermen tegen onverwacht of ernstiger dan het verwachte ongerief door de voorbehandeling voor het ontvangen van het humane immuunsysteem of door een beginnende GVHD (graft versus host disease). Er wordt ingeschat dat <5% van alle HIS-muizen die geproduceerd worden om te leveren aan onderzoekers een HEP zal bereiken. Voor de HIS muizen die langer gevolgd worden om de ontwikkeling van een nieuw model te onderzoeken, is het percentage <10% ingeschat en voor de dieren die weefsel getransplanteerd krijgen wordt dit percentage ingeschat als <20%. Gezien de ruime ervaring van deze aanvrager met het produceren van deze muizen heeft de DEC geen reden om te twijfelen aan deze inschatting.

### 3V's

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

Het karakter van deze aanvraag (het produceren van HIS-muizen om te voldoen aan de benodigde muizen voor reeds toegekend onderzoek) geeft al aan dat er geen vervangingsalternatief mogelijk is. De (on-)mogelijkheid van een vervangingsalternatief voor het gebruik van HIS-muizen om een vraagstelling te beantwoorden, komt bij het desbetreffende projectvoorstel aan de orde.

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

De DEC oordeelt dat het aantal dieren realistisch is ingeschat. Het totale aantal is ingeschat op basis van het aantal HIS-muizen dat in het verleden is gemaakt. De DEC oordeelt dat er zo min mogelijk dieren worden geproduceerd omdat:

- a) de protocollen om een humaan immuunsysteem te creëren in een muis is geoptimaliseerd. Hierdoor worden er zo min mogelijk muizen gecreëerd met een te laag aantal humane immuuncellen die onbruikbaar zijn voor onderzoek;
- b) het aantal gemaakte muizen afgestemd wordt op het aantal dieren dat aangevraagd is voor een onderzoek;
- c) er gebruik gemaakt zal worden van controle waarden die in eerdere experimenten zijn verkregen. Dit kan het aantal controle dieren verminderen (bijlage 2).

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

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

- 1) de meest geschikte stam en het meest geschikte transplantatie protocol gebruikt zullen worden om zo goed mogelijk de wetenschappelijke onderzoeksvraag te beantwoorden met zo min mogelijk ongerief voor de dieren;
- 2) de huisvesting van immuundeficiënte dieren zodanig wordt aangepast om infecties te voorkomen;
- 3) er algemene maatregelen getroffen worden om het welzijn van de dieren te bevorderen (kooiverrijking, ervaren personeel)
- 4) de definitie van de HEPs de dieren beschermd tegen onverwacht of ernstiger dan verwacht ongerief.

17. Beoordeel, indien het wettelijk vereist onderzoek betreft, of voldoende aannemelijk is gemaakt dat er geen duplicatie plaats zal vinden en of de aanvrager beschikt over

voldoende expertise en informatie om tijdens de uitvoering van het project te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt. Licht uw beoordeling toe.  
nvt

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

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

Onder K in bijlage 2 wordt genoemd dat zowel vrouwelijke en mannelijke dieren gebruikt zullen worden in het produceren van de HIS muizen. De muizen worden geproduceerd om een vergunde dierproef te verrichten. In het betreffende projectvoorstel zal vermeld staan of beide geslachten in gelijke mate gebruikt zullen worden.

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

De dieren worden gemaakt om biomedisch onderzoek te verrichten buiten dit "productie"protocol. De muizen waarin het immuunsysteem niet voldoende "aanslaat" zullen gedood worden. Deze muizen zijn niet geschikt voor het biomedisch onderzoek waarvoor ze geproduceerd worden. De muizen waarbij het humaan immuunsysteem zich goed ontwikkeld heeft, worden niet gedood maar geleverd aan de onderzoekers die ze besteld hebben. In bijlage 2 wordt het ontwikkelen van een nieuw model beschreven. In dit geval worden ze binnen het kader van het project gedood omdat de uitgroei van humane immuuncellen in de verschillende organen bestudeerd moet worden. Er wordt niet vermeld dat de dodingsmethode anders zou zijn dan een dodingsmethode die in de bijlage IV van de richtlijn staat. De DEC heeft daarom geen reden gehad om daar aan te twijfelen.

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

nvt

*NTS*

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

Ja, de NTS is een evenwichtige weergave van het project.

## **D. Ethische afweging**

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

*Rechtvaardigt het produceren van muizen met een humaan immuunsysteem (HIS-muizen) het matige (95%) tot ernstige (5%) ongerief dat 12000 muizen zullen*

ondergaan?

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

De belangrijkste belanghebbenden in dit productie van muizen met een humaan immuunsysteem, zijn de proefdieren, de HIS muisfaciliteit en de onderzoekers van de instelling waaraan de HIS-muisfaciliteit is verbonden.

De proefdieren worden geschaad omdat ze geconditioneerd moeten worden om cellen van een humaan immuunsysteem te laten uitgroeien. De conditionering bestaat uit bestraling of chemotherapie. In een groep muizen wordt ook nog weefsel door middel van een operatie geplaatst onder de huid van de rug. Dit veroorzaakt matig ongerief in de muizen. Ongeveer 5% van de muizen zal een aantal weken na de bestraling aan een acuut hartfalen sterven. Er gaan geen symptomen vooraf aan deze plotselinge dood. Het ongerief is ingeschat als ernstig. Dit wegen we als een matig nadeel.

De andere groep belanghebbenden, namelijk de HIS-muisfaciliteit zullen door deze productie inkomsten verkrijgen en de productie van HIS muizen dragen bij aan een succesvol onderzoeksklimaat van de instelling waaraan ze verbonden zijn. Dit wegen we als een gering voordeel.

De derde groep belanghebbenden zijn de onderzoekers van de instelling. Het gebruik van deze HIS-muizen is noodzakelijk voor het verrichten van specifiek onderzoek waarbij het humane immuunsysteem bestudeerd moet worden maar dit niet in mensen kan plaatsvinden. Onderzoek in deze muizen zal het inzicht van deze onderzoekers vergroten. Zonder deze HIS-muis faciliteit zou dit type onderzoek niet mogelijk zijn. Dit wegen we als een groot voordeel, vanwege de opbrengst van dit type onderzoek voor de samenleving.

Hoewel 12.000 muizen matig ongerief zullen ondergaan om een humaan immuunsysteem te krijgen, acht de DEC dit gerechtvaardigd door de verwachte gunstige gevolgen van de onderzoeken die met deze dieren verricht zullen worden. In het geval van het verbeteren van een huidig HIS muis model, waardeert de DEC het aantal dieren dat bespaard kan worden na deze optimalisatie als het meest zwaarwegende argument.

De DEC waardeert het leveren van deze HIS muizen voor biomedisch onderzoek, als het meest zwaarwegende gevolg dat tegen het gebruik en het matige ongerief van maximaal 12.000 muizen.

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

## Het produceren van muizen die een humaan immuun systeem (HIS) hebben

De DEC is van mening dat het produceren van muizen die een humaan immuunsysteem hebben ten behoeve van biomedisch onderzoek, het gebruik en het matige (95%) tot ernstige (5%) ongerief dat 12000 muizen zullen ondergaan, rechtvaardigt.

De DEC acht het aannemelijk dat de doelstelling behaald zal worden. De productie wordt uitgevoerd in het kader van vergunde dierproeven door een professionele faciliteit binnen een academisch instituut. Het maatschappelijk en wetenschappelijke belang van de voorgestelde dierproeven zijn al eerder afgewogen tegen het gebruik en het ongerief van de desbetreffende proefdieren. Het gebruik van proefdiervrije alternatieven is al verkend bij het toetsen van deze dierproeven en het gebruik van de proefdieren is reeds noodzakelijk gebleken voor het beantwoorden van de vraagstellingen.

De productie wordt alleen ingezet als er een vergunning voor een dierproef met deze dieren verkregen is. Daarnaast willen de aanvragers bestaande modellen verbeteren om in zoveel mogelijk dieren voldoende uitgroei van humane immuuncellen te hebben. Dit kan bij volgende bestellingen van dit model dieren besparen omdat muizen met te weinig humane immuuncellen ongeschikt zijn voor het onderzoek en vervangen moeten worden door geschikte HISmuizen. Tevens worden nieuwe modellen ontwikkeld indien daar vraag naar is (vanuit een vergunde dierproef aanvraag). De DEC is van mening dat deze strategie het onnodig produceren van deze muizen voorkomt.

De productie van het HIS muis model wordt zo verfijnd mogelijk uitgevoerd doordat de beste stam en het beste transplantatie protocol voor de wetenschappelijk vraag geselecteerd wordt, die zo min mogelijk ongerief voor het proefdier oplevert. Immuundeficiënte dieren worden zo gehuisvest dat infecties voorkomen worden. Daarnaast beschermen de vrij algemene criteria voor een humaan eindpunt de dieren tegen onverwacht ongerief. Ondanks dat het bestralingsprotocol geoptimaliseerd is om schade aan het hart te voorkomen, treedt dit in ongeveer 5% van de muizen op. Deze muizen sterven een aantal weken na de bestraling aan waarschijnlijk acuut hartfalen. Er gaan geen symptomen aan vooraf. Dit maakt het niet mogelijk om dit sterven te voorkomen.

De aanvrager heeft veel ervaring met het produceren van HISmuismodellen. Er is daarom geen twijfel van de DEC over de kennis en kunde van de aanvrager. Deze aanvraag maakt geen gebruik van bijzondere categorieën dieren of dieren met een speciale herkomst. Ook is er geen speciale wet- en regelgeving van toepassing op dit project. Gezien het bovenstaande is de DEC van mening dat dit project het gebruik van proefdieren rechtvaardigt.

## E. Advies

### 1. Advies aan de CCD

- De DEC adviseert de vergunning te verlenen.
- De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
  - x Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.
  - Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist
  - Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te

weten...

- De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
  - De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen:...
  - De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...
  - De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...

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

Dit DEC advies is unaniem tot stand gekomen.

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

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

## **Bijlage I: Voorbeelden**

*De in deze bijlage weergegeven voorbeelden zijn alleen bedoeld om een indicatie te geven van het gewenste antwoord en dienen niet letterlijk overgenomen te worden.*

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

A7. Voorbeeld: "De IvD geeft aan dat de aanvrager de aanvraag met de IvD heeft afgestemd en dat deze de instemming heeft van de IvD."

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

C1. Maak gebruik van de handreiking 'Invulling definitie project' om te bepalen of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft. Overleg de argumenten waarom dit wel of niet het geval is. Geef hierbij ook aan of 1) de aanvraag als programma of project getypeerd wordt (Een programma omvat meerdere projecten en heeft een hoger gelegen doel, terwijl een project een concrete onderzoeksvraag heeft met in principe één concrete doelstelling en een helder geformuleerd resultaat), 2) het project coherent is, waarbij alle dierexperimenten logisch samenhangen en nodig zijn om het beoogde concrete resultaat te bereiken en 3) alle stappen in het project voldoende zijn uitgewerkt en geen onzekerheden bevatten, die voor de ethische toetsing relevant zouden kunnen zijn.

Voorbeeld: "Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. De aanvraag komt overeen met voorbeeld 1 uit de handreiking 'Wat is een project': De verschillende subdoelen zijn zowel tijdsafhankelijk als uitkomstafhankelijk van elkaar. Deze subdoelen zijn allemaal noodzakelijk om de doelstelling te behalen. Het is niet mogelijk de individuele doelen te toetsen, omdat er sprake is van onderlinge afhankelijkheid. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft, zowel binnen de doelstellingen en bijlagen dierproeven, als tussen de doelstellingen, beschreven op basis van welke criteria zij zal besluiten het project wel of niet te continueren. De DEC is er daardoor van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft."

C4. Voorbeeld: "Het directe doel van het project is het verkrijgen van inzichten in de mechanismen die ten grondslag liggen aan de ontwikkeling van bot. Het uiteindelijke doel is het ontwikkelen van nieuwe behandelmogelijkheden die bijdrage aan het herstel van bot na trauma. Het betreft hier een fundamenteel project. Er is binnen dit project geen reële relatie tussen het directe doel en het uiteindelijke doel. De DEC acht het niet waarschijnlijk dat het uiteindelijke doel behaald zal worden binnen de duur van dit project. De aanvrager heeft helder gemaakt wat de status van het onderzoeksveld is en wat de bijdrage van dit project aan het onderzoeksveld zal zijn. Uit de aanvraag blijkt dat de kennis van de mechanismen die ten grondslag liggen aan de ontwikkeling van bot op dit moment zeer beperkt is, dat deze kennis noodzakelijk is voor het ontwikkelen van nieuwe behandelmogelijkheden en dat er behoefte is aan nieuwe behandelmogelijkheden. De DEC is van mening dat het directe doel, het verkrijgen van kennis over botontwikkeling, gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld."

C5. Voorbeeld: "De belangrijkste belanghebbenden in dit translationele project dat gericht is op de ontwikkeling van een therapie voor de ernstige ziekte X zijn de proefdieren, de onderzoekers en de doelgroep/patiënt. Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal

worden aangetast, de dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en pijn ondergaan. Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: De onderzoeker zullen kennis verkrijgen. Ook zal de carrièremogelijkheden van de onderzoekers verbeteren door publicaties en patenten.

Waarden die voor patiënten bevorderd worden: De gezondheid van patiënten zal verbeterd worden. Hierdoor zal de kwaliteit van leven verbeterd worden."

- C9. Het uitgangspunt is dat deze categorieën van dieren, omstandigheden of handelingen niet in dierproeven worden gebruikt. Hier kan alleen van af worden geweken indien er wetenschappelijk is onderbouwd waarom het doel van het project niet kan worden bereikt dan door gebruikmaking van de desbetreffende dieren. Daarnaast gelden er voor elk van de genoemde categorieën specifieke beperkende voorwaarden.

Voorbeeld A: "Er worden dieren uit het wild gebruikt. De aanvrager heeft als volgt onderbouwd waarom het noodzakelijk is wilde dieren te gebruiken:..... De DEC is van mening dat de doelstellingen van de proef niet behaald kunnen worden met dieren die speciaal voor onderzoek worden gefokt. De DEC is er verder van overtuigd dat het vangen van de dieren door deskundige personen zal gebeuren waardoor de kans op pijn en lijden beperkt zal worden. Ook is er een dierenarts beschikbaar om de dieren te onderzoeken/behandelen mocht tijdens of na het vangen blijken dat de dieren een slechte gezondheid hebben of gewond zijn geraakt."

Voorbeeld B: "Er wordt een dodingsmethode gebruikt die niet beschreven staat in bijlage IV van de richtlijn. De aanvrager heeft als volgt onderbouwd dat dit noodzakelijk is:..... De DEC is van mening dat de doelstellingen van de proef niet behaald kunnen worden indien een in de bijlage IV beschreven methode gebruikt wordt en het dus noodzakelijk is om een alternatieve methode te gebruiken. De DEC is van mening dat de beschreven alternatieve methode, te weten....., een acceptabel alternatief is, omdat....."

- C12.Voorbeeld: "De integriteit van dieren wordt fysiek aangetast door de dieren genetisch te veranderen. De integriteit zal ook gedragsmatig worden aangetast. Gedurende het project worden de dieren namelijk beperkt in hun bewegingsvrijheid en zullen de dieren individueel gehuisvest worden. Hierdoor zullen de dieren geen natuurlijk gedrag kunnen vertonen."

- C18.Voorbeeld: "De aanvrager zal in het project alleen gebruik maken van vrouwelijke dieren. De aanvrager geeft aan dit in het verleden altijd zo te hebben gedaan en wil dit graag op deze wijze voorzetten. De DEC is van mening dat de aanvrager niet in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd dat het om de doelstellingen te bereiken noodzakelijk is om de proeven met alleen vrouwelijke dieren uit te voeren. Ook heeft de aanvrager niet kunnen aantonen dat het uitvoeren van het project met zowel mannelijke als vrouwelijke dieren zal leiden tot een dermate grote variatie dat er aanzienlijk meer dieren gebruikt dienen te worden.

## **D. Ethische afweging**

- D2. Voorbeeld A: "Project gericht op ontwikkeling van een vaccin voor een ernstige, besmettelijke ziekte:  
Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: matig nadeel.  
Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: gering voordeel.  
Waarden die voor de doelgroep (de samenleving) bevorderd worden: veel voordeel  
De DEC is van mening dat de belangen van de samenleving in dit project zwaarder wegen dan de belangen van en waarden voor de proefdieren. Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit leiden tot de ontwikkeling van een vaccin tegen een tot dusverre onbehandelbare ernstige, besmettelijke ziekte waar een grote groep



mensen aan lijdt. Het is aannemelijk dat de doelstellingen behaald zullen worden. Om dit doel te bereiken worden dieren gebruikt. De onderzoekers doen er echter alles aan om het lijden van de dieren te beperken d.m.v. pijnbestrijding waardoor het werkelijke ongerief van de dieren beperkt blijft.”

Voorbeeld B: “Project gericht op het ontwikkelen van een therapie tegen een ziekte waar al veel behandelingsmogelijkheden voor zijn.

Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: ernstig nadeel.

Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: gering voordeel

Waarden die voor patiënten bevorderd worden: weinig voordeel

De DEC is van mening dat de belangen van de proefdieren in dit project zwaarder wegen dan de belangen van en waarden voor de patiënten. De DEC is van mening dat het om een ziekte gaat waar al goede behandelingsmogelijkheden voor zijn, de verwachte winst door een nieuwe behandeling zeer beperkt is en de kans dat de doelstellingen behaald worden zeer klein is. Daartegenover staat het ernstige ongerief dat de dieren zullen ondergaan.”

- D3. Voorbeeld (Zie D2 voorbeeld A): “De DEC is overtuigd van het belang van de doelstellingen: het ontwikkelen van een vaccin voor een ernstige, besmettelijke ziekte. De DEC is van mening dat de waarden die voor de doelgroep bevorderd kunnen worden zwaarder wegen dan de waarden die voor de proefdieren in het geding zijn. Het project is goed opgezet. De DEC is van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De DEC is er verder van overtuigd dat de aanvrager voldoende kennis en kunde heeft om de doelstellingen te behalen, te kunnen voldoen aan de 3V-beginselen en om te kunnen voorkomen dat mens, dier en het milieu negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven. De DEC is ook van mening dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om het ongerief van de dieren te beperken en het aantal dieren tot een minimum te beperken. Hoewel er sprake is van een bijzondere categorie dieren, dodingsmethode niet volgens bijlage IV, heeft de aanvrager in voldoende mate onderbouwd dat de doelstellingen niet anders bereikt kunnen worden. De DEC is van mening dat het gekozen alternatief acceptabel is en niet leidt tot meer ongerief. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat het voor het eerst ontwikkelen van een vaccin tegen ziekte X met als uiteindelijk doel het uitbannen van deze ziekte wereldwijd op de wijze zoals beschreven in dit project het gebruik van proefdieren rechtvaardigt.”

## **E. Advies**

- E2. Voorbeeld: “Het advies is gebaseerd op een meerderheidsstandpunt. Twee van de DEC leden zouden tot een negatief advies komen. Deze leden zijn van mening dat voor dit project de waarden van de proefdieren die in het geding zijn zwaarder wegen dan de waarden van de doelgroep die bevorderd zullen worden. De redenen hiervoor zijn.....”



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

10.2 .e. en g

**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 93118  
2509 AC Den Haag  
www.centralecommissiedierproeven.nl

T 0900-28 000 28 (10 ct /min)

info@zbo-ccd.nl

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD1 10.2 .e. en g 0172325-3

**Bijlagen**

1

Datum 11 november 2019

Betreft Beslissing Aanvraag wijziging projectvergunning dierproeven

Geachte 10.2 .e. en g

Op 11 oktober 2019 hebben wij uw aanvraag voor wijziging van een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw "Production of Human Immune System Mice" met aanvraagnummer AVD 10.2 .e. en g 20172325, waarvoor op 11 december 2017 een vergunning is afgegeven. Uw wijzigingsaanvraag is bij ons geregistreerd onder aanvraagnummer AVD 10.2 .e. en g 20172325-3. Met de aangevraagde wijziging van de eerder verleende vergunning beoogt u een wijziging in de ongeriefsclassificatie te maken van 100% matig ongerief naar 95% matig en 5% ernstig ongerief. Wij hebben uw wijzigingsaanvraag beoordeeld.

**Beslissing**

Wij wijzen uw wijzigingsaanvraag toe. Dit betekent dat het op grond van artikel 10a, lid1 van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) is toegestaan de in de wijzigingsaanvraag beschreven dierproeven onder de vergunning voor het project "Production of Human Immune System Mice" uit te voeren. Hierna kunt u lezen op grond van welke overwegingen wij tot deze beslissing zijn gekomen.

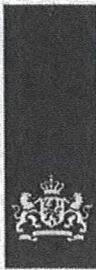
De wijziging wordt vergund onder de volgende voorwaarden:

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet en wordt daarom voorzien van beoordeling achteraf. Deze beoordeling zal uiterlijk december 2023 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

**Procedure**

Wij hebben advies gevraagd bij de Dierexperimentencommissie DEC 10.2 .e. en g (hierna: de DEC). Dit advies is opgesteld op 28 oktober 2019. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de DEC. Wij nemen dit advies van de DEC over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.



**Datum**  
11 november 2019

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD: 0172325-3

### Overwegingen

Op grond van de bovenstaande stukken zijn wij van mening dat de toe te voegen dierproeven toelaatbare wijzigingen betreffen van het project, waarvoor op 11 december 2017 een vergunning is verleend.

### Vergunning

Uw vergunning wijzigt als volgt (wijzigingen cursief gedrukt):

Naam Bijlage	Diersoort	Aantal dieren	Ongerief
3.4.4.1 Production of Human Immune System (HIS) mice	Muizen (Mus musculus)	10.000	<del>100%</del> matig 95% matig 5% ernstig
3.4.4.2 Validation of new models	Muizen (Mus musculus)	2.000	<del>100%</del> matig 95% matig 5% ernstig

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet en wordt daarom voorzien van beoordeling achteraf. Deze beoordeling zal uiterlijk december 2023 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

Voor het overige blijft de vergunning ongewijzigd.  
U dient deze brief toe te voegen bij uw oorspronkelijke vergunning.

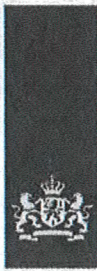
### Bezwaar

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 gegevens in het colofon.

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

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



**Meer informatie**

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

**Datum**  
11 november 2019

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD [redacted] 20172325-3

De Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:

10.2 .e. en g

Drs. F. Braunstahl

Bijlagen  
- DEC-advies



## Format

### Projectvoorstel dierproeven

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

## 1 Algemene gegevens

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

## 2 Categorie van het project

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

## 3 Algemene projectbeschrijving

### 3.1 Achtergrond

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

1. Geef in geval van 'wettelijk vereiste dierproeven' aan welke wettelijke eisen (in relatie tot

- beoogd gebruik en markttoelating) van toepassing zijn.
2. Geef in geval van 'routinematige productie' aan welk(e) product(en) het betreft en voor welke toepassing(en).
  3. Geef in geval van 'hoger onderwijs of opleiding' aan waarom in dit project, in relatie tot het opleidingsprogramma en eindtermen, is gekozen voor dierproeven.

### **Achtergrond**

De natuurlijke pacemaker activiteit van het hart wordt gedreven door de sinusknop ("sino-atriale knoop"), een kleine structuur op de overgang van de bovenste holle ader naar de rechter boezem ("atrium"). De impuls activeert eerst de spier ("myocard") van beide atria en wordt vervolgens doorgegeven aan het myocard van de kamers ("ventrikels") via de atrioventriculaire ("AV")-knoop en het ventriculaire geleidingssysteem. De hartslagfrequentie kan door het autonome zenuwstelsel worden aangepast aan de energiebehoefte van het lichaam.

Als gevolg van hoge leeftijd en hartziekten, of aangeboren hartafwijkingen kan de werking van de sinusknop en de AV-knoop gestoord raken. Deze aandoeningen staan bekend als respectievelijk het sick sinus syndrome (SSS) en (totaal) AV-blok. Hierdoor daalt de hartfrequentie en is de implantatie van een elektronische pacemaker noodzakelijk. De frequentie van deze aandoeningen zal toenemen door het verouderen van de bevolking. In Europa wordt jaarlijks bij ongeveer 700.000 patiënten een pacemaker geïmplanteed. Ondanks meer dan 50 jaar ontwikkeling hebben elektronische pacemakers nog steeds belangrijke nadelen<sup>1,2</sup> zoals: 1. Een inadequate aanpassing in hartfrequentie bij veranderde lichaamsactiviteit (zogenaamde autonome modulatie), 2. Niet-fysiologische stimulatie/activatie van het hart hetgeen bij een deel van de patiënten resulteert in een belangrijke achteruitgang in kamerfunctie (stimulatie komt nu vanuit de punt van de rechter kamer omdat daar de electrode stabiel blijft liggen, en niet hoog vanuit het kamertussenschot), en 3. De beperkte levensduur van de batterij (waarbij elke 5-7 jaar chirurgische vervanging van de pacemaker noodzakelijk is). Daarnaast zijn er aanvullende problemen die intrinsiek zijn aan de geïmplanteerde hardware, zoals het risico op een draadbreek, draaddislocatie en rechterkamerperforatie tijdens implanteren. Een ander probleem is het steeds vaker optreden van device-gerelateerde infecties die notoir moeilijk te behandelen zijn door de aanwezigheid van lichaamsvreemd materiaal. Tot slot wegen alle bovengenoemde tekortkomingen extra zwaar in kinderen aangezien zij reeds op jonge leeftijd een pacemaker geïmplanteed krijgen die gedurende hun leven in totaal soms meer dan 12 maal vervangen moet worden. Door de steeds verder verstoorde anatomie neemt ook het risico op complicaties bij al deze re-implantaties steeds verder toe.

### **Ontwikkeling van biologische pacemakers**

Biologische pacemakers vormen een aantrekkelijk alternatief om deze beperkingen te overwinnen. In ons project AVD<sup>102 s. eng</sup> 20171669 "Ontwikkeling van biologische pacemakers met lange termijn functie" beschrijven we experimenten voor herstel van pacemaker functie door lokaal de expressie te versterken van genen die deze impuls vorming en geleiding in het gezonde hart verzorgen. In dit project willen we directe genetische herprogrammering van hart fibroblasten om het pacemaker- en geleidingssysteem lokaal te doen regenereren, testen als aanpak voor herstel van pacemaker functie. Er is reeds uitgebreid 'proof-of-concept' voor deze herprogrammering. Enerzijds is aangetoond dat fibroblasten zich *in vitro* kunnen ontwikkelen tot myocard cellen ("cardiomyocyten") door over-expressie van specifieke cardiale

transcriptiefactoren<sup>3,4</sup>. Als gevolg van deze herprogrammering brengen fibroblasten specifieke myocard genen tot expressie, en zijn daardoor in staat tot contractie en elektrische geleiding. Deze uitkomsten zijn inmiddels ook *in vivo* gevalideerd waarbij is aangetoond dat de hartspier regenereerde en de pompfunctie van het hart verbeterde<sup>4</sup>. Daarnaast heeft recent onderzoek aangetoond dat het mogelijk is om cardiomyocyten te herprogrammeren richting pacemaker cellen<sup>5,6</sup>.

### Cardiale transcriptiefactoren

Wij willen nu deze herprogrammering verder ontwikkelen. Uit voorgaande studies<sup>7</sup> hebben we een groep van ± 20 transcriptiefactoren geselecteerd die belangrijk zijn voor de embryonale ontwikkeling van het pacemaker- en geleidingssysteem. 10.1 c en 10.2 g

### Retrovirussen

Om de bovengenoemde transcriptiefactoren specifiek in hart fibroblasten tot expressie te brengen, worden deze geïnfecteerd ("getransduceerd") met retrovirussen die het gen bevatten voor deze factoren. De virussen worden in het hart geïnjecteerd, waardoor vrijwel geen verspreiding van virus buiten het hart plaatsvindt<sup>10,11</sup>. Doordat retrovirussen enkel delende cellen kunnen transduceren komen de transcriptiefactoren hoofdzakelijk tot over-expressie in de lokale fibroblasten, en niet in de cardiomyocyten.

### Kleine moleculen

Recente studies hebben verder aangetoond dat de herprogrammering van fibroblasten gestimuleerd kan worden door toevoeging van kleine moleculen<sup>8,9</sup>. Voorbeelden van deze stoffen zijn 10.1 c en 10.2 g

. Wij zullen in onze protocollen daarom werken met retrovirussen in combinatie met dergelijke kleine moleculen.

### Diermodellen

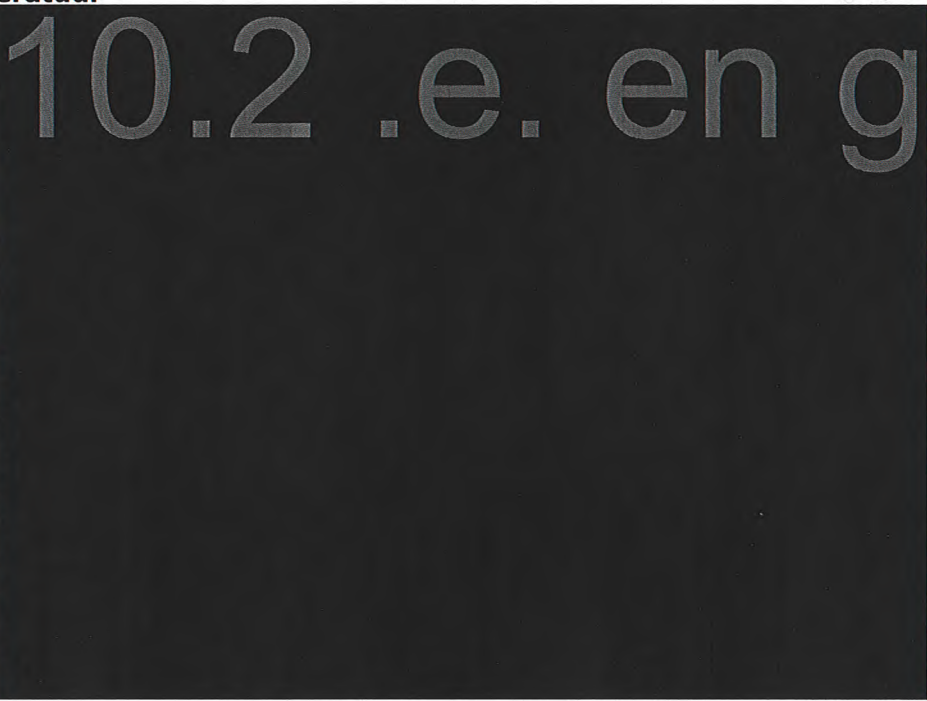
1. We starten met experimenten in fibroblasten, geïsoleerd uit wildtype en (transgene) muizen. We transduceren de geïsoleerde fibroblasten *in vitro* met virussen die cardiale transcriptiefactoren tot expressie brengen. Hierdoor kunnen we een groot aantal (combinaties van) transcriptiefactoren en kleine moleculen testen met een beperkte hoeveelheid dieren. We zullen de expressieniveaus van de ingebrachte genen bestuderen in de fibroblasten, en bepalen hoe lang deze expressie aanhoudt. Door de keuze van transgene muizenstammen voor de isolatie van de fibroblasten (zie 3.4.1 en 3.4.2) kunnen we ook bepalen of de ingebrachte genen succesvolle herprogrammering veroorzaken, en de efficiëntie van herprogrammering bepalen (zie Subdoel 1 en Figuur 1).

2. Veelbelovende (combinaties van) transcriptiefactoren en kleine moleculen uit model 1 zullen een verdere functionele karakterisatie ondergaan *in vivo*, in het muizen LAD myocardinfarct model, een efficiënte *in vivo* setting voor het testen van fibroblasten na retrovirale gen transfer<sup>4,12</sup>. In dit model wordt een myocardinfarct geïnduceerd door afbinden van de LAD (de

voorste tak van de linker kransslagader, of "left anterior descending coronary artery"), waarna virussen die cardiale transcriptiefactoren tot expressie brengen in het beschadigde deel van de hartspier van de linker hartkamer worden geïnjecteerd. Na injectie van effectieve combinaties transcriptiefactoren en kleine moleculen kunnen, volgens eerdere studies, op de plek van injectie structuren ontstaan die morfologisch en functioneel op iSAN, iAVN en iAVG lijken<sup>3,13</sup>. We kunnen zo dus bepalen of de ingebrachte genen de plaatselijke hart fibroblasten herprogrammeren.

### Literatuur

- 1.
- 2.
- 3.
- 4.
- 5.
- 6.
- 7.
- 8.
- 9.
- 10
- 11
- 12
- 13
- 14
- 15
- 16
- 17
- 18
- 19



### 3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

In het geval het project gericht is op één of meer onderzoeksdoelen: op welke vra(a)g(en) dient dit project antwoord(en) te verschaffen?

In geval het een ander dan een onderzoeksdoel betreft: in welke concrete behoefte voorziet dit project?

Doel van dit project is de ontwikkeling van klinisch toepasbare biologische pacemakers als therapie voor hartritmestoornissen bij de mens. We willen (combinaties van) transcriptiefactoren en kleine moleculen identificeren waarmee fibroblasten in het hart geherprogrammeerd kunnen worden tot cellen van het pacemaker- en geleidingssysteem, en de hartfunctie kan herstellen.

#### Het project is opgedeeld in twee onderzoeksvragen

1. Welke (combinaties van) transcriptiefactoren en kleine moleculen zijn het meest efficiënt voor *in vitro* herprogramming van 10.1 c en 10.2 g



10.1 c en 10.2 g

2. Kan ook *in vivo* herprogrammering van 10.1 c en 10.2 g

### Haalbaarheid

De benodigde muizenstammen (zie 3.4.1 en 3.4.2) worden deels al jaren binnen onze groep gebruikt. Er is jarenlange ervaring met de isolatie van fibroblasten uit muizen, en met het LAD model. Vanwege deze aanwezige expertise, mankracht (1 ervaren dierkundig analist, 3 ervaren wetenschappers met aantekening artikel 9), en infrastructuur is de haalbaarheid van dit voorstel groot.

### 3.3 Belang

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

#### Wetenschappelijk belang

Deze studie zal ons helpen de transcriptiefactoren te identificeren die nodig zijn om regeneratie van het pacemaker- en geleidingssysteem van het hart *in vivo* te bewerkstelligen. We zullen hierdoor nieuwe strategieën kunnen ontwikkelen om hartfunctie verlies met specifieke (gen)therapie te behandelen. Daarnaast geeft deze studie fundamenteel inzicht in de regulatoire netwerken en processen die betrokken zijn bij cellijn specifieke differentiatie en specificatie.

#### Maatschappelijk Belang

Hoge leeftijd en cardiovasculaire ziekten gaan vaak gepaard met storingen van het pacemaker- en geleidingssysteem van het hart die kunnen leiden tot een verlaagd hartritme en zelfs hartfalen, en daardoor ernstig verlaagde kwaliteit van leven. Elektronische pacemakers kunnen het hartritme herstellen, maar hebben een groot aantal nadelen. Deze kunnen in belangrijke mate vermeden worden wanneer het ons lukt om de functie van het pacemaker- en geleidingssysteem te herstellen door gebruik te maken van herprogrammering technologie.

### 3.4 Onderzoeksstrategie

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

Voor dit onderzoek is gekozen voor muismodellen. De muis is het meest geschikte model voor het analyseren van moleculaire functies in het hart. Daarnaast is het gebruik van genetische gemodificeerde (transgene) muizen die hartmarkers tot expressie brengen van essentieel belang. Zorgen zorgt voor 10.1 c en 10.2 g

Analise in wild-type muizen is nodig om aan te tonen dat de bereikte resultaten niet transgene muismodel-specifiek zijn. We gebruiken 10.2 e en g, 10.1 c en 10.2 g

#### Subdoel 1. *In vitro* herprogrammering met weefsel uit diverse muizenlijnen

Doel van deze *in vitro* studies is om de (combinaties van) transcriptiefactoren en kleine moleculen te identificeren die het meest efficiënt zijn in het [10.1 c en 10.2 g]

[redacted] Identificatie van de aanwezigheid van geherprogrammeerde cellen door een combinatie kan middels immunohistochemie en/of qPCR op wild-type fibroblasten. Voor efficiënte identificatie van deze geherprogrammeerde celtypen gebruiken we transgene muizenlijnen die fluorescente eiwitten tot expressie brengen als markers van het pacemaker en geleidingssysteem (zie Tabel 2):

1.

[redacted] 10.1 c en 10.2 g

2.

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

3.

[redacted]

[redacted]

[redacted]

Door deze muizenlijnen te kruisen kunnen we, in hartweefsel geïsoleerd na het doden van de muis, het pacemaker- en geleidingssysteem identificeren met de [10.1 c en 10.2 g]

[redacted] genotype. Nauwkeurige vergelijking van het weefsel van beide [10.1 c en 10.2 g]

[redacted] We gebruiken RFP expressie als marker van het myocard, weefsel dat we niet willen isoleren. Daarnaast gebruiken we het RFP expressie niveau als marker voor de (ongewenste) herprogrammering van hart fibroblasten *in vivo*. Naast deze drie lijnen zullen we nog andere muizen lijnen gebruiken<sup>4,16</sup> (zie Tabel 1). De proefopzet bij deze additionele lijnen is vergelijkbaar, maar de extra marker genen zullen ons helpen bij het verder optimaliseren van de herprogrammering. De [10.1 c en 10.2 g]

[redacted] lijnen voor het vaststellen van macrofaag infiltratie in het hart als gevolg van weefselschade door de injectie. Tenslotte zullen we de [10.1 c en 10.2 g]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

**Tabel 1.** Samenvatting van [10.1 c en 10.2 g]

### Subdoel 2. *In vivo* herprogrammering: validatie in myocardinfarct muizen

Doel van deze studies is de [10.1 c en 10.2 g] [redacted] [redacted] [redacted] [redacted] [redacted] in het muizen LAD myocardinfarct