

Inventaris Wob-verzoek W23-03		wordt verstrekt				weigeringsgronden				
nr.	document NTS 202215811	reeds openbaar	niet	geheel	deels	5.1, lid 1c	5.1, lid 2e	5.1, lid 2f	5.1, lid 2h	5.2, lid 1
1	Aanvraag projectvergunning (natte handtekening) d.d. 28-01-2022				x		x		x	
2	Projectvoorstel bij aanvraag				x		x		x	
3	Bijlage dierproeven_1 bij aanvraag				x		x		x	
4	NTS bij aanvraag			x						
5	E-mail aan DEC om advies aanvraag projectvergunning, d.d.				x				x	
6	DEC-advies, d.d. 07-06-2022				x	x	x		x	
7	Projectvoorstel na DEC advies				x		x		x	
8	Bijlage dierproeven 1 na DEC advies				x				x	
9	NTS na DEC advies			x						
10	AdviesNotaCCD, concept d.d. 21-06-2022 met opmerkingen				x		x		x	x
11	AdviesNotaCCD, d.d. 22-06-2022				x		x		x	x
12	E-mail vragen CCD aan vergunninghouder over aanvraag projectvergunning, d.d. 22-06-2022									
13	Bijlage dierproeven na CCD vragen				x				x	
14	NTS na CCD vragen en definitieve versie			x						
15	AdviesNotaCCD, d.d. 29-07-2022				x		x		x	x
16	Beschikking concept met opmerkingen				x		x		x	
17	Beschikking concept met opmerkingen				x		x		x	
18	Beschikking concept met opmerkingen				x		x		x	
19	Beschikking definitief, d.d. 01-08-2022				x		x		x	
20	E-mail CCD aan DEC, terugkoppeling over projectaanvraag, d.d.				x		x		x	



## Aanvraag

### Projectvergunning Dierproeven

*Administratieve gegevens*

- U bent van plan om één of meerdere dierproeven uit te voeren.
- Met dit formulier vraagt u een vergunning aan voor het project dat u wilt uitvoeren. Of u geeft aan wat u in het vergunde project wilt wijzigen.
- Meer informatie over de voorwaarden vindt u op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl) of in de toelichting op de website.
- Of neem telefonisch contact op. (0800-7890789).

## 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 <span style="color: red;">5.1 lid2h</span>				
		<input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen				
1.2	Wat voor aanvraag doet u?	<input checked="" type="checkbox"/> Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 1.3 <input type="checkbox"/> Wijziging > Vul hiernaast het AVD nummer van uw vergunde project in en ga verder met vraag 2.1 <input type="checkbox"/> Melding > Vul hiernaast het AVD nummer van uw vergunde project in en ga verder met vraag 2.2				
1.3	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	<span style="color: red;">5.1 lid2h</span>			
		Titel, voorletters en achternaam van de portefeuillehouder	Titel	Voorletters	Achternaam	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw
		E-mailadres contactpersoon	<span style="color: red;">5.1 lid2e</span>			
		Titel, voorletters en achternaam van de diens gemachtigde (indien van toepassing)	Titel	Voorletters	Achternaam	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw
		E-mailadres gemachtigde				
	Vul de gegevens van het postadres in.	Straat en huisnummer	<span style="color: red;">5.1 lid2h</span>			
		Postcode en plaats				
		Postbus, postcode en plaats				
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	<span style="color: red;">5.1 lid2h</span>			<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	<span style="color: red;">5.1 lid2e</span>			
		Afdeling	<span style="color: red;">5.1 lid2h</span>			

1.5	<i>(Indien van toepassing)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	Telefoonnummer	5.1 lid2e	
		E-mailadres	5.1 lid2e	
		(Titel) Naam en voorletters		<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.
		Functie		
1.6	<i>(Indien van toepassing)</i> Vul hier de gegevens in van de persoon aan wie de portefeuillehouder de verantwoordelijkheid inzake de algemene uitvoering van het project en de overeenstemming daarvan met de projectvergunning heeft gedelegeerd.	Afdeling	5.1 lid2h	
		Telefoonnummer	5.1 lid2e	
		E-mailadres	5.1 lid2e	
		(Titel) Naam en voorletters		<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
1.7	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de Instantie voor Dierenwelzijn	Functie		
		Afdeling		
1.8	Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?	Telefoonnummer		
		E-mailadres		
		<input type="checkbox"/> Ja > <i>Stuur dan het ingevulde formulier Melding Machtiging mee met deze aanvraag</i> <input checked="" type="checkbox"/> Nee		

## 2 Over uw aanvraag

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

## 3 Over uw project

3.1	Wat is de geplande start- en einddatum van het project?	Startdatum	01 - 03 - 2022	
		Einddatum (t/m)	28 - 02 - 2027	
3.2	Wat is de titel van het project?	De rol van het immuun checkpoint eiwit CD40 in hemofagocyttaire lymfohistiocytose		
3.3	Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Op zoek naar een behandeling voor een acute afweerziekte in het bloed: hemofagocyttaire lymfohistiocytose		
3.4		Naam DEC	5.1 lid2h	
		Postadres	5.1 lid2h	

Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) van voorkeur?

E-mailadres	5.1 lid2h
-------------	-----------

## 4 Factuurgegevens

4.1 (indien factuuradres afwijkt van de gegevens uit vraag 1.3) Vul de gegevens van het factuuradres in.

Naam: 5.1 lid2h	Afdeling:
Straat:	
Huisnummer:	
Postcode:	Plaats:
Postbus: 5.1 lid2h	Postcode: 5.1 lid2h
Plaats: 5.1 lid2h	
E-mail: 5.1 lid2h	

4.2 (optioneel) Vul hier het ordernummer van de instelling in.

Ordernummer: 5.1 lid2h
---------------------------

## 5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

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

## 6 Ondertekening

6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD en per post naar de Centrale Commissie Dierproeven (voor adresgegevens zie website)

Ondertekening door de portefeuillehouder namens de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.8). De ondergetekende verklaart:

- 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 C 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	5.1 lid2e
Functie	5.1 lid2e
Plaats	5.1 lid2h
Datum	28 - 01 - 2022
Handtekening	5.1 lid2e



## Formulier

### Projectvoorstel dierproeven

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

### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in. 5.1 lid2h
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in. 5.1 lid2h
- 1.3 Vul de titel van het project in. De rol van het immuun checkpoint eiwit CD40 in secundaire hemofagocyttaire lymfocytose

### 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 2.1 aangekruiste categorieën.

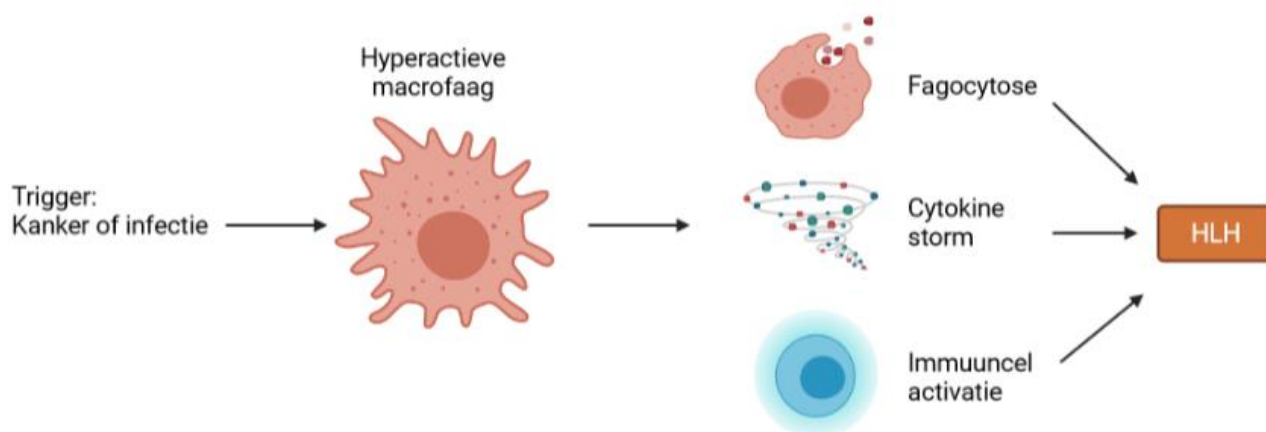
#### Aanleiding:

Secundaire hemofagocyttaire lymfocytose (HLH) is een inflammatoire aandoening die zowel kinderen als volwassenen treft. HLH wordt gekenmerkt door een overmatige activatie van het afweersysteem die wordt uitgelokt door een onderliggende ziekte, zoals een infectie, kanker, immuunziekte, of door immunotherapieën, zoals chimeric antigen receptor (CAR) T-cel therapie. Dit leidt onder andere tot hoge

koorts, vergroting van lymfeklieren, lever en milt, afbraak van bloedcellen, ernstige schade aan organen, en neurologische verschijnselen. Patiënten zijn hierdoor levensbedreigend ziek en opname op een intensive care afdeling is frequent noodzakelijk. Per jaar worden in Nederland circa 50-100 mensen getroffen door HLH. De huidige behandeling van secundaire (de niet-erfelijke variant) HLH bestaat uit de toediening van ontstekingsremmende medicijnen, zoals hoge dosis dexamethason, en chemotherapie. Daarnaast dient de ziekte die HLH uitlokt, zoals een infectie of kanker, behandeld te worden. Helaas is de huidige behandeling vaak ontoereikend en overlijdt circa 8-54% van de patiënten in de acute fase van HLH. Daarnaast zijn patiënten in de acute fase van HLH vaak te ziek om optimale behandeling van de onderliggende ziekte te krijgen. Aanvullende behandelingen voor de acute fase van HLH zijn dringend nodig om de prognose van patiënten met deze zeldzame aandoening te verbeteren.

### Achtergrond:

De macrofaag, een fagocytair immuuncel, heeft een centrale rol in het ontstaan van HLH. Tijdens HLH is er sprake van hyperactivatie van macrofagen waardoor lichaamseigen bloedcellen 'opgegeten' worden door de macrofagen, wat weer leidt tot overmatige activatie van de andere immuuncellen. Daarnaast worden er te veel schadelijke ontstekingsmediatoren geproduceerd, waardoor uiteindelijk een vicieuze cirkel ontstaat die zich kenmerkt door een levensbedreigende en ongecontroleerde macrofaag-gedreven ontstekingsreactie (Figuur 1). Patiënten worden hierdoor ernstig ziek en een groot deel van de patiënten overlijdt aan multipel orgaan falen. Het afremmen van de hyperactieve macrofagen is dan ook een veelbelovende behandelstrategie voor HLH.



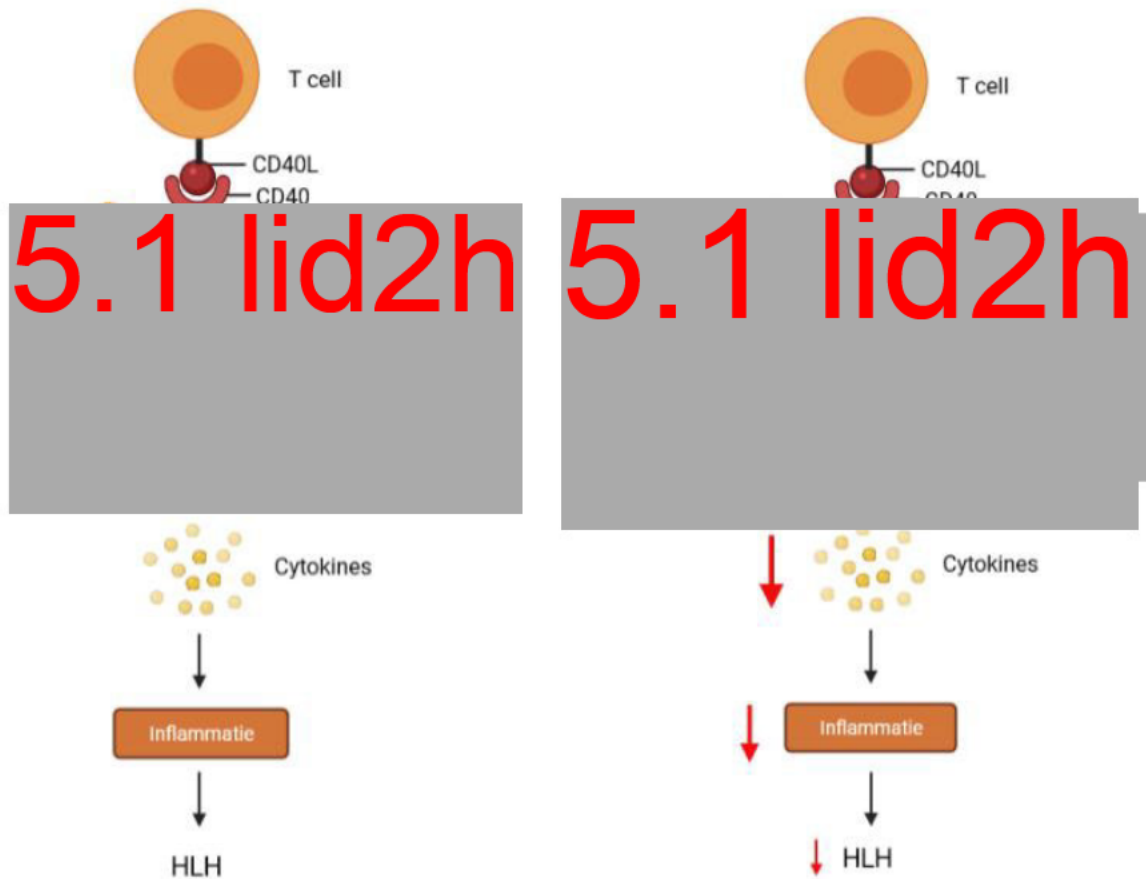
**Figuur 1 HLH ziekteproces** Een trigger, bijvoorbeeld kanker of een infectie, kan leiden tot hyperactivatie van macrofagen. Deze kunnen vervolgens lichaamseigen bloedcellen opeten (fagocytose). Ook produceren de hyperactieve macrofagen veel cytokines, wat kan leiden tot een cytokine storm waarbij ook andere immuuncellen geactiveerd kunnen worden. Deze hyperactivatie van macrofagen is kenmerkend voor de ziekte HLH.

Het immuunsysteem bestaat uit verschillende celtypen (zoals T cellen, B cellen, dendritische cellen, monocytten, en macrofagen) die met elkaar interacteren en zo een immunoreactie kunnen veroorzaken. Activatie van immuuncellen leidt tot de productie van ontstekingsmediatoren, die een belangrijke rol spelen in immuunziekten. De interacties tussen de verschillende immuuncellen worden gemedieerd door immuun checkpoint eiwitten. Immuun checkpoints bestaan uit een receptor-ligand paar, die niet alleen tot expressie worden gebracht op diverse typen immuuncellen, maar ook op epitheelcellen, vetcellen, en zelfs bloedplaatjes. Voorbeelden van immuun checkpoint receptoren-ligand combinaties zijn CD40-CD40L, CD27-CD70, en PD1-PDL1 (Ley *et al.*, 2017). Als een ligand aan de receptor op een immuuncel bindt kan deze interactie zorgen dat een immunoreactie versterkt of juist verzwakt wordt. Op deze manier spelen immuun checkpoint eiwitten een essentiële rol in het immuunsysteem door de activatie status van onder andere T cellen, B cellen, en macrofagen te reguleren tijdens infecties.

Eerder onderzoek van onze groep heeft het belang van diverse immuun checkpoints in het ontstaan van hart- en vaatziekten en obesitas geïnduceerde ontstekingen aangetoond in muizen. Interventies van downstream-mediators van deze immuun checkpoints hebben laten zien dat door het mediëren van immuun checkpoint-gemedieerde-ontstekingsreacties de ernst van atherosclerose en type 2 diabetes afnemen in muizen (5.1 lid2h, 5.1 lid2e). Dit geeft de potentie aan van het interveniëren in immuun checkpoint-cascades in inflammatie-gedreven ziekten, zoals HLH. In deze aanvraag willen wij ons derhalve richten op het onderzoeken van de rol van immuun checkpoint eiwitten in HLH.

In dit project zal specifiek het immuun checkpoint CD40, alsmede de mediators en signaleringsmoleculen die betrokken zijn bij de CD40 signaleringscascade, onderzocht worden in HLH. CD40 is een activerend immuun checkpoint welke de interactie tussen verschillende immuuncellen kan controleren en reguleren. De interactie tussen CD40L-CD40 zorgt via 5.1 lid2h voor een vermindering van de cytokine productie in macrofagen, dit hebben wij reeds aangetoond voor het ziektemodel atherosclerose. 5.1 lid2h

5.1 lid2h laat zeer veel potentie zien in zowel chronisch inflammatoire ziekten zoals atherosclerose en multiple sclerose, als acute inflammatoire ziekten zoals sepsis. Wij verwachten hierdoor dat ook in de acute inflammatoire ziekte HLH een modulering van CD40 signalering therapeutische potentie heeft. In dit project willen wij eerst de rol van het immuun checkpoint CD40, alsmede de mediators en signaleringsmoleculen betrokken zijn bij de CD40 signaleringscascade, onderzoeken in HLH. Vervolgens willen wij onderzoeken of inhibitie van CD40 signalering door middel van het kandidaat-medicijn trafinib (5.1 lid2h) een positief effect heeft op het ziekteverloop in HLH. Met de kennis opgedaan in dit project dragen wij bij aan mogelijke immuun checkpoint therapieën voor HLH en kunnen wij een eerste stap zetten naar het ontwikkelen en onderzoeken van deze interventies.



**Figuur 2 Immune checkpoints in HLH** CD40 activatie van macrofagen **5.1 lid2h**, wat leidt tot de productie van cytokines die inflammatie kunnen induceren. Wanneer dit onregelmatig ontstaat er hyperactivatie van de macrofaag en dit kan leiden tot HLH. Ons kandidaat-medicijn traftinib kan de CD40 signalering remmen, waardoor de inflammatie reactie afneemt en het ziekteverloop van HLH mogelijk minder ernstig verloopt.

### Referenties

- **5.1 lid2h, 5.1 lid2e**
- 
- Ley, K., Gerdes, N., & Winkels, H. (2017). ATVB distinguished scientist award: how costimulatory and coinhibitory pathways shape atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 37(5), 764-777.

### 3.2 Doel

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

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



Het directe doel van dit project is inzicht krijgen in de werking van het immuun checkpoint eiwit CD40, alsook de mediators en signaleringsmoleculen betrokken zijn bij de CD40 signaleringscascade, in een HLH muismodel en hoe deze het ziekteverloop beïnvloeden. Het uiteindelijke doel is om te onderzoeken of CD40 signalering een aangrijpingspunt is voor een interventie, bijvoorbeeld met trafinib, die gebruikt kan worden voor de ontwikkeling van een behandeling van HLH patiënten.

Verschillende subdoelen moeten behaald worden om tot het directe doel te komen, te weten:

1. Via welke processen reguleren het immuun checkpoint CD40 en de daarbij betrokken mediators en signaleringsmoleculen de activatie van verschillende (immuun)celtypen in een HLH ziektemodel en wat is het effect hiervan op het ziekteverloop.
2. Wat zijn de effecten van interventies (onder andere genetisch, farmacologisch) in deze processen op specifieke (immuun)cel functies die belangrijk zijn bij HLH en hoe beïnvloedt dit het ziekteverloop.

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

5.1 lid2h

De onderzoeksgroep is van voldoende omvang (promovendi, postdocs, analisten) om de voorgestelde experimenten uit te voeren. Tevens beschikt het onderzoeksinstituut over de faciliteiten die noodzakelijk zijn voor deze experimenten. Er is binnen onze dierenfaciliteit nog geen ervaring met het HLH model, wij baseren ons model eerdere studies gedaan in een HLH muismodel (Albeituni *et al.*, 2019, Blood). Wel is er al uitgebreide ervaring met andere modellen voor chronische en acute ontstekingsziekten, waaronder atherosclerose, *E.coli* sepsis, polymicrobiële sepsis, en multiple sclerose.

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

Nee

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

## 3.3 Belang

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

#### Maatschappelijk belang

Per jaar worden er in Nederland ongeveer 50-100 mensen gediagnostiseerd met HLH, waarbij 8-54% komt te overlijden in de acute fase van HLH. Met de kennis verkregen in dit project willen we nieuwe immunologische mechanismen ontrafelen die bijdragen aan het ontstaan van HLH bij de muis. Wanneer deze kennis in de toekomst geëxtrapoleerd wordt naar de mens kan CD40 therapie een uitkomst bieden in de behandeling van HLH. 5.1 lid2h

Wanneer blijkt dat trafinib een mogelijke behandelstrategie is voor HLH in muizen, kan hierdoor sneller de stap worden gemaakt om trafinib in een klinische studie bij HLH patiënten te onderzoeken. Daarnaast blijkt uit eerdere studies dat het muismodel van HLH veel overlap vertoont met het ziektebeeld dat wordt gezien bij HLH patiënten. De voor HLH kenmerkende macrofaag geïnduceerde cytokine storm is vergelijkbaar in mens en muis en wordt gekenmerkt door onder andere een verhoogde productie van de cytokines IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , en IL-6 (Albeituni *et al.*, Blood, 2019; 5.1 lid2h, 5.1 lid2e). Ook lopen er op dit moment klinische studies naar de effectiviteit van emampalumab (IFN $\gamma$ -blokkerend antilichaam) bij primaire HLH (de erfelijke variant), deze bevindingen zijn gedaan in de muis en zijn in de eerste klinische trials ook al effectief gebleken bij HLH patiënten (5.1 lid2h). Dit toont aan dat resultaten behaald in de

muis geëxtrapoleerd kunnen worden naar de mens, wat een goede indicatie is dat de bevindingen die in dit project worden gedaan van belang zijn voor het patiënten welzijn en daarmee bijdragen aan het maatschappelijke belang van dit project. Ondanks dat emampalumab effectief lijkt te zijn in de behandeling van primaire HLH, is er een maatschappelijk belang om te blijven zoeken naar alternatieve therapieën van HLH. Voor secundaire HLH kan emampalumab namelijk minder effectief zijn, doordat secundaire HLH een andere oorzaak heeft dan primaire HLH. Waar bij primaire HLH erfelijkheid een grote rol speelt, is de onderliggende oorzaak bij secundaire HLH vaak een infectie of kanker. Emampalumab blokkeert de IFN $\gamma$  respons, een belangrijke respons bij virale infecties, waardoor deze therapie niet geschikt is wanneer de secundaire HLH wordt uitgelokt door een virale infectie. Hierdoor is het van belang om specifiek voor secundaire HLH op zoek te gaan naar nieuwe en betere therapeutische strategieën. Daarom willen wij in dit project onderzoeken of CD40 therapie effectief is in secundaire HLH, doordat CD40 therapie specifiek aangrijpt op de door HLH gedysreguleerde macrofagen, maar ondertussen wel de rest van de immuun respons intact laat.

### Wetenschappelijk belang

Wetenschappelijk gezien zal de kennis die we met dit project vergaren bijdragen aan het begrijpen van de rol van het immuun checkpoint CD40 in HLH, en deze kennis is mogelijk ook relevant voor andere immuun gerelateerde ziekten. [5.1 lid2h](#)

[5.1 lid2h, 5.1 lid2e](#). Interventies van downstream-mediators van het immuun checkpoint CD40 hebben laten zien dat door het mediëren van immuun checkpoint-gemedieerde-ontstekingsreacties de ernst van atherosclerose en type 2 diabetes afnemen in muizen (Chatzigeorgiou *et al.*, 2014; Lameijer *et al.*, 2018). Met dit project kunnen wij verder bijdragen aan het ontrafelen de rol van CD40 in acute immuun ziekten zoals HLH.

### Referenties:

- [5.1 lid2h, 5.1 lid2e](#)
- 
- 
- 
- 
- 
- 
- 
- 
- Walsh, S. J., & Rau, L. M. (2000). Autoimmune diseases: a leading cause of death among young and middle-aged women in the United States. *American journal of public health*, 90(9), 1463.

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

Onderzoeksafdeling: De onderzoeksafdeling doet onderzoek naar immuun checkpoints in immuun gerelateerde ziektes. Dit project draagt bij aan het verkrijgen van meer informatie over het belang van immuun checkpoints in immuunziekten, specifiek voor HLH in dit project.

Onderzoeksveld: Het fundamentele onderzoek in HLH is beperkt. De rol van immuun checkpoints in HLH is minimaal, en dit project zal er aan bijdragen de kennis te vergroten.

Patiënten: Bij HLH overlijden 8-54% van de patiënten door een gebrek aan een adequate behandeling. Dit project draagt bij aan het ophelderden van het ziektebeeld wat de mogelijkheid geeft tot het vinden van nieuwe therapieën bij HLH.

Proefdieren: HLH is een complexe ziekte waarbij het mis gaat in de communicatie tussen immuuncellen. Dit kan niet nagebootst worden met bijvoorbeeld *in vitro* experimenten, waardoor het gebruik van proefdieren nodig is voor dit onderzoek. In dit onderzoek zullen ze ongerief ervaren en worden ze gedood om hun weefsels te kunnen analyseren.

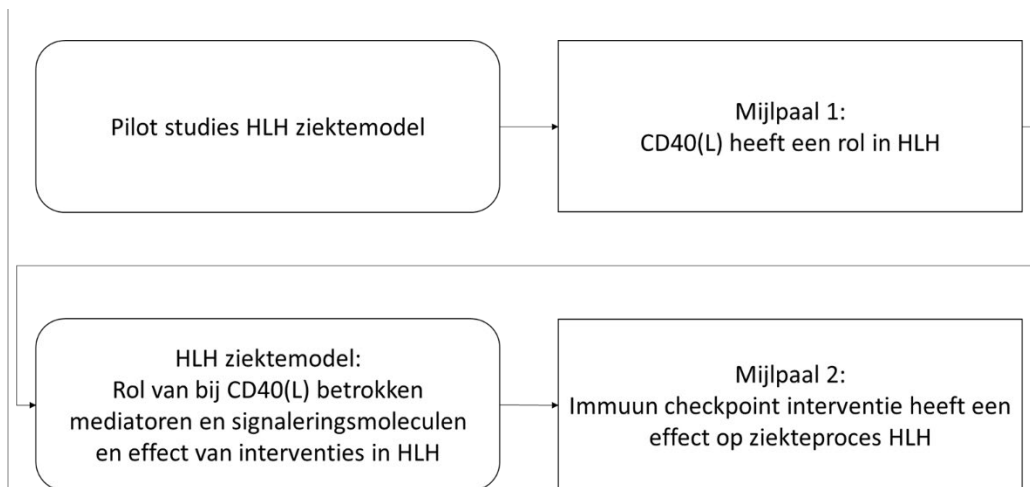
### 3.4 Strategie

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

Voordat wij beginnen aan de studie naar de rol van het immuun checkpoint CD40 in het HLH ziektemodel voeren wij eerst pilot studies uit om het ziektemodel goed werkend te krijgen in onze dierenfaciliteit. Om een rol van CD40 in het HLH ziekteproces te bevestigen zullen wij eerst een pilot studie uitvoeren waarbij wij het ziekteverloop van HLH bekijken in transgene muizen met een CD40 of CD40L knock-out en deze vergelijken met wildtype muizen. Daarna zullen wij met een pilot studie bepalen hoe lang de dieren in experiment moeten blijven. Dit doen wij door op meerdere tijdstippen na HLH inductie de dieren te doden, waarna wij onder andere immuun parameters, zoals immuun cel activatie en cytokine productie, zullen meten om het verloop van HLH te bepalen. Dit doen wij zodat de dieren zo kort mogelijk in experiment zijn, waardoor ze minder lang ernstig ongerief ervaren, maar waarbij wij wel nog de effecten van CD40 modulatie op HLH parameters zien.

Om HLH te induceren worden de muizen geïnjecteerd met CpG oligodeoxynucleotide (CpG-ODN1826) en anti-IL10R antilichaam. Gedurende de experimenten zal het klinisch verloop van de ziekte worden gescoord (gewichtsverlies) en zullen bloedwaarden (hemoglobine concentratie, bloedplaatjes, witte bloedcellen, cytokines, etc.) worden gevolgd en na doden van de dieren (aan het eind van het experiment of bij het bereiken van het humaan eindpunt) zal uitgebreide analyse van de organen en het immuunsysteem worden uitgevoerd. Zodra het diermodel goed werkend is in onze dierfaciliteit én wij een effect zien van CD40 en/of CD40L knock-out op HLH parameters zullen verdere experimenten van start kunnen gaan (eerste mijlpaal). Dit is tevens een "go/no-go" moment, waarbij verdere experimenten niet uitgevoerd worden als wij het HLH ziektemodel niet lopend krijgen in onze dierenfaciliteit of als er geen effect van CD40 op het HLH ziekteproces blijkt te zijn. De kennis opgedaan in de pilot studie helpt tevens ook bij het behalen van het eerste subdoel, te weten als welke processen reguleren het immuun checkpoint CD40 en de activatie van verschillende (immuun)celtypen in een HLH ziektemodel en wat is het effect hiervan op het ziekteverloop.

Nadat in de pilot studies naar voren is gekomen dat het immuun checkpoint CD40 en/of CD40L een effect heeft op het verloop van HLH, kan dit verder onderzocht worden. Hierbij kan gebruik worden gemaakt van cel-specifieke knock-out modellen of van knock-out modellen van andere mediators en signaleringsmoleculen die betrokken zijn bij de CD40 signaleringscascade. Parallel hieraan kunnen farmacologische interventies die de werkwijze van het immuun checkpoint CD40 potentieel beïnvloeden worden getest. Dit wordt gedaan door interventies (bijvoorbeeld farmacologisch, antilichamen, siRNA, lncRNA, miRNA) die aangrijpen op het betreffende immuun checkpoint *in vivo* te onderzoeken in het HLH ziektemodel. Hiermee kunnen wij zowel de rol van het immuun checkpoint in HLH verder bevestigen en een eerste stap zetten in een mogelijke therapie voor HLH in de muis. De tweede mijlpaal wordt behaald zodra een immuun checkpoint interventie een effect heeft op het ziekteproces HLH. Er kunnen meerdere interventies getest worden, die direct op CD40 kunnen aangrijpen of op één van de bij de signalering betrokken mediators of moleculen.



**Figuur 3 Strategie** De experimentele workflow met daarin aangegeven de mijlpalen die bereikt kunnen worden in dit project. Eerst worden pilot studies uitgevoerd om het model te verfijnen en een rol van CD40 of CD40L in HLH te bevestigen. Vervolgens kunnen andere bij CD40 betrokken mediators en signaleringsmoleculen of cel-specifieke effecten van CD40(L) knock-out worden onderzocht voor hun rol in het HLH ziekte proces. Tegelijkertijd kan worden gekeken naar het effect van een interventie van het immuun checkpoint op HLH.

### 3.4.2 Onderbouw de gekozen strategie.

De onderzoeksgroep beschikt al over veel ervaring en kennis over de rol van immuun checkpoints in verschillende ontstekingsziekten. De rol van CD40, en ook de modulatie daarvan, op verschillende immuuncellen en cel processen (bijvoorbeeld de voor HLH relevante cel processen proliferatie en cytokine productie) zijn al uitgebreid onderzocht. Hierdoor gaan wij direct de rol van CD40 *in vivo* in het ziektemodel HLH onderzoeken.

In het HLH ziektemodel is het gewichtsverlies van de muis een goede surrogaat parameter om de ernst van HLH te bepalen, mede doordat het gewicht van de muis een snelle en niet-invasieve meetmethode is. Dit maakt gewichtsverlies, welke kan oplopen tot 20% (>20% is een HEP), de meest geschikte parameter die wij kunnen uitlezen om het verloop van de ziekte te bepalen. Ernstig gewichtsverlies is kenmerkend voor HLH en hoort bij het ziekteverloop en is een surrogaat parameter die gebruikt kan worden om het verloop van HLH te monitoren. De muizen hebben algehele malaise waardoor de ze minder eten en tegelijkertijd hebben de muizen een verhoogd energieverbruik als gevolg van de ontstekingsreacties in hun lichaam. Samen zorgt dit er voor dat de muizen ernstig gewichtsverlies zullen ondervinden. Veel immunologische parameters die de ernst van de ziekte, en het eventuele effect van het immuun checkpoint, aangeven kunnen namelijk pas achteraf bepaald worden. Een aantal parameters, zoals ontstekingswaarden in het bloed, kunnen wel gedurende het experiment worden bepaald. Deze kunnen alleen niet meerdere malen per dag bepaald worden, zoals bij de mens gebeurt, aangezien dit zorgt voor te veel ongerief bij de muizen. Gewichtsverlies dient dus als surrogaat parameter tijdens het experiment om het verloop van HLH te bepalen bij de muizen en zo onze wetenschappelijke vraag te beantwoorden. Achteraf kan het effect van een interventie bepaald worden door immunologische bepalingen te analyseren.

Om de betrokkenheid van CD40 per immuun celtype te onderzoeken zal soms gebruik worden gemaakt van een beenmergtransplantatie waardoor specifiek naar de effecten van uit het beenmerg afkomstige immuuncellen gekeken kan gaan worden, of met de transfer van B- en/of T cellen van transgene muizen in muizen zonder eigen T en/of B cellen. Dit is een aanpak die een snellere maar vooral efficiëntere route is naar beter begrip van de functie van een gen in immuuncellen in de ontwikkeling van HLH en het voorkomt complexe kruisingen waarbij veel muizen nodig zijn. Derhalve draagt dit dus bij aan een efficiënter proefdiergebruik.

Wanneer interessante bevindingen, zoals een biologische relevante verlaging van de cytokine productie of verminderde immuun cel activiteit, worden gedaan *in vivo* zal voor het betreffende immuun checkpoint onderzocht worden of het effect bevestigd kan worden door middel van een interventie op het immuun checkpoint. Dit zal verder het belang van het immuun checkpoint in HLH onderstrepen en is ook een eerste stap in de richting van het bepalen en onderzoeken van een therapeutische strategie.

Om de rol van de kandidaat immuun checkpoint te verifiëren kunnen wij interventies toedienen gericht op het immuun checkpoint. Hiervoor kunnen wij gebruik maken van geneesmiddelen, liganden, of cellen die wij bij de muizen zullen injecteren. Dit kunnen al bestaande geneesmiddelen zijn, bijvoorbeeld antilichamen, die gericht zijn tegen ons kandidaat immuun checkpoint en mogelijk een toepassing hebben in HLH. Ook zullen wij de effectiviteit van door ons ontworpen geneesmiddelen, onder andere trafinib, aangrijpend op de CD40 signaleringscascade onderzoeken in HLH.

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

Volgnummer	Titel bijlage Beschrijving dierproef
1	Ziektemodel Hemofagocyttaire Lymfohistiocytose (HLH)
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

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

### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in. 5.1 lid2h
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in. 5.1 lid2h
- 1.3 Vul het volgnummer en de titel van de dierproef in.
- | Volgnummer | Titel dierproef                               |
|------------|---|
| 1          | Muizenmodel voor Hemofagocyttaire Lymfocytose |

*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.3 van het format Projectvoorstel.*

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

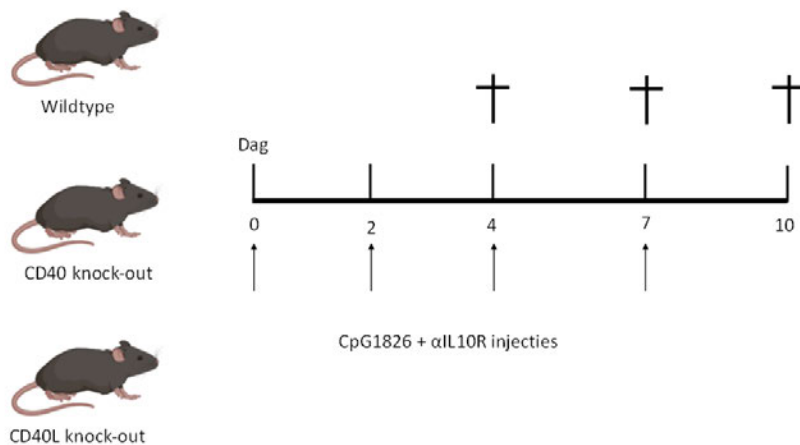
Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

Afhankelijk van het immuun checkpoint (o.a. CD40 of CD40L) of de betrokken mediators of signaleringsmoleculen die bestudeerd worden zullen transgene, knock-in, knock-out, of conditionele (bijvoorbeeld cel specifieke of induceerbare) muismodellen gebruikt worden. Deze muizen zullen vervolgens onderworpen worden aan het HLH model en zo kan de rol van het immuun checkpoint CD40 en de betrokken mediators of signaleringsmoleculen in kaart worden gebracht, waarna interventies onderzocht kunnen worden. Het effect van de kandidaat op HLH kan gemeten worden aan de hand van de ernst en de duur van de symptomen. De primaire uitkomstparameter is gewichtsverlies, welke al snel na inductie van HLH zichtbaar is en na ongeveer vier dagen stabiliseert (Albeituni *et al.*, Blood, 2019). De dieren verliezen veel gewicht vanwege onder andere een verminderde eetlust en verhoogd energieverbruik ten gevolge van de cytokine storm. Andere uitingen van een cytokine storm zoals koorts, anemie, hypotensie, of heptosplenomegalie ontstaan vaak parallel aan het gewichtsverlies, maar zijn geen specifieke prodromen voor het cytokine release syndroom en dus voor HLH. Gewichtsverlies is zeer geschikt als surrogaatparameter om een indicatie te krijgen van de ernst van het HLH ziekteverloop en het eventuele effect van een interventie. Aan de hand van pilot studies zullen wij op meerdere momenten bloed afnemen om ontstekingswaarden te meten en zullen wij bekijken of hier een geschikte uitleesparameter tussen zit waardoor wij onze wetenschappelijke vragen eerder in het ziekteproces kunnen beantwoorden en de ziekteduur, en daarmee het ongerief, te verkorten. Bij deze metingen zullen wij kijken naar een verandering in absolute aantallen immuun cellen en veranderingen in immuun cel activiteit, zoals een verhoogde cel proliferatie en verhoogde productie van cytokines. Voor een aantal analyses, zoals histologie, flow cytometrie, qPCR van de door HLH aangedane weefsels moeten de organen uitgenomen worden. In pilot studies zullen wij de muizen op verschillende tijdstippen doden, om te onderzoeken wat de ideale tijdslijn is waarin wij het ongerief van de muizen beperkt kunnen houden, maar wij wel onze wetenschappelijke vragen kunnen beantwoorden.

#### Aanpak:

**Pilot:** Voor de introductie van dit model in onze dierenfaciliteit zullen pilot proeven uitgevoerd moeten worden. In het kader van verfijning zullen wij meerdere pilots uitvoeren met als doel het ongerief voor de muizen te verminderen en/of de duur van het ongerief te verkorten. Allereerst gaan wij de rol van CD40 signalering in HLH bevestigen door wildtype muizen en CD40/CD40L muizen te onderwerpen aan het HLH ziektemodel. Alleen wanneer er een effect van CD40 en/of CD40L op het HLH verloop wordt gezien, zullen wij verdere experimenten uitvoeren. Deze kennis draagt tevens bij aan het behalen van het eerste subdoel van dit project, waarin wij onderzoeken via welke processen het immuun checkpoint CD40 en de daarbij betrokken mediators en signaleringsmoleculen de activatie van verschillende (immuun)celtypen in een HLH ziektemodel reguleren en wat het effect hiervan is op het ziekteverloop.

Daarnaast kijken wij in deze pilot experimenten of de duur van het ongerief verminderd kan worden. Dit doen wij door de muizen op verschillende tijdstippen na HLH inductie te doden, en vervolgens te bepalen of er een effect is van de CD40 of CD40L knock-out op HLH. Wanneer blijkt dat op een bepaald tijdstip 30% van de dieren het humane eindpunt bereikt van meer dan 20% gewichtsverlies zullen wij alle muizen doden en is dit het eindpunt van de pilot studie. Dieren die het humane eindpunt bereiken worden vervolgens wel gebruikt om de wetenschappelijke vragen te beantwoorden. Aan de hand van analyses op de uitgenomen weefsels en het meten van immunologische parameters zoals cytokine productie en immuun cel activatie markers wordt bepaald of de dieren de voor HLH karakteristieke cytokine storm hebben doorgemaakt. Op deze manier kunnen wij bepalen of het wel of niet noodzakelijk is om de dieren langer in het experiment te houden om onze wetenschappelijke vragen te beantwoorden. Samen zullen deze pilot studies bijdragen aan de verfijning van de experimenten.



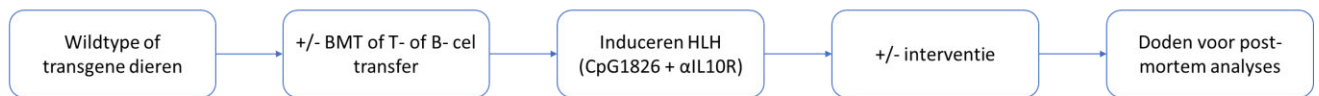
**Figuur 1 Mogelijke opzet pilot studies** In de pilot studies zullen wij eerst de rol van CD40 signalering in HLH bevestigen door gebruik te maken van een CD40 of CD40L knock-out muis. Daarnaast zullen wij in deze pilot experimenten bepalen op welk tijdstip de effecten van de CD40 of CD40L knock-out goed meetbaar zijn en het ongerief voor de muizen niet ernstiger dan strikt noodzakelijk laat zijn om onze wetenschappelijke vragen te beantwoorden. De tijdstippen van het doden van de muizen aangegeven in het figuur dienen enkel als voorbeeld, maar zal maximaal tot dag 10 zijn.

**Experimenten:** Afhankelijk van de conclusies die uit de pilot experimenten worden getrokken worden de muizen over een tijdsbestek van maximaal tien dagen meerdere malen intra peritoneaal geïnjecteerd met CpG1826 en  $\alpha$ IL10R voor de inductie van HLH (Albeituni *et al.*, Blood, 2019). HLH inductie kan eventueel worden voorafgegaan door een beenmergtransplantatie of T- of B cel transfer. Interventie injecties (i.p., i.v., of s.c.) kunnen gegeven worden met factoren die immuun checkpoints reguleren of hun signaaltransductie moduleren zoals small molecules, cytokines, siRNAs, en antilichamen, dit kan zowel voorafgaand of tijdens HLH inductie zijn. Tijdens en aan het einde van het experiment vinden bloedafnames plaats voor biochemische en immunologische bepalingen. Op maximaal tien dagen na de eerste HLH injectie worden de dieren gedood voor de analyse van (immuun)cellen. De experimentele flow is aangegeven in onderstaande figuren:

**Subdoel 1: Effect van het immuun checkpoint CD40 en daarbij betrokken mediators en signaleringsmoleculen op HLH**

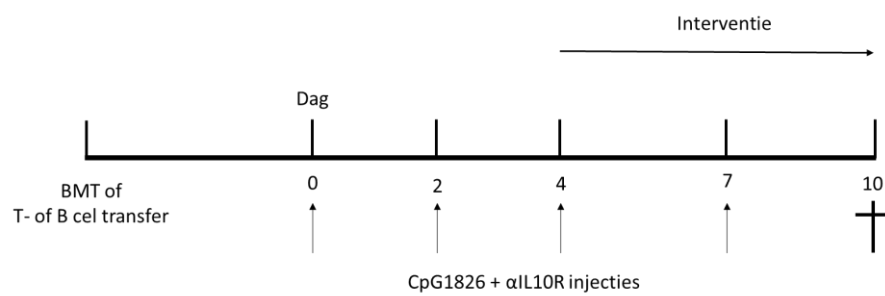


**Subdoel 2: Effect van het immuun checkpoint interventie op HLH**



**Figuur 2 Algemene experimenten flow** Om de wetenschappelijke vraag te beantwoorden maken wij gebruik van een experimentele flow zoals in het figuur weergegeven. Voor het experiment worden wildtype of transgene (bijvoorbeeld een cel-specifieke CD40 of CD40L knock-out) dieren gebruikt. Het is ook mogelijk dat de muizen een beenmergtransplantatie (BMT) of een T- of B- cel transfer ondergaan om een immuuncel-specifieke knock-out van het immuun checkpoint CD40 of een betrokken mediator of signaleringsmolecuul te verkrijgen zonder kruisingen van een muizenlijn. Vervolgens ondergaan de muizen HLH, waarbij ze geïnjecteerd worden met CpG1826 en  $\alpha$ IL10R. Bij het onderzoeken van een interventie die aangrijpt of het immuun checkpoint CD40 ontvangen de muizen injecties met de interventie gedurende het HLH ziekteproces. Maximaal tien dagen na de eerste injectie voor HLH inductie worden de muizen gedood voor post-mortem analyses.





**Figuur 3 Tijdslijn HLH ziekteproces** Afhankelijk van de pilot experimenten is dit een mogelijke tijdslijn voor de HLH experimenten. Op dag 0 krijgen de muizen de eerste CpG1826 en αIL10R injectie. Een interventie kan toegediend worden na inductie van HLH. Dit kan zoals hierboven aangegeven vanaf dag 4, wanneer naar alle waarschijnlijkheid HLH het meest ernstig is. Afhankelijk van de pilot studies kan er ook besloten worden de interventies eerder of later te starten.

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

#### Handelingen:

**Oorknip:** om dieren te kunnen identificeren zal, alleen indien nodig, in bepaalde experimenten muizen geoorknip worden om ze te kunnen identificeren.

**Beenmergtransplantatie (BMT):** Bij een beenmergtransplantatie wordt het beenmerg van de dieren vervangen door het gewenste beenmerg (geïsoleerd uit donordieren) om zo de effecten van het immuun checkpoint CD40 in de verschillende hematopoëtische cellen te kunnen bestuderen en wat het effect hiervan is op HLH. Voor de vervanging worden de acceptor dieren twee maal bestraald met maximaal 6 Gray en vervolgens i.v. geïnjecteerd met donor beenmerg (geïsoleerd zoals beschreven bij beenmergisolatie) en een herstel van zes weken (ongeveer matig voor de acceptor dieren; ongeveer licht voor donordieren).

**Beenmergisolatie:** Om beenmerg te isoleren worden de dieren gedood en worden de botten geïsoleerd voor cel isolatie.

**T- of B cel transfer:** Bij een T- of B cel transfer worden T cellen of B cellen, met bijvoorbeeld een deletie van het immuun checkpoint CD40 of de daarbij betrokken signaleringsmoleculen, uit de milt en/of lymfeklieren gehaald en worden vervolgens één keer per twee weken (zolang behouden de cellen hun activiteit) gedurende maximaal acht weken intraveneus ingespoten in muizen zonder T- of B cellen om zo de effecten van veranderingen in T- of B cellen te kunnen bestuderen.

**Dieet:** Nat gemaakt hoog energetisch dieet wordt tijdelijk gegeven wanneer de dieren verzwakt zijn door een voorgaande handeling (na bestraling voorafgaand aan BMT) en tijdens HLH inductie.

**HLH model:** Muizen (op een C57BL/6 achtergrond) worden i.p. geïnjecteerd met een TLR9 agonist (CpG1826) en een IL10 receptor antagonist ( $\alpha$ IL10R) (op dag 0, 2, 4 en 7) voor de inductie van HLH (Albeituni *et al.*, Blood, 2019). Tijdens bepaalde experimenten zal op om en nabij dag 2 en 7 bloed worden afgenomen. Door bloed op bijvoorbeeld dag 2 af te nemen, wat mogelijk net voor de start van de interventie is, kunnen wij beter inschatten wat het effect is van de interventie. Maximaal tien dagen na inductie worden de muizen gedood voor analyse van aantallen rode- en witte bloedcellen en bloedplaatjes, en specifieke typen immuun cellen en cytokines.

**Intraperitoneale (i.p.) toediening:** Het intra peritoneaal toedienen van geneesmiddelen, liganden of cellen door middel van een injectienaald. Frequentie hangt af van de proef, maar is maximaal twee keer per dag gedurende maximaal tien dagen. Twee keer per dag kan soms nodig zijn doordat er bij HLH sprake is van een zeer acute en zeer heftige inflammatoire respons is. Om de continue aanwas van activatie en de nieuw geproduceerde immuuncellen tegen te gaan, kan het soms nodig zijn om de dieren twee keer per dag te injecteren. Dit is het absolute maximum, maar wij verwachten de muizen minder vaak te moeten injecteren. Het precieze aantal injecties zal bepaald worden aan de hand van de farmacologische eigenschappen van het geneesmiddel en in overleg met de IvD.

**Subcutane (s.c.) toediening:** Het subcutaan toedienen van geneesmiddelen, liganden of cellen door middel van een injectienaald. Frequentie hangt af van de proef, maar is maximaal twee keer per dag gedurende maximaal tien dagen. Twee keer per dag kan soms nodig zijn doordat er bij HLH sprake is van een zeer acute en zeer heftige inflammatoire respons is. Om de continue aanwas van activatie en de nieuw geproduceerde immuuncellen tegen te gaan, kan het soms nodig zijn om de dieren twee keer per dag te injecteren. Dit is het absolute maximum, maar wij verwachten de muizen minder vaak te moeten injecteren. Het precieze aantal injecties zal bepaald worden aan de hand van de farmacologische eigenschappen van het geneesmiddel en in overleg met de IvD.

**Intraveneuze (i.v.) toediening:** Het intraveneus toedienen van geneesmiddelen, liganden of cellen door middel van een injectienaald. Frequentie hangt af van de proef, maar is maximaal één keer per dag gedurende maximaal tien dagen. Eén keer per dag kan soms nodig zijn doordat er bij HLH sprake is van een zeer acute en zeer heftige inflammatoire respons is. Om de continue aanwas van activatie en de nieuw geproduceerde immuuncellen tegen te gaan, kan het soms nodig zijn om de dieren dagelijks te injecteren. Dit is het absolute maximum, maar wij verwachten de muizen minder vaak te moeten injecteren. Het precieze aantal injecties zal bepaald worden aan de hand van de farmacologische eigenschappen van het geneesmiddel en in overleg met de IvD. Als er vaker dan één keer per dag een i.v. injectie nodig is kan een canule aangelegd worden in de jugularis veine of een Alzet pompje geplaatst worden.

**Plaatsen canule:** Wanneer een interventie één of meerdere keren per dag i.v. geïnjecteerd moet worden kan besloten worden om een canule te plaatsen in de vena jugularis of een Alzet pompje om de belasting voor de muis lager te houden. Vervolgens kan via deze canule de interventie worden toegediend. Deze procedure vindt plaats voor de inductie van HLH.

**Bloedafname:** Bloedmonsters worden genomen voor biochemische analyses (o.a. lipiden, cytokines) en immunologische analyses (o.a. flow cytometrie) met een maximaal van <10% van het circulerend volume per

twee weken. De volgende richtlijn zal worden gevolgd: <https://www.nc3rs.org.uk/mouse-decision-tree-blood-sampling>

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

Het aantal muizen per proef is gebaseerd op statistische berekeningen, rekening houdend met mogelijk uitval van dieren, alsook gebaseerd op eigen ervaring of ervaring van naaste collega's. Hierin wordt rekening gehouden met de hoeveelheden cellen/weefsel die nodig zijn voor de beschreven analyses. Het aantal proeven is gebaseerd op ervaring van de onderzoeksgroep, rekening houdend met de grootte van de onderzoeksgroep en verwachte aantallen experimenten die we willen en kunnen uitvoeren. Voor het uitvoeren van de powerberekening wordt mede gebruik gemaakt van software voor groeps-grootteberekeningen (bijv. nQuery, PiFace en GPower).

Wij willen verschillen tussen immuuncel populaties, cytokines, en activatie markers kunnen aantonen van minimaal 10%, wij verwachten dat dit effect biologisch relevant is. Uit eigen ervaring blijkt dat bij flow cytometrie een inter-groepvariatie is van circa 5-10% (afhankelijk van de exact gekozen uitkomstparameter). Als we uitgaan van een  $\alpha=0.05$ , een power van 80,  $\mu_1=1$ ,  $\mu=0.9$ ,  $\sigma=0.05-0.1$  komen wij uit op een groeps-grootte tussen de 6-17 muizen, we rekenen verder met een gemiddelde van 10 muizen per groep. In de pilot studies zullen wij de proefopzet zodanig proberen te optimaliseren dat niet meer dan 30% van de muizen het humane eindpunt bereikt. Als de wetenschappelijke vragen op een eerder tijdstip beantwoord kunnen worden, zullen namelijk minder dieren het HEP (>20% gewichtsverlies) bereiken. Als uit pilots blijkt dat een later tijdstip nodig is, zullen meer dieren het HEP bereiken. Alle muizen die een HEP bereiken worden geanalyseerd om zo toch een beeld te krijgen van het ziekteverloop. Om er zeker van te zijn dat gemiddeld 10 muizen per groep het einde van het experiment halen, houden wij rekening met een uitval tot 50%. Per groep zullen wij dus maximaal 20 muizen gebruiken, maar in de pilot experimenten zullen wij de uitval van muizen proberen te verminderen waardoor we uiteindelijk kleinere groepen kunnen gebruiken.

## B. De dieren

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

Volgnr.	Diersoort	Herkomst	Levensstadium	Aantal	Geslacht	Genetisch gewijzigd	Stam
6l	Muizen	Eigen fok of commerciële fokkers	6-24 weken	1222	Man en Vrouw	Ja	C57BL/6

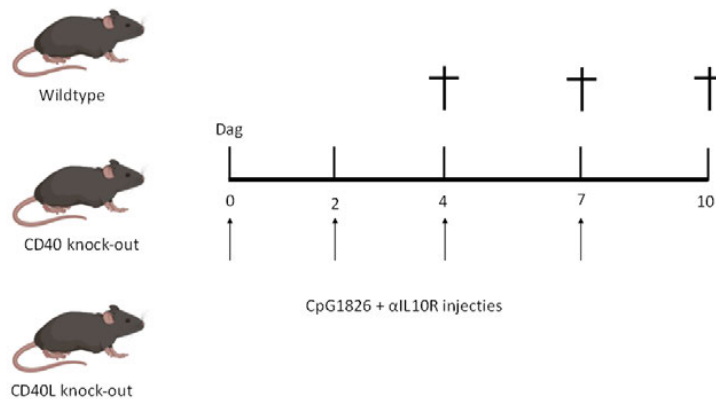
Onderbouw de bovengenoemde keuzes.

Diersoort	Muizen hebben de voorkeur binnen dit project omdat de groep zeer uitgebreide ervaring heeft met muizen en dit een goed en geaccepteerd model is voor hemofagocytair lymfocytose (Albeituni <i>et al.</i> , Blood, 2019).
Herkomst	Een deel van de muizen, bijvoorbeeld wildtype muizen, kan worden aangeschaft bij commerciële leveranciers. Muizen met specifieke genetische achtergrond zullen in veel gevallen uit eigen fok komen of via samenwerkingsverbanden worden verkregen.
Levensstadia	Afhankelijk van de vraagstelling worden dieren met een bepaalde leeftijd gebruikt. In de meeste gevallen starten de experimenten als de dieren een leeftijd van 6-24 weken hebben.

In de pilot experimenten gaan wij wildtype dieren vergelijken met transgene dieren (CD40 en CD40L knock-out). Per groep worden in de pilot experimenten 15 dieren gebruikt. Als controle nemen wij per genotype een groep mee die geen HLH krijgt, deze groep bestaat uit 10 dieren aangezien hier minder uitval wordt verwacht. Voor dit onderdeel van de pilot studie verwachten wij **75 muizen** te gebruiken (3 x 15 muizen/genotype (HLH) + 3 x 10 muizen/genotype (controle)).

Om de proefopzet te verfijnen door de duur van het experiment proberen te verkorten zullen wij de dieren op bijvoorbeeld drie verschillende tijdstippen na HLH inductie doden (zie figuur). In totaal verwachten wij hiervoor 45 dieren (15 x 3 tijdstippen) per genotype (wildtype/CD40/CD40L) nodig te hebben, voor drie genotypen typen zijn dit **135 muizen**.

Wanneer HLH inductie vooraf wordt gegaan aan een beenmergtransplantatie of een T- of B-cel transfer zullen wij dit door middel van een pilot studie optimaliseren, voor twee pilot studies zijn hiervoor maximaal **72 muizen** nodig (wildtype + wel/geen BMT óf T/B transfer) en twaalf donordieren (4 x 15 dieren + 12). Voor de pilot experimenten zijn in totaal **maximaal 272 muizen** nodig.



Aantal

Na de pilot experimenten verwachten wij drie proeven per jaar te doen, waarbij gevarieerd kan worden met de targetgenen. In deze experimenten worden twee of meerdere genotypes of interventies (bijvoorbeeld wildtype, transgeen, siRNA, small molecules) met elkaar vergeleken en hiervoor zijn, rekening houdend met maximaal 50% die een HEP bereikt, twintig muizen per groep nodig, in totaal dus gemiddeld 180 muizen per jaar uitgaande van drie groepen die met elkaar vergeleken worden per experiment. Tijdens de pilot experimenten proberen wij de proefopzet zodanig te optimaliseren dat minder dan 50% een HEP eindpunt bereikt. Daarnaast zullen de muizen die een HEP eindpunt bereiken wel gebruikt worden in de analyse en zullen op deze manier wel bijdragen aan het beantwoorden van onze wetenschappelijke vragen. Over een periode van vijf jaar verwachten wij **maximaal 900 muizen**.

Daarnaast zijn er donordieren nodig voor de BMT en/of de T- of B cel transfers, waarbij wordt uitgegaan van het feit dat één donordier voldoende beenmerg of T- of B cellen oplevert voor ongeveer vijf acceptor dieren. Wij verwachten dat er bij één van de drie proeven per jaar een BMT of T- of B cel transfer zal plaatsvinden. Totaal zijn er maximaal 200 acceptor dieren, delen door 5 (één donor per vijf dieren) = **40 donor dieren** voor vijf jaar.

Totaal: **maximaal 1222 dieren** voor vijf jaar

Geslacht

Er is geen voorkeur voor mannelijke of vrouwelijke dieren bij dit ziektemodel.

Genetisch gewijzigd	Zowel wildtype als genetisch gewijzigde dieren worden gebruikt, waar mogelijk worden voor de controles wildtype nakomelingen gebruikt. Om de rol van een immuun checkpoint <i>in vivo</i> te onderzoeken zal het in veel gevallen nodig zijn om hiervoor genetisch gemodificeerde muizen te gebruiken, waarbij bijvoorbeeld een deletie is van de kandidaat immuun checkpoint. We verwachten niet dat er lijnen met constitutioneel ongerief ('fok met ongerief') gebruikt zullen worden. De huisvesting binnen de dierverblijven is zodanig dat immuungecompromiteerde dieren geen schade ondervinden van hun genotype. Momenteel is het een discussiepunt of deze lijnen toch onder een 'fok met ongerief'-vergunning gefokt moeten worden. Indien deze genetische lijnen toch onder een vergunning gefokt moeten worden, zal dit onder een generieke vergunning van het onderzoeksinstituut gefokt (gaan) worden.
Stam	Wij gebruiken C57BL/6 muizen, waarvan bekend is dat ze geschikt zijn voor inductie van HLH (Albeituni <i>et al.</i> , Blood, 2019). Ook heeft onze onderzoeksgroep al zeer veel ervaring met deze stam.

### C. Huisvesting en verzorging

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

Ja

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

Dieren die gecannuleerd worden, moeten alleen gehuisvest worden om te voorkomen dat de cannules doorgebeten worden door kooigenoten.

### D. Pijn en welzijnsaantasting

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

Nee >

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

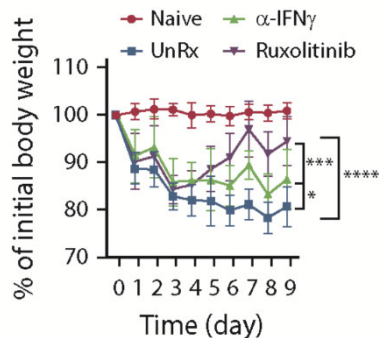
Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

Operaties voor het plaatsen van een canule in de vena jugularis of het plaatsen van een Alzet pompje zal onder volledige anesthesie worden uitgevoerd. De fysiologische status van de muizen wordt tijdens de gehele procedure goed gemonitord en wanneer nodig wordt de dosis anesthesie omhoog of omlaag aangepast.

Verdere pijnstilling tijdens HLH wordt niet gebruikt aangezien dit onverenigbaar is met de proefopzet. De meeste pijnstilling werkt ontstekingsremmend en zal dus ook de HLH-geassocieerde ontsteking remmen. We kiezen ervoor om geen opiaten als pijnstilling te geven, omdat wij de bijwerkingen van het gebruik van opiaten (obstipatie, misselijkheid en sufheid) niet vinden opwegen tegen de pijn die de dieren ervaren vanwege de HLH.

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

1. BMT: verminderde eetlust en gewichtsverlies
2. De dieren kunnen stress ondervinden, irritatie, en pijn ten gevolge van het injecteren van de interventies.
3. HLH specifiek ongerief: ernstig gewichtsverlies, algehele malaise, en anemie. Een gewichtsverlies van 20% is onderdeel van het ziektebeloop tijdens HLH en de dieren zullen het gehele experiment ondergewicht houden (HEP is maximaal 20% gewichtsverlies ten opzichte van het gewicht aan de start van het experiment). De eerste dagen na inductie van HLH vertonen de muizen het meeste gewichtsverlies, dit stabiliseert daarna rond de 80% van het startgewicht van de muis. (Albeituni *et al.*, Blood, 2019, figuur 1B (zie hieronder)).



Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

1. Na de BMT is er tijdelijke uitputting van het beenmerg en milde stralingschade waardoor dieren darmschade krijgen.
2. Toediening (s.c., i.p. of i.v) van interventie die immuun checkpoint regulatoren moduleren. De dieren worden hierbij regelmatig geïnjecteerd.
3. De cytokine storm en acute immuun activatie induceert direct gewichtsverlies. De muizen hebben verminderde voedselinname door algehele malaise en een verhoging van het energieverbruik ten gevolge van acute inflammatoire conditie, samen draagt dit bij aan ernstig gewichtsverlies.

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

1. Gedurende maximaal drie weken na BMT worden de dieren gevoerd met hoogenergetisch natgemaakt voer.
2. Maximale volumina worden bepaald op basis van beschikbare literatuur (Diehl *et al.*, 2001). De dieren worden goed gemonitord.
3. De dieren worden goed gemonitord en de humane eindpunten worden toegepast zodra er meer gewichtsverlies is dan vooraf verwacht had kunnen worden. De dieren worden tijdens HLH gevoerd met hoogenergetisch voer om het gewichtsverlies te beperken.

## E. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag F.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

**A. Beenmergtransplantatie:** Verminderde activiteit, onverzorgde vacht, houding of enige andere afwijking zoals beschreven in de SOP van de faciliteit evenals gewichtsverlies >15% ten opzichte van het hoogst gemeten of >10% ten opzichte van het vorige weegpunt over een periode van twee dagen.

**B. Ziekte score voor het HLH model:**

Om vast te stellen of muizen ongerief ondervinden observeren we het gedrag en het gewicht van de muis. Deze observaties resulteren in een ziekte score die de basis zijn voor de humane eindpunten.

0: gezonde muis

1: Onverzorgde vacht en verminderde activiteit, minder dan 10% gewichtsverlies

2:Recht opstaande haren (pilo-erectie), minder actief gedrag, gebogen houding, 10-20% gewichtsverlies.

3: Pilo-erectie, inactief gedrag, gebogen houding, meer dan 20% gewichtsverlies.

Muizen zullen tijdens het experiment ernstig gewichtsverlies doormaken, dit is een beschreven beeld in het ziekteverloop van HLH. Het gewichtsverlies kan oplopen tot 20% ten opzichte van het startgewicht van de muis en is een goede surrogaat parameter voor andere uitingen van HLH zoals anemie, hypotensie en hepatosplenomegalie. Muizen met méér dan 20% gewichtsverlies ten opzichte van het startgewicht, ziektescore 3, zullen uit de studie gehaald worden, omdat dit als humaan eindpunt is gedefinieerd.

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

A: 2%

B: 50% (In de pilot experimenten proberen wij het diersmodel te verfijnen waardoor dit percentage lager zal uitvallen. Daarnaast is het bereiken van een HEP ook een wetenschappelijk eindpunt, deze dieren worden wel in de analyse worden gebruikt en moeten dus niet als 'uitval' gezien worden).


**F. Classificatie van ongerief**

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

Procedure	Stam	Geslacht	Aantal dieren	Cumulatief ongerief	Handelingen die leiden tot ongerief
Pilot (HLH)	WT/TG	M/V	240	Ernstig	Oorknip (licht), BMT (matig), T-of B cel transfer (matig), inductie HLH (ernstig), bloedafname (licht), doden (licht)
Pilot (Placebo)	WT/TG	M/V	30	Licht	Oorknip (licht), injecties placebo (licht), bloedafname (licht), doden (licht)
Experimenten	WT/TG	M/V	900	Ernstig	Oorknip (licht), BMT (matig), T-of B cel transfer (matig), operatie voor zetten van canulatie/Alzet pompje (matig), inductie HLH (ernstig), interventie injecties (i.p., i.v., s.c.) (matig), bloedafname (licht), doden (licht)
Beenmerg donoren	TG	M/V	52	Licht	Doden (licht)
<b>Totaal</b>			1222	Licht: 82 Matig: 0 Ernstig: 1140	

## G. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging	<p>HLH is een complexe immuun ziekte waarbij het met name mis gaat bij de 'communicatie' tussen de verschillende cellen in het immuunsysteem en de aangedane weefsels. Diermodellen zijn nodig om zowel de interactie tussen de immuuncellen te kunnen bestuderen, alsmede het effect hiervan op de door HLH aangedane weefsels. Parallel aan de studies met muismateriaal worden ook studies met humane cellen gedaan om in een vroeg stadium een relatie van bevindingen in de humane situatie te kunnen leggen. In patiënten materiaal zoals bloed kunnen wij ontstekingswaarden (o.a. cytokine productie, en immuuncel activatie) bepalen, om te onderzoeken of deze overeen komen met ons muismodel.</p>
Vermindering	<p>5.1 lid2h</p>  <p>5.1 lid2h, 5.1 lid2e</p> <p>. Hierdoor weten wij dat CD40 belangrijk is in de door HLH aangedane cel processen, wat de kans van slagen van dit project groot maakt. Er zijn al zeer goede <i>in vitro</i> karakterisaties gedaan in cel modellen (cellijnen, primaire muiscellen en humane cellen), waardoor wij in dit project geen extra muizen hoeven te gebruiken voor <i>in vitro</i> experimenten om de rol van CD40, en de daarbij betrokken mediators en signaleringsmoleculen, te onderzoeken. Hierdoor kunnen wij in dit project keuzes maken voor specifieke aanpakken gebaseerd op <i>in vitro</i> studies, en dit leidt tot specifiekere proeven en minder diergebruik.</p> <p>Er wordt ook deels gewerkt met beenmergtransplantatie studies waarbij door het transplanteren van beenmerg uit één enkele muis het immuunsysteem van vijf muizen wordt gerepopuleerd. Dit leidt tot een sterke vermindering van het aantal dieren vergeleken met het aantal dieren dat nodig zou zijn wanneer de juiste genotype verkregen zouden moeten worden door middel van kruisingen.</p> <p>Power berekeningen worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken. Bevindingen uit de literatuur (Albeituni <i>et al.</i>, Blood, 2019) worden meegenomen bij de power berekeningen. We hebben nu op basis van bekende gegevens een poweranalyse gedaan. Voor ieder experiment zal een nieuwe poweranalyse gedaan worden zodat het experiment met het minimum aantal dieren uitgevoerd wordt waarmee nog een betrouwbaar resultaat verkregen kan worden. Door de voorafgaande pilots om het model te optimaliseren, hopen we ook het aantal dieren dat gebruikt gaat worden in de experimenten te verminderen.</p>



Verfijning	<p>Aan de hand van meerdere pilot experimenten proberen wij de proefopzet te verfijnen. Dit doen wij onder andere door de muizen op verschillende tijdstippen te doden na HLH-inductie, en op deze manier te kijken of wij op een eerder tijdstip al het effect van een interventie op het HLH-ziekteproces kunnen zien. Daarnaast is het bereiken van een HEP óók een wetenschappelijk eindpunt. De dieren die het einde van het experiment niet halen vanwege het bereiken van een HEP zullen gebruikt worden voor post-mortem analyses. Hierdoor worden deze muizen toch gebruikt om meer inzicht te verkrijgen in de pathogenese van deze aandoening.</p> <p>Waar mogelijk zal het aantal handelingen van de muis, met name de injecties, zo laag mogelijk worden gehouden. Er wordt de voorkeur gegeven aan geneesmiddelen die met een minimale frequentie worden gegeven, maar vanwege de farmacologische eigenschappen, bijvoorbeeld een hoge halfwaardetijd of slechte oplosbaarheid, van een geneesmiddel zal er soms vaker geïnjecteerd moeten worden. Wij zullen de dieren niet over een langere periode injecteren dan strikt noodzakelijk. Wanneer wij de dieren meer dan één keer per dag intraveneus moeten injecteren zullen wij een canuleren of een Alzet pomp gebruiken, om het ongerief lager te houden. Hierbij heeft het plaatsen van een Alzet pomp de voorkeur, aangezien deze dieren niet individueel gehuisvest hoeven te worden.</p> <p>Een deel van de muizen zal een genetische modificatie hebben of een interventie krijgen, waardoor het ziektebeeld minder ernstig wordt. Hierdoor zal het uiteindelijke ongerief bij deze muizen ondanks de inductie van HLH lager zijn.</p> <p>Mannelijke muizen worden om vechten te voorkomen in groepjes van drie tot vier muizen gehuisvest en krijgen twee huisjes. Ook zullen de transplantatie dieren indien nodig met hoogenergetisch week gemaakt voer gevoed worden.</p>
------------	---

Zijn er nadelige milieueffecten te verwachten?

Nee

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

## H. Hergebruik

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

Nee, ga verder met vraag I.

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

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

Nee

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

## I. Herhaling

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

Niet van toepassing

### J. Plaats waar de dierproef wordt uitgevoerd

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

Nee > Ga verder met vraag K.

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

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

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

Worden de dieren gedood?

Nee > Beschrijf de bestemming van de dieren.

Ja > Geef aan waarom de dieren worden gedood.

Er dienen cellen en/of organen uitgenomen te worden ten einde verder wetenschappelijke analyses.

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

Nee > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.

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

Nee > Beschrijf de dodingsmethode

Overdosis anesthesie of kooldioxide, gevolgd door cervicale discolatie of hartpunctie.

Ja > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.

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

**Format Niet technische samenvatting**

Let op: bij gebruik van dit word-format dient uiteindelijk alsnog het Excel-format te worden ingevuld voordat uw aanvraag vergund kan worden (zie Procesbeschrijving word-document NTS)

## Tab NTS

Country	NL
Language	NI
EU submission	<input checked="" type="checkbox"/> yes <input type="checkbox"/> no
Title of the project	Op zoek naar een behandeling voor de acute immuunziekte hemofagocyttaire lymfohistiocytose
NTS identifier	Deze wordt door de CCD ingevuld
NTS national identifier	Deze wordt door EC ingevuld
Duration of the project	60 (in months)
Keywords	
Keyword 1	Secundaire hemofagocyttaire lymfohistiocytose
Keyword 2	Immuunziekte
Keyword 3	Immuun checkpoint
Keyword 4	Macrofagen
Keyword 5	

**Purpose(s) of the project****Objectives of the project**

Secundaire hemofagocyttaire lymfohistiocytose (HLH) is een zeldzame en levensbedreigende aandoening die zowel kinderen als volwassenen treft. Helaas werken de huidige behandelingen niet goed genoeg en komen veel patiënten te overlijden in de eerste dagen van HLH. In dit project wordt fundamenteel en translationeel onderzoek gecombineerd om een nieuwe behandelstrategie voor patiënten met HLH te ontwikkelen.

De macrofaag, een specifiek type afweercel, heeft een centrale rol in het ontstaan van HLH. Tijdens secundaire HLH is er sprake van overactieve macrofagen, veroorzaakt door bijvoorbeeld een infectie, auto-immuunziekte of kanker (primaire HLH wordt veroorzaakt door een erfelijke oorzaak). Lichaamseigen bloedcellen worden 'opgegeten' en andere afweercellen worden juist overmatig geactiveerd. Daarnaast worden er teveel schadelijke ontstekingsstoffen geproduceerd. Uiteindelijk ontstaat er een vicieuze cirkel die zich kenmerkt door een levensbedreigende en ongecontroleerde ontstekingsreactie. Patiënten worden hierdoor ernstig ziek en komen vaak te overlijden doordat meerdere organen niet meer functioneren. Het afremmen van de overactieve macrofagen is dan ook een veelbelovende behandelstrategie voor HLH.

De activiteit van macrofagen wordt onder normale omstandigheden strikt gereguleerd door eiwitten op het oppervlak van de cel om te veel activiteit te voorkomen. Eén van de belangrijkste eiwitten op de macrofaag is CD40. Dit stimulerende eiwit zorgt ervoor dat de macrofagen meer ontstekingsstoffen produceren en op hun beurt weer andere afweercellen activeren. Eerder onderzoek van onze onderzoeksgroep heeft aangetoond dat het remmen van CD40 in macrofagen een effectieve manier is om activatie van de macrofaag te voorkomen. Op basis van deze bevindingen hebben wij een nieuwe remmer van CD40 in macrofagen ontwikkeld. Dit mogelijke medicijn, genaamd trafinib, voorkomt overactiviteit van macrofagen en vermindert de productie van ontstekingsstoffen. In diermodellen heeft trafinib een gunstig effect op verschillende ontstekingsziekten, zoals aderverkalking, multiple sclerose (MS), en ernstige bloedvergiftiging (sepsis). Omdat trafinib een veelbelovende en krachtige remmer van macrofaag activiteit is willen wij in dit project onderzoeken of dit medicijn ook gebruikt kan worden in de behandeling van HLH.

*Describe the objectives of the project (for example, addressing certain scientific unknowns, of scientific or clinical needs). Compulsory! Maximum length is 2500 characters*

#### Potential benefits likely to derive from this project

Per jaar krijgen er in Nederland ongeveer 50-100 mensen HLH, waarbij 8-54% komt te overlijden binnen een paar dagen door een gebrek aan een goede behandeling. Daarnaast zijn patiënten in de eerste dagen van HLH vaak te ziek om optimale behandeling van de onderliggende ziekte, vaak kanker of een infectie, te krijgen. Aanvullende behandelingen van HLH zijn dringend nodig om de prognose van patiënten met deze zeldzame aandoening te verbeteren. Op de korte termijn willen wij meer inzicht verkrijgen in het effect van het remmen van CD40 op het ziekteverloop van HLH in muizen. Hierbij kijken wij ook wat het effect is van CD40 remming op de (immuun)cel processen die betrokken zijn bij HLH. Op de langere termijn kan deze kennis bijdragen aan de ontwikkeling van een nieuwe behandeling bij HLH, gericht op CD40 remming. Wanneer blijkt dat de CD40-remmer trafinib een mogelijke behandelstrategie is voor HLH in muizen, kan de stap worden gemaakt om trafinib in een klinische studie bij HLH patiënten te onderzoeken.

*What are the potential benefits likely to derive from this project? Explain how science could be advanced, or humans, animals or environment may ultimately benefit from the projects. Where applicable, differentiate between short-term benefits (within the duration of the project) and long-term benefits (which may accrue after the project is finished) . Compulsory! Maximum length is 2500 characters*

#### Predicted harms

##### In what procedures will the animals typically be used

Om de muizen als ziektemodel te kunnen gebruiken moeten wij de immuunziekte opwekken, dit gebeurt met meerdere injecties. Verder kunnen de muizen geïnjecteerd worden met bijvoorbeeld een medicijn en er zal ook bloed afgenomen worden. Soms is het nodig om muizen te bestralen zodat ze een beenmergtransplantatie kunnen krijgen, op deze manier kunnen wij de muizen een "nieuw" immuunsysteem geven. Aan het einde van het experiment zullen de muizen gedood worden.

*In what procedures will the animals typically be used (for example, injections, surgical procedures)? Indicate the number and duration of these procedures. Compulsory! Maximum length is 2500 characters*

##### Expected impacts/adverse effects on the animals

Een gevolg van HLH is dat de muizen zich erg ziek voelen, veel gewicht verliezen, en bloedarmoede ontwikkelen. Ernstig gewichtsverlies is onderdeel van de ziekte en is een gevolg van een verhoogd energie verbruik om de ziekte te bestrijden en de dieren voelen zich ziek waardoor ze minder eten. Daarnaast zullen de dieren stress ondervinden doordat ze meerdere malen geïnjecteerd moeten worden en er ook bloedafnames plaatsvinden. Aan de hand van pilot studies zullen wij proberen de duur van het experiment, en daarmee het ongerief, zo kort mogelijk te laten duren. Het maximum aantal dagen dat de dieren de ziekte doormaken is tien.

*What are the expected impacts/adverse effects on the animals for example pain, weight loss, inactivity/reduced mobility, stress, abnormal behaviour, and the duration of those effects? Compulsory! Maximum length is 2500 characters*

#### Reasons for the planned fate of the animals after the procedure

Aan het eind van het experiment worden de dieren gedood, om weefsel voor verdere wetenschappelijke analyse te kunnen verkrijgen.

*Please provide reasons for the planned fate of the animals after the procedure. Compulsory! Maximum length is 2500 characters*

### Application of the Three Rs

#### 1. Replacement

HLH is een ingewikkelde immuun ziekte waarbij het met name mis gaat bij de 'communicatie' tussen de verschillende cellen in het immuunsysteem. Een diermodel is nodig om zowel de communicatie tussen de immuuncellen te kunnen bestuderen, alsmede het effect hiervan op de organen en weefsels die door HLH worden aangetast.

Tegelijkertijd met deze muizenstudie gaan wij ook studies met cellen van mensen uitvoeren. Hierdoor kunnen wij in een vroeg stadium al zien of de resultaten die wij krijgen uit de muizenstudie overeen komen met de situatie bij HLH patiënten. In patiëntmateriaal zoals bloed kunnen wij ook ontstekingswaarden (o.a. ontsteking stoffen, en immuuncel activatie) bepalen, zodat deze informatie verder onderzocht kan worden in het muismodel.

*State which non-animal alternatives are available in this field and why they cannot be used for the purposes of the project. Compulsory! Maximum length is 2500 characters*

#### 2. Reduction

Ons onderzoekslab heeft al zeer veel ervaring met CD40, waardoor al veel kennis beschikbaar is over de effecten van CD40 op verschillende celtypen. Hierdoor weten wij dat CD40 een belangrijke rol speelt in macrofaag activatie, de immuuncel die een centrale rol speelt in HLH. Deze eerder opgedane kennis over het effect van CD40 op macrofagen, maar ook op andere celtypen, kunnen wij inzetten in dit project waardoor wij minder dieren nodig hebben.

Door pilot studies uit te voeren om de proefopzet zo veel mogelijk te optimaliseren, hopen wij dat het aantal dieren dat nodig is voor de experimenten te verminderen. Daarnaast streven wij ernaar om zoveel mogelijk metingen te doen in één proefdier. We berekenen met statistische methoden hoeveel muizen er nodig zijn om een betrouwbaar antwoord te krijgen zodat er niet teveel dieren worden gebruikt.

Door gebruik te maken van een beenmergtransplantatie voorkomen we dat er eerst veel muizen met elkaar gefokt moeten worden om een ander immuunsysteem te krijgen.

*Explain how the numbers of animals for this project were determined. Describe steps that have been taken to reduce the number of animals to be used, and principles used throughout the project to minimise the number of animals used consistent with scientific objectives. Those practices may*

*include e.g. pilot studies, computer modelling, sharing of tissue and reuse. Compulsory! Maximum length is 2500 characters*

### 3. Refinement

Aan de hand van meerdere pilot experimenten proberen wij de proefopzet te verfijnen. Dit doen wij onder andere door te onderzoeken of wij op een eerder tijdstip al het effect van een behandeling op het HLH ziekteproces kunnen zien. Hierdoor zullen de muizen minder lang ernstig ziek zijn. De dieren die het einde van het experiment niet halen vanwege het bereiken van een humaan eindpunt zullen wél gebruikt worden om meer inzicht te verkrijgen in het ontstaan van HLH.

Waar mogelijk zal het aantal handelingen van de muis, met name de injecties, zo laag mogelijk worden gehouden. Er wordt de voorkeur gegeven aan geneesmiddelen die minder vaak gegeven hoeven te worden, maar vanwege bepaalde eigenschappen van een medicijn, zoals een snelle afbraak of slechte oplosbaarheid, zal er soms vaker geïnjecteerd moeten worden. Wij zullen de dieren niet over een langere periode injecteren dan strikt noodzakelijk. Wanneer wij de dieren meer dan één keer per dag in een bloedvat moeten injecteren zullen wij een buisje plaatsen op het bloedvat of een pompje gebruiken, zodat de dieren minder last ondervinden van de injecties. Hierbij heeft het plaatsen van een pompje de voorkeur, omdat dieren dan niet alleen geplaatst hoeven te worden.

Een deel van de muizen zal een genetische aanpassing hebben of een behandeling krijgen, waardoor het ziektebeeld minder ernstig wordt. Hierdoor zal het uiteindelijke ongerief bij deze muizen ondanks dat ze HLH hebben, lager zijn.

Mannelijke muizen worden om vechten te voorkomen in groepjes van drie tot vier muizen gehuisvest en krijgen twee huisjes. Ook zullen de beenmergtransplantatie dieren en de dieren die HLH hebben indien nodig nat gemaakt energierijk voer krijgen, zodat ze op een makkelijkere manier voldoende voedsel binnenkrijgen.

*Give examples of the specific measures (e.g., increased monitoring, post-operative care, pain management, training of animals) to be taken, in relation to the procedures, to minimise welfare costs (harms) to the animals. Describe the mechanisms to take up emerging refinement techniques during the lifetime of the project. Compulsory! Maximum length is 2500 characters*

### Explain the choice of species and the related life stages

Muizen hebben de voorkeur binnen dit project omdat onze onderzoeksgroep zeer uitgebreide ervaring heeft met muizen en dit een goed en geaccepteerd model is voor HLH. Wij werken met volwassen muizen vanaf een leeftijd van zes weken, het experiment wordt ingezet wanneer de muizen tussen de zes en 24 weken oud zijn.

*Compulsory! Maximum length is 2500 characters*

### Tab Purpose of the project

Basic research: Immune System [PB7]

Choose a purpose

Choose a purpose

Choose a purpose

Choose a purpose

**Tab Expected harms**

*What species and numbers of animals are expected to be used? What are the expected severities and the numbers of animals in each severity category (per species)?*

Estimated numbers per severity				
<i>Please fill in all categories for selected species with whole numbers (0 or higher)!</i>				
Species	Non-recovery	Mild	Moderate	Severe
Mice ( <i>Mus musculus</i> ) [A1]		82		1140
Choose a species				
Choose a species				
Choose a species				
Choose a species				
Choose a species				
Choose a species				
Choose a species				
Choose a species				
Choose a species				
Choose a species				
Choose a species				
Choose a species				
Choose a species				

**Tab Fate of animals kept alive**

*What will happen to the animals kept alive at the end of the procedure?*

Estimated numbers per severity			
<i>Please fill in all categories for selected species with whole numbers (0 or higher)!</i>			
Species	Reused	Returned	Rehomed
Choose a species			
Choose a species			
Choose a species			
Choose a species			
Choose a species			
Choose a species			
Choose a species			
Choose a species			
Choose a species			
Choose a species			
Choose a species			
Choose a species			
Choose a species			
Choose a species			

---

**Van:** info@zbo-ccd.nl  
**Verzonden:** vrijdag 28 januari 2022 16:27  
**Aan:** 5.1 lid2h  
**Onderwerp:** Verzoek om advies over projectvergunningsaanvraag AVD 5.1 lid2h 202215811  
**Bijlagen:** DBC344\_Aanvraag\_Projectvergunning.docx; DBC344\_Bijlage\_1.docx; DBC344\_Projectvoorstel.docx; DBC344\_Word\_format\_NTS.docx

Geachte leden van 5.1 lid2h

De Centrale Commissie Dierproeven (hierna: CCD) verzoekt u in het kader van vergunningverlening advies te geven over het project met als titel: "De rol van het immuun checkpoint eiwit CD40 in hemofagocyttaire lymfocytose" en aanvraagnummer: AVD 5.1 lid2h 202215811.

Uw commissie wordt verzocht op grond van artikel 10.a.2 van de Wet op de dierproeven de aanvraag te beoordelen en een ethische toetsing uit te voeren waarbij wordt afgewogen of de doelstelling van het project, de verwachte voordelen voor mens, dier of milieu en de haalbaarheid van de doelstellingen, het gebruik van dieren en de schade die zal worden toegebracht aan de dieren in de vorm van lijden, pijn en angst kan rechtvaardigen.

Graag ontvangen wij van u bericht dat deze e-mail goed is ontvangen en wanneer u dit advies in de vergadering gaat bespreken.

Voor het in te dienen advies dient de DEC gebruik te maken van de meest actuele versie van het op de website van de CCD gepubliceerde Format DEC-advies en de toelichting daarbij. U dient deze aanvraag vertrouwelijk te behandelen. Voor de communicatie met de CCD dient u gebruik te maken van FileSecure.

De CCD verzoekt u uiterlijk binnen 20 werkdagen, na 28-01-2022, uw advies bij de CCD in te dienen. Indien de aanvraag door uw commissie niet in behandeling kan worden genomen, dient u dit per ommekeer per e-mail aan de CCD te melden.

Ingeval uw commissie tussentijds aanvullende informatie wil inwinnen bij de aanvrager wordt de termijn opgeschort en geeft u in uw advies aan wanneer dit is geweest. Opschorting van de adviestermijn vindt niet plaats ingeval u ten behoeve van uw advies een onafhankelijk extern expert raadpleegt. Mocht u verwachten door een andere reden dan opschorting uw advies later dan 20 werkdagen na 28-01-2022 bij de CCD in te dienen, dan verzoeken wij u dit direct aan de CCD te melden.

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

Met vriendelijke groet,  
Centrale Commissie Dierproeven

[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

T: 0800 789 0789  
E: info@zbo-ccd.nl



## 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 AVD5.1 lid2h 202215811
2. Titel van het project De rol van het immuun checkpoint eiwit CD40 in secundaire hemofagocyttaire lymfohistiocytose
3. Titel van de NTS Op zoek naar een behandeling voor de acute immuunziekte hemofagocyttaire lymfohistiocytose
4. Type aanvraag:
  - nieuwe aanvraag projectvergunning
  - wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
  - naam DEC
  - telefoonnummer contactpersoon
  - e-mailadres contactpersoon
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
  - ontvangen door DEC 28 januari 2022
  - aanvraag compleet
  - in vergadering besproken 3 februari 2022
  - anderszins behandeld
  - termijnonderbreking(en) van / tot 3 februari 2022 t/m 7 maart en van 10 maart t/m 9 mei, van 11 tot 13 mei en van 23 mei t/m 30 mei
  - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
  - aanpassing aanvraag
  - advies aan CCD 7 juni 2022
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 bijlage) zijn in een traject voorafgaand aan de indiening ervan bij de CCD 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 n.v.t.
- Datum
  - Plaats
  - Aantal aanwezige DEC-leden
  - Aanwezige (namens) aanvrager
  - Gestelde vraag / vragen
  - Verstrek(e) antwoord(en)
  - Het horen van de aanvrager heeft wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag
9. Correspondentie met de aanvrager 3 februari 2022
- Datum
  - Gestelde vraag/vragen
- De DEC heeft verduidelijking gevraagd over:

### **Projectvoorstel:**

1. De DEC mist de onderbouwing waarom dit model een goed model is voor HLH in mensen. Kunnen jullie beter omschrijven welke processen in het model overeen komen met de humane situatie?

De grondslag van het HLH model dat wij gaan gebruiken is beschreven in het artikel van Behrens *et al.*, (2011). Hierbij geven ze meerdere malen TLR-9 stimulatie (wij gebruiken voor TLR9 stimulatie CpG 1826, een TLR9 ligand), wat het macrofaag activatie syndroom opwekt, hetgeen kenmerkend voor HLH. In dit artikel wordt aangetoond dat HLH inductie bij de muis met meerdere TLR9 injecties een klinisch verloop vertoont wat beter overeenkomt met het beloop van HLH in patiënten en daarmee een beter ziektemodel is dan eerdere modellen voor HLH. Eerdere modellen voor HLH waren afhankelijk van genetische defecten (waardoor dit vooral modellen voor primaire HLH zijn) of infectie met bijvoorbeeld LMCV (hetgeen vooral een model is voor infectie gerelateerde secundaire HLH, maar niet voor secundaire HLH i.h.k.v. immuunziekten, kanker, of immuuntherapie). Behrens laat zien dat TLR-9 stimulatie zorgt voor een macrofaag gedreven immuunrespons, kenmerkend voor HLH bij mensen. Door aIL10r toe te voegen ontstaat er een fulminant macrofaag activatie syndroom, meer overeenkomend met de acute fase van HLH bij patiënten. Belangrijke overeenkomsten zijn bijvoorbeeld een verhoogde productie van de ontstekingsmediatoren IFN en IL12 alsmede splenomegalie en histologische kenmerken van hemofagocytose, dit wordt beschreven in artikelen die gebruik maken van dit muizenmodel voor HLH en de bevindingen die bij HLH patiënten worden gedaan. (Canna *et al.*, Janka *et al.*, Takada *et al.*, Pachl *et al.*, Strippoli *et al.*, Crayne *et al.*) Verder laat Buatois *et al.* zien dat biomarkers (CXCL9 en CXCL10) gevonden in het muismodel HLH gebruikt kunnen worden in mens, wat verder onderstreept dat het muismodel overeenkomt met de patiënten situatie. Concluderend hebben verschillende studies aangetoond dat het voorgestelde proefdiermodel voldoende overeenkomsten met HLH in de humane setting heeft, waaronder 1) cytokine productie; 2) hemofagocytose; 3) splenomegalie; 4) overeenkomende biomarkers. De voorgestelde strategie is derhalve een geschikt model om de effecten van CD40 (modulatie) in HLH te onderzoeken.

*Behrens, E. M., Canna, S. W., Slade, K., Rao, S., Kreiger, P. A., Paessler, M., ... & Koretzky, G. A. (2011). Repeated TLR9 stimulation results in macrophage activation syndrome-like disease in mice. The Journal of clinical investigation, 121(6), 2264-2277.*

*Buatois, V., Chatel, L., Cons, L., Lory, S., Richard, F., Guilhot, F., ... & Ferlin, W. G. (2017). Use of a mouse model to identify a blood biomarker for IFN $\gamma$  activity in pediatric secondary hemophagocytic lymphohistiocytosis. Translational Research, 180, 37-52.*

*Canna, S. W., Wrobel, J., Chu, N., Kreiger, P. A., Paessler, M., & Behrens, E. M. (2013). Interferon- $\gamma$  mediates anemia but is dispensable for fulminant Toll-like receptor 9-*

*induced macrophage activation syndrome and hemophagocytosis in mice. Arthritis & Rheumatism, 65(7), 1764-1775.*

*Janka G, Imashuku S, Elinder G, Schneider M, Henter JI. Infection- and malignancy-associated hemophagocytic syndromes: secondary hemophagocytic lymphohistiocytosis. Hematol Oncol Clin North Am 1998;12:435-44.*

*Takada H, Takahata Y, Nomura A, Ohga S, Mizuno Y, Hara T. Increased serum levels of interferon- $\gamma$ -inducible protein 10 and monokine induced by  $\gamma$  interferon in patients with haemophagocytic lymphohistiocytosis. Clin Exp Immunol 2003;133:448-53.*

*Pachlopnik Schmid J, Cote M, Menager MM, Burgess A, Nehme N, Menasche G, et al. Inherited defects in lymphocyte cytotoxic activity. Immunol Rev 2010;235:10-23.*

*Strippoli R, Carvello F, Scianaro R, De Pasquale L, Vivarelli M, Petrini S, et al. Amplification of the response to Toll-like receptor ligands by prolonged exposure to interleukin-6 in mice: implication for the pathogenesis of macrophage activation syndrome. Arthritis Rheum 2012;64:1680-8.*

*Crayne, C. B., Albeituni, S., Nichols, K. E., & Cron, R. Q. (2019). The immunology of macrophage activation syndrome. Frontiers in immunology, 119.*

2. De DEC zou graag een inschatting willen maken hoever dit onderzoek nog afstaat van een klinische toepassing. Hoe ver zijn de ontwikkelingen met trafinib? Is dit al in patiënten toegediend voor andere aandoeningen?

Trafinib wordt nog niet gebruikt in patiënten. 5.1 lid1c

Daarnaast is trafinib getest in diverse andere proefdiermodellen waaronder atherosclerose in muizen, neuroinflammatie in ratten, hartfalen in muizen, polymicrobiële sepsis in muizen, obesitas en insulineresistentie in muizen. Ook is de veiligheid onderzocht in non-human primates. Daarnaast wordt het veiligheidsprofiel momenteel in kaart gebracht door een commerciële partner. Het voorgestelde project is onderdeel van een langlopende en succesvolle onderzoekslijn. Na afronding van de farmacologische studies en experimenten in grote proefdiermodellen zal de stap naar first-in-human studies worden gezet.

3. Kunt u toelichten waarom trafinib niet direct op doodzieke HLH-patiënten uitgetest kan worden en waarom daar eerst dierproeven voor nodig zijn?

De rol van CD40 signalering (het aangrijpingspunt van trafinib) in HLH is nog niet bevestigd. Trafinib is ook nog niet goed gekeurd voor humaan gebruik. Het is daarom onmogelijk en onwenselijk om trafinib in doodzieke HLH patiënten te testen.

*Aanvullende vraag: Het is voor de DEC belangrijk om duidelijk te hebben dat er geen vervanging voor de voorgestelde dierproef mogelijk is. Uit het antwoord op vraag 2 blijkt dat de stap naar first-in-human studies voor Trafinib gezet zal worden op basis van andere proefdiermodellen (en voor een andere toepassing). Een DEC-lid vraagt zich af of deze HLH studie in proefdieren wel noodzakelijk is om dit in mensen te kunnen onderzoeken? Kunt u uitleggen waarom het onmogelijk is om Trafinib experimenteel te onderzoeken op humane (doodzieke) patiënten met HLH?*

Het is inderdaad zo dat dat wij bezig zijn om de volgende stappen te zetten naar first-in-human studies (bijv. uitgebreide toxicologische studies en farmacologische studies t.b.v. verdere optimalisatie), waarbij we trafinib initieel willen toepassen als therapie voor chronische ontstekingsziekten, maar het zal nog erg lang duren voordat het zover is. Momenteel is trafinib nog een compound en nog niet geschikt voor toediening bij de mens. 5.1 lid1c

, maar het zal nog enkele jaren duren voordat wij hier de resultaten van hebben (gepubliceerd). Voordat het zover is willen wij door middel van deze muizenstudie aantonen dat CD40 modulatie d.m.v. trafinib ook een behandelstrategie kan zijn voor acute ontstekingsziekten, in het bijzonder HLH. Wij verwachten dat trafinib HLH kan verbeteren, aangezien trafinib aangrijpt op de in HLH aangedane macrofagen. Er is

alleen ook nog veel fundamenteel onderzoek nodig voordat wij dit kunnen beoordelen. Zo is de rol van het immuun checkpoint CD40, en ook de daarbij betrokken mediators en signaleringsmoleculen (5.1 lid 2h), nog niet onderzocht in HLH. Vandaar dat wij ook beginnen met het onderzoeken van de rol van CD40 in HLH door gebruik te maken van knock-out muismodellen. Daarna kunnen wij de rol van CD40 in HLH in meer detail gaan onderzoeken door bijvoorbeeld specifieke cascades van CD40 signalering te remmen, bijvoorbeeld door gebruik te maken van trafinib.

Wel is het zo, dat wanneer trafinib goedgekeurd is voor humaan gebruik en de voorgestelde studies inderdaad aantonen dat CD40 een belangrijke rol heeft in HLH, wij een aantal preklinische studies hopen over te slaan zodat wij op die manier trafinib eerder kunnen toepassen in HLH-patiënten. Als het medicijn al is goedgekeurd zal dit ook de goedkeuring voor HLH ten goede komen, aangezien HLH een zeer zeldzame ziekte is met slechts een kleine patiënt populatie. Dit betekent dat er te weinig patiënten zouden zijn om zoals voorgesteld trafinib experimenteel te onderzoeken in HLH patiënten, maar wanneer trafinib al is goedgekeurd bij gebruik voor een andere ziekte zal een deel van dit probleem overkomen worden.

4. Zou trafinib ook werkzaam kunnen zijn bij primaire HLH? M.a.w. kun je dit voor een grotere patiëntengroep gebruiken?

Primaire HLH is een erfelijke variant van HLH, waarbij vaak een afwijking is in de perforine (een cytolytisch enzym dat cellen kapot maakt) productie door T cellen. In primaire HLH spelen T cellen dus een belangrijkere rol. CD40 komt zeer minimaal tot expressie op T cellen, waardoor deze minder geschikt zijn voor therapie met trafinib. Secundaire HLH wordt meer gedreven door een macrofaag reactie, waardoor deze variant beter geschikt is voor behandeling met therapie. Door de opkomst van nieuwe cellulaire immuuntherapie (zoals CD22 CAR T celtherapie), welke in circa 35% van de patiënten gepaard gaat met ernstige HLH, zullen in de toekomst meer patiënten een behandeling voor HLH nodig hebben.

*Lichtenstein et al., Characterization of HLH-like manifestations as a CRS variant in patients receiving CD22 CAR T cells Blood. 2021 Dec 16;138(24):2469-2484.*

5. Kunt u een inschatting geven van de overlevingskans is van patiënten die HLH te boven zijn gekomen maar ook te maken hebben met een virus-infectie of kanker? Is de overlevingskans kleiner of vergelijkbaar met patiënten met kanker/virusinfectie zonder HLH?

De overlevingskans van patiënten met een virale infectie of kanker en HLH is zonder twijfel lager dan die overleving van patiënten met een virale infectie of kanker zonder HLH. Algemene cijfers zijn echter niet te geven aangezien deze afhangen van het type infectie of kanker alsmede aanwezig comorbiditeit en de leeftijd en algehele conditie van de patiënt. De overlevingskans van patiënten met HLH is over het algemeen lager omdat de behandeling van dit syndroom de behandeling van de onderliggende ziekte (infectie of kanker) compromitteert (t.g.v. uitstel van behandeling of immuunsuppressie t.g.v. HLH therapie).

*Aanvullende vraag: Het is duidelijk dat u inschat dat de overlevingskans lager is van een patiënt die HLH te boven is gekomen. Kunt u inzichtelijker maken hoeveel verbetering in overleving u verwacht als Trafinib zou werken zoals u verwacht.*

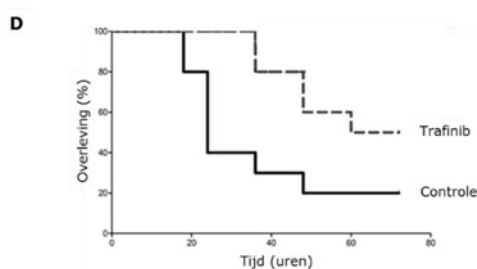
Op dit moment kunnen wij nog geen harde cijfers geven hoeveel verbetering wij verwachten bij HLH patiënten, daarvoor zijn wij nog te vroeg in de onderzoeksfase. HLH patiënten zijn vanwege de zeer heftige immuunreactie zeer ziek. Wij verwachten dat trafinib deze immuunreactie zal dempen. Wanneer deze zeer heftige immuunreactie onder controle is en patiënten dus in stabielere conditie verkeren, zal dit de behandeling van de onderliggende oorzaak van HLH, en dus de overleving van de

patiënt, ook ten goede komen. Er kan bijvoorbeeld sneller weer gestart worden met behandeling van de onderliggende ziekte, zoals een hematologische of solide maligniteit of infectie. De uiteindelijke overlevingswinst door trafinib wordt dus bepaald door de algehele conditie van patiënt voor de ziekteperiode, de aanwezigheid co-morbiditeit en de oorzaak van de HLH. Het is momenteel niet goed mogelijk om hier een concreet getal bij te noemen omdat de rol van CD40 in HLH allereerst goed in kaart gebracht moet worden.

6. Kunt u toelichten waarom u denkt dat een behandeling met (bijvoorbeeld) Trafinib het overlijden van patiënten kan voorkomen. De DEC vermoedt dat de ontsporing én heel snel gaat én heel heftig is. De DEC twijfelt of een behandeling in de acute fase het tij nog wel kan keren.

HLH is een acute en ernstige ziekte, waarbij het ziekteproces zich over het algemeen in 3-7 dagen voltrekt. Zoals correct opgemerkt is het z.s.m. starten van de behandeling in beslag neemt) derhalve wenselijk. In de klinische praktijk neemt de diagnostiek van HLH circa 3-7 dagen in beslag (aangezien het een combinatie van flow cytometrie, pathologische onderzoek van het beenmerg en morfologische onderzoek van de perifeer bloed en beenmerg betreft. De huidige behandelingen van HLH, waaronder bijv. combinatie chemotherapie, wordt dan ook pas gestart nadat de diagnose rond is en de patiënt over het algemeen dus al enkele dagen ernstig ziek is en op de IC afdeling is opgenomen. De huidige behandelingen zijn in staat om de ernstige ontstekingsreactie bij een dele van de patiënten te remmen waardoor zij uiteindelijk kunnen herstellen. Of dit ook geldt voor modulatie van CD40 is nog onbekend. Dit wordt onderzocht in deze aanvraag. Wel hebben wij eerder aangetoond dat 5.1 lid2h

verbetert, zie hiervoor ook onderstaande figuur. Ook reussteert genetische deficiëntie van CD40 in een verbeterde overleving van muizen die worden blootgesteld aan een poly microbiële sepsis (Nolan et al., Am J Respir Crit Care Med. 2008 Feb 1;177(3):301-8. CD40 and CD80/86 act synergistically to regulate inflammation and mortality in polymicrobial sepsis). Sepsis is net als HLH een ernstige acute ontstekingsreactie, derhalve hebben wij voldoende aanwijzingen dat trafinib ook acute inflammatoire ziekten kan remmen.



5.1 lid2h, 5.1 lid2e

#### Aanvullende vragen:

1. Kunt u beter uitleggen wat de verwachtingen zijn hoe snel het middel zou kunnen werken na toedienen in een reeds zieke patiënt.
2. De onderzoekers geven in het antwoord aan dat ze eerder hebben gezien dat het middel goed werkt bij acute infectie en citeren daarbij een onderzoek met sepsis model en dit middel. In deze publicatie dient men het middel toe tegelijkertijd met sepsis inductie. Dat is dus een ander design dan

*hoe het hier en t.z.t. in de praktijk toegepast zal gaan worden, zoals overigens ook zelf door de onderzoekers wordt opgemerkt in het antwoord op vraag 5 over de bijlage (Trafinib pas toedienen na HLH inductie). Misschien kan de onderzoeker nog iets verder ingaan op dit punt?*

1.

Het is momenteel niet mogelijk om in te schatten hoe snel het middel zou werken na toediening. HLH is een acute en ernstige ziekte, waarbij het ziekteproces zich over het algemeen in 3-7 dagen voltrekt. Zoals correct opgemerkt is het z.s.m. starten van de behandeling derhalve wenselijk. In de klinische praktijk neemt de diagnostiek van HLH circa 3-7 dagen in beslag (aangezien het een combinatie van flow cytometrie, pathologische onderzoek van het beenmerg en morfologische onderzoek van de perifeer bloed en beenmerg betreft). De huidige behandelingen van HLH, waaronder bijv. combinatie chemotherapie, wordt dan ook pas gestart nadat de diagnose rond is en de patiënt over het algemeen dus al enkele dagen ernstig ziek is en op de IC afdeling is opgenomen. De huidige behandelingen zijn in staat om de ernstige ontstekingsreactie bij een deel van de patiënten te remmen waardoor zij uiteindelijk kunnen herstellen. Of dit ook geldt voor modulatie van CD40 is nog onbekend. Dit wordt onderzocht in deze aanvraag. In deze studie kunnen wij al de eerste stappen zetten om te bepalen wat bijvoorbeeld het beste moment is om de behandeling te starten, de dosis die gegeven moeten worden, en ook hoe vaak wij de behandeling moeten toedienen. Ook de methode van toediening zal effect hebben op hoe snel de medicatie werkt. HLH patiënten liggen vaak op de intensive care, waardoor het in deze patiënten makkelijker is om intraveneus te injecteren. Intraveneuze toediening zorgt er voor dat de medicatie sneller opgenomen is, en dus werkzaam is. Momenteel wordt vaak chemotherapie gegeven, om het hele immuunsysteem te elimineren. Trafinib werkt veel specifieker, het remt alleen de macrofaag gedreven immuun respons, maar de rest van het immuunsysteem werkt nog. Dit betekent dat de patiënt niet volledig immuun gecompromitteerd raakt, waardoor de patiënt beter beschermd is tegen mogelijk andere (opportunistische) infecties en de onderliggende oorzaak van de HLH beter kan klaren.

2.

De sepsisexperimenten hebben inderdaad een andere opzet dan de HLH experimenten. 5.1 lid2h tegelijkertijd met de sepsis te geven doordat sepsis zich zeer snel ontwikkelt. Na injectie met bacteriën of perforatie van de darm, zal er al binnen enkele minuten sepsis cascade ontstaan. 5.1 lid2h . HLH is tevens een acute immuunziekte, al ontwikkelt deze zich minder snel dan sepsis. Voor HLH inductie heb je namelijk ook eerst de 'ontspoorde' macrofagen nodig om de (systemische) ziekte te induceren, waardoor je trafinib in het muismodel pas zou willen toedienen zodra de volledig ziekte geïnduceerd is (bijv. hemofagocytose ontstaat over het algemeen pas na 2-5 dagen, splenomegalie volgt over het algemeen nog wat later). Hierdoor is het sepsis model inderdaad geen perfecte representatie van wat wij in HLH willen onderzoeken, 5.1 lid2h . Het laat wel zien dat ook voor een zeer snel ontwikkelende ziekte zoals sepsis, behandeling met trafinib het verschil kan maken. Bij HLH zal de immuunrespons dus al overactief zijn, en zal trafinib anders werken dan bij sepsis. Toch verwachten wij nog een effect van trafinib te zien. Bij HLH worden er continue nieuwe immuuncellen aangemaakt, met name macrofagen. De verwachting is dat trafinib er bij deze nieuw aangemaakte macrofagen ervoor zorgt dat ze minder hyper inflammatoir worden. Door deze nieuwe aanwas van macrofagen te remmen hopen wij dat de HLH zich minder ernstig ontwikkelt.

Nog een aanvullende vraag:

Is het overige aangevraagde onderzoek voor 'niets' geweest als er uiteindelijk uitkomt dat Trafinib niet in staat is om de respons te remmen? Kan er niet een Go/No Go moment ingebouwd worden om een proef te doen om de effectiviteit van Trafinib in een vroeg stadium te bepalen (en bij een negatief resultaat geen mechanistische proeven meer uit te voeren)?

Het aangevraagde onderzoek is zeker niet voor niets geweest wanneer blijkt dat trafinib niet werkt bij HLH, dit is namelijk niet ons directe doel. Ons directe doel is om de immunologische respons te onderzoeken die plaatsvindt bij HLH, waarbij wij ons specifiek richten op het immuun checkpoint CD40. Wij verwachten op basis van de literatuur en onze eigen ervaring dat CD40, en de daarbij betrokken signalering, een rol speelt in HLH. Bij HLH is er sprake van hyperactivatie van macrofagen, en CD40 speelt een belangrijke rol in macrofaag activatie in veel andere ziekten. Hierdoor is onze hypothese dat CD40 een rol speelt in HLH en dat het remmen van CD40 signalering mogelijk een gunstig effect heeft op het ziekteverloop. Met dit project willen wij onderzoeken wat de rol van CD40 precies is. Dit pakken wij op verschillende manieren aan. Zo gebruiken wij bijvoorbeeld een CD40 knock-out muis, waardoor wij kunnen zien of CD40 überhaupt een effect heeft op het ziekteverloop van HLH. Dit is een go/no go moment voor ons, vandaar dat wij in de aanvraag dit ook als een pilot experiment beschrijven. Wanneer blijkt dat CD40 helemaal geen effect heeft op HLH dan zullen wij geen vervolg experimenten uitvoeren. Het gebruik van een CD40 knock-out muis geeft ons dus een eerste idee van de rol van CD40 in HLH. Vervolgens kunnen wij de rol van CD40 verder bevestigen aan de hand van een interventie. [5.1 lid2h](#)

[Redacted text]

[5.1 lid2h, 5.1 lid2e](#)

Het voordeel van een interventie, is dat wij CD40 kunnen remmen na de inductie van HLH (wat overeen zou komen met een behandeling van patiënten), terwijl met een CD40 knock-out muis gedurende het hele ziekte proces geen CD40 aanwezig is. Door trafinib op verschillende tijdstippen toe te dienen, kunnen wij vervolgens ook onderzoeken in welke fase van de ziekte CD40 een belangrijke rol speelt. Mocht trafinib niet werken, dan is het onderzoek zeker niet voor 'niets' geweest, aangezien we nog steeds de rol van CD40 in HLH hebben onderzocht en daarnaast ook uitgebreid hebben geanalyseerd hoe de immuun respons verloopt in HLH. Dit geeft de mogelijkheid tot verder onderzoek naar een behandelstrategie voor deze groep patiënten. [5.1 lid2h](#)

[Redacted text]

Binnen deze aanvraag gebruiken wij trafinib dus vooral om een rol van CD40 in HLH te bevestigen, maar is het niet ons uitgangspunt om binnen deze aanvraag een behandeling voor HLH bij patiënten te vinden. Ons directe doel binnen deze aanvraag is om de immuun respons die plaatsvindt in HLH op te helderen bij de muis, waarbij wij ons specifiek richten op CD40. Het uiteindelijke doel zal zijn om een behandeling voor HLH bij patiënten te vinden, en wij hopen met ons onderzoek binnen deze aanvraag daar aan bij te dragen.

[5.1 lid2h, 5.1 lid2e](#)

[Redacted text]

[5.1 lid2h, 5.1 lid2e](#)

[Redacted text]

5.1 lid2h, 5.1 lid2e

6. Kunt u een referentie toevoegen bij de sterftepercentages. De DEC vraagt zich af waar de genoemde spreiding (8%- 54%) vandaan komt?

Referenties zijn toegevoegd aan het project voorstel.

*Kleyenberg et al., Secondary hemophagocytic lymphohistiocytosis in adults: an update on diagnosis and therapy. Clin Adv Hematol Oncol, Nov;10(11):726-32, 2012.*

*Wang et al., A systematic review of malignancy-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis that needs more attentions. Oncotarget, Aug 29; 8(35): 59977–59985, 2017.*

*Aanvullende vraag: De DEC vraagt zich af waar de genoemde spreiding (8%- 54%) vandaan komt?*

Bij HLH hangt de overlevingskans sterk af van de onderliggende oorzaak, leeftijd, pre-existentie conditie van patiënt en de eventuele aanwezigheid van co-morbiditeit, er zijn andere sterftcijfers voor patiënten die infectie geïnduceerde HLH hebben dan maligniteit geïnduceerde HLH. Zo is het percentage van 54% gebaseerd op de overlijdenskans bij kinderen met HLH en de 8% bij kankerpatiënten. Daarnaast is HLH een zeer zeldzame ziekte, met een kleine patiënten populatie, en wordt de ziekte ook niet altijd bevestigd. De populatie patiënten waarop dit getal gebaseerd is, is dus zowel zeer heterogeen als zeer klein, waardoor er een grote spreiding ontstaat.

7. Indien u trafinib ontwikkelt in samenwerking met een commerciële partner zou u deze ook moeten noemen als belanghebbende.

Trafinib wordt niet met een commerciële partner ontwikkeld.

8. Kunt u uw strategie beter toelichten zodat duidelijk is dat het model niet langer zal duren dan absoluut noodzakelijk. De DEC vindt een ziekteperiode van 10 dagen zeer ernstig. Het moet duidelijk gemaakt worden in de strategie dat de ziekteperiode niet langer zal duren dan absoluut noodzakelijk voor het beantwoorden van de onderzoeksvragen.

In de strategie staat vermeld dat na HLH inductie de dieren niet langer dan 10 dagen in experiment gehouden worden. Aan de hand van de beschreven pilot studies zullen wij onderzoeken of het mogelijk is om deze periode korter te laten duren. Het herstel na een anti-inflammatoire interventie kan echter enkele dagen duren en om potentiële gunstige effecten van trafinib goed te kunnen karakteriseren kan het derhalve noodzakelijk zijn het experiment 10 dagen te laten duren.

#### **Bijlage:**

1. U heeft het over CD40-CD40L muizen, de DEC vermoedt dat u KO muizen bedoelt?

Dit is juist, het gaat hierom muizen die of CD40 KO zijn of CD40L KO. Dit is aangepast in de bijlage.

2. De DEC merkt op dat er een typefoutje in de berekening staat: 272 → 282 muizen.

Dit is aangepast.

3. De DEC vraagt of u toe kunt lichten dat de resultaten uit de eerste pilot mee genomen zullen worden in het ontwerp van de tweede pilot? Worden de specifieke tijdstippen in de tweede pilot gekozen op basis van de gegevens uit pilot 1? (Stel dat de meerderheid



van de muizen uit het experiment gehaald wordt op dag 8 o.b.v. een HEP dan zou de pilot niet uit moeten gaan van een experiment van 10 dagen)

De resultaten uit de eerste pilot worden zeker meegenomen in de tweede pilot. De tijdstippen genoemd in de opzet voor pilot 2 zijn slechts een voorbeeld, zoals vermeld in de bijlage. Ook in de eerste pilot zullen wij het experiment stopzetten wanneer meer dan 30% van de dieren een HEP bereikt. Dit hebben wij nu duidelijker in de bijlage vermeld. De 10 dagen moet echt als een absoluut maximum gezien worden, het doel is om het experiment minder lang te laten verlopen. Het herstel na een anti-inflammatoire interventie kan echter enkele dagen duren, om potentiële gunstige effecten van trafinib goed te karakteriseren kan het derhalve noodzakelijk zijn het experiment 10 dagen te laten duren.

4. De DEC vraagt ook of er minder dieren gebruikt kunnen worden in de tweede pilot voor het tijdstip dat ook al in de eerste pilot is bepaald?

Wij hebben bewust gekozen voor deze volgorde van pilot experimenten, en kunnen niet zomaar de dieren van pilot 1 gebruiken voor pilot 2. Om te onderzoeken of we de tijdsduur van het experiment kunnen verkorten hebben we veel verschillende groepen nodig. Om onnodig proefdiergebruik te voorkomen, willen we eerst zeker weten dat CD40 of CD40L een effect heeft op HLH. Pas wanneer dit het geval is, gaan we verder met de tweede pilot. Uit pilot 1 kan namelijk blijken dat CD40L knock-out geen effect heeft, deze groep hoeven we dan niet meer mee te nemen in pilot 2 (dit scheelt bijvoorbeeld al 45 dieren (wanneer we 3 tijdstippen onderzoeken en 15 dieren per groep gebruiken). Wij kunnen de data van pilot 1 niet zomaar overnemen voor pilot 2, het zijn namelijk twee aparte experimenten en vanwege mogelijke variabelen die veranderen kan de data uit twee experimenten niet zomaar met elkaar vergeleken worden. Denk hierbij aan een nieuwe generatie muizen, een andere batch van de compounds die gebruikt worden van HLH inductie, de instellingen van meetmachines die kunnen veranderen, etc. Hierdoor achten wij het niet mogelijk om minder dieren te gebruiken voor de tweede pilot dan vermeld staat in de aanvraag.

*Aanvullende vraag: Eén DEC lid heeft de indruk dat deze pilot experimenten niet bijdragen aan het beantwoorden van de onderzoeksvraag maar enkel gebruikt zullen worden ter verfijning, om de mogelijke duur van het experiment te verkorten. Kunt u hierop reageren?*

Er is nog veel onbekend over de ontwikkeling en het verloop van de immuunreactie bij HLH, en ook welke rol CD40 daar bij speelt. Door de dieren op meerdere tijdstippen te doden krijgen wij een zeer uitgebreid beeld van het verloop van de immuunrespons, en kunnen wij een tijdslijn van de immuunrespons maken in HLH. Zo kunnen wij onderzoeken op welk moment de macrofagen, maar ook de andere immuuncellen, het meest actief zijn (i.e. het meeste cytokines produceren, activatie markers tot expressie brengen, meer prolifereren). Aan de hand van deze informatie kunnen wij ook vervolgstudies beter opzetten. Zo is het bijvoorbeeld mogelijk om het moment van interventie te koppelen aan een bepaalde activatie status van de macrofagen. Afhankelijk van hoe de immuunreactie verloopt kunnen wij zo onderzoeken of wij het beste voor, op, of net na de piek van macrofaag activatie moeten beginnen met een interventie. Door dit ook meteen in CD40(L) KO muizen te doen kunnen wij ook zien of CD40 een tijdsgebonden effect heeft. Ook kunnen wij bijvoorbeeld zien of de piek in de immuun respons die wij kunnen meten in het bloed en de lymfoïde organen overeenkomt met een piek in de ernst van de klinische symptomen. Deze informatie kan later ook bijdragen aan het vormgeven van (pre-)klinische studies. De pilot studies geven ons dus de mogelijkheid om een zeer goede tijdslijn te maken van de immuun respons die optreedt bij HLH, waardoor wij daaropvolgende experimenten beter kunnen opzetten, en daarbij bijdragen aan een efficiënter proefdiergebruik. Daarnaast draagt het zeker bij aan verfijning van het experiment. Dit is

een diermodel met ernstig ongerief, vandaar dat wij waar mogelijk dit ongerief willen verminderen door bijvoorbeeld uit te zoeken of wij de duur van het experiment kunnen verkorten.

5. Het verbaast de DEC dat het eerste tijdstip niet dag 2 is in pilot 2. De muizen zijn dan al 20% afgefallen, de immuunrespons is dan al volledig ontspoord?

De muizen zijn naar verwachting niet op dag 2 al 20% afgefallen, op basis van figuur 1b in het artikel van Albeituni *et al.*, waarop wij ons model baseren, hebben de muizen op dag 2 een gewichtsverlies van 10%.

Secundaire HLH is een muis model dat al vaker gebruikt wordt en goed beschreven is. Het feit dat er op dag 2 al een effect op het immuun systeem te zien is (zoals cytokine productie), betekent niet dat HLH zich al volledig heeft ontwikkeld (splenomegalie en hemaofagocytose ontwikkelen vaak later). Het artikel van Behrens *et al.* laat zien dat een enkele dosis injectie nog niet het karakteristieke ziektebeeld van HLH weergeeft (o.a. supplemental figure 1)

Daarnaast zal een eerste tijdstip op dag 2 voor ons onderzoek niet het meest relevant zijn, waardoor wij ook geen extra muizen willen gebruiken om dit tijdstip mee te nemen. Ons uiteindelijke doel is om interventies te onderzoeken die het ziekteverloop van HLH positief beïnvloeden. Deze injecties geven wij pas zodra HLH volledig geïnduceerd is, dit komt namelijk het meest overeen bij mensen waarbij je ook pas behandeling start zodra ze HLH hebben (en niet preventief). Dag 2 is nog te vroeg in de tijdslijn om zowel HLH te induceren en al een effect van een interventie te zien. Om het aantal proefdieren zo laag mogelijk te houden nemen wij dit tijdstip dus niet mee. Behrens, E. M., Canna, S. W., Slade, K., Rao, S., Kreiger, P. A., Paessler, M., ... & Koretzky, G. A. (2011). Repeated TLR9 stimulation results in macrophage activation syndrome-like disease in mice. *The Journal of clinical investigation*, 121(6), 2264-2277.

6. De DEC vraagt zich af of u verwacht dat er ook dieren zullen sterven tijdens dit model voordat ze het HEP hebben bereikt?

Wij hebben de HEPs zodanig opgeschreven dat wij niet verwachten dat een dier sterft voordat het HEP wordt bereikt. Als de dieren zodanig ziek zijn dat ze sterven, dan gaan wij ervan uit dat ze een ziektescore hebben die overeen komt met het HEP.

#### Aanvullende vragen:

1. *Het is niet helder voor de DEC of een dier toch niet zo ziek kan worden dat het kan overlijden maar dat het dier op dat moment nog geen 20% gewichtsverlies heeft ondergaan. Kunt u aangeven of u dit scenario kan verwachten in dit ernstige model? M.a.w. verwacht u dat de HEP op ziektescore 3 dit bovenstaande scenario kan voorkomen?*
2. *Kunt u aangeven hoe u zou handelen als een dier toch zo ziek geworden is dat te verwachten valt dat het dier binnen enkele uren zal overlijden maar op dat moment nog geen 20% gewichtsverlies heeft?*
3. *De HEPs zijn nogmaals aan de IvD voorgelegd. De IvD zou in de omschrijving van ziektescore 3 'inactief gedrag' veranderd willen zien in 'sterk verminderd actief gedrag'. In combinatie met een gewichtsverlies van >20% is dit een betere omschrijving. (Inactief gedrag betekent dat het dier niet meer eet of drinkt en niet meer (kan) bewegen. Het is dan niet humaan om te wachten tot het dier >20% gewichtsverlies heeft, voordat het uit de proef genomen en gedood wordt om erger lijden te voorkomen.)*

De onduidelijkheid met betrekking tot de HEPs komt voort uit de overlap die er zit tussen het HLH specifieke ongerief en de algemene HEPs die zijn opgesteld door de IvD. In eerdere versies van de bijlage stonden deze HEPs apart uitgesplitst, maar in de praktijk is het dan moeilijk om onderscheid te maken of een humaan eindpunt wordt bereikt vanwege HLH of een andere oorzaak. Het is namelijk niet zo dat wij een dier dat duidelijk zeer ernstig ziek is, d.w.z. pilo-erectie, sterk verminderd actief gedrag, en abnormale houding in het experiment zouden houden enkel omdat deze nog niet meer dan 20% gewichtsverlies heeft. In de bijlage hebben wij dit er nu expliciet bij gezet. Bij twijfelgevallen zullen wij vertrouwen op de expertise van de dierenarts evenals de ervaring van de dierversorgers en altijd met de betrokkenen overleggen of een dier wel of niet in experiment kan blijven. Wanneer de trend er is dat de dieren het HEP gaan bereiken, hebben wij als onderzoekers ook de voorkeur om het dier uit het experiment te halen zodat we het nog wel als wetenschappelijk eindpunt kunnen gebruiken. Wij willen voorkomen dat een dier daadwerkelijk dood gaat in zijn kooi, dan kunnen we deze namelijk niet meer gebruiken voor wetenschappelijke analyses. Ook dit punt is genoemd in de bijlage.

Daarnaast hebben wij ook een alinea toegevoegd waarin algemeen staat wanneer voor de muizen een HEP wordt bereikt, ongeacht de ziektescore voor HLH. Zo staat hier ook in dat dieren die géén HLH hebben slechts 15% gewichtsverlies mogen hebben (zoals beschreven staat in de door de IvD opgestelde SOP omtrent ziekte dieren en wat daarbij te doen).

Wij hebben in de HEPs nu inactief gedrag veranderd in sterk verminderd gedrag, als antwoord op de derde vraag.

Aanvullende vraag DEC lid over de mogelijkheid om een Go/no GO moment in te bouwen na een experiment met trafinib. Indien blijkt dat trafinib de HLH niet kan remmen, zijn dan alle andere experimenten niet voor 'niets' uitgevoerd? Zijn de mechanistische experimenten dan nog wel zinvol?

Het aangevraagde onderzoek is zeker niet voor niets geweest wanneer blijkt dat trafinib niet werkt bij HLH, dit is namelijk niet ons directe doel. Ons directe doel is om de immunologische respons te onderzoeken die plaatsvindt bij HLH, waarbij wij ons specifiek richten op het immuun checkpoint CD40. Wij verwachten op basis van de literatuur en onze eigen ervaring dat CD40, en de daarbij betrokken signalering, een rol speelt in HLH. Bij HLH is er sprake van hyperactivatie van macrofagen, en CD40 speelt een belangrijke rol in macrofaag activatie in veel andere ziekten. Hierdoor is onze hypothese dat CD40 een rol speelt in HLH en dat het remmen van CD40 signalering mogelijk een gunstig effect heeft op het ziekteverloop. Met dit project willen wij onderzoeken wat de rol van CD40 precies is. Dit pakken wij op verschillende manieren aan. Zo gebruiken wij bijvoorbeeld een CD40 knock-out muis, waardoor wij kunnen zien of CD40 überhaupt een effect heeft op het ziekteverloop van HLH. Dit is een go/no go moment voor ons, vandaar dat wij in de aanvraag dit ook als een pilot experiment beschrijven. Wanneer blijkt dat CD40 helemaal geen effect heeft op HLH dan zullen wij geen vervolg experimenten uitvoeren. Het gebruik van een CD40 knock-out muis geeft ons dus een eerste idee van de rol van CD40 in HLH. Vervolgens kunnen wij de rol van CD40 verder bevestigen aan de hand van een interventie. 5.1 lid2h

5.1 lid2h, 5.1 lid2e Het voordeel van een interventie, is dat wij CD40 kunnen remmen na de inductie van HLH (wat overeen zou komen met een behandeling van patiënten), terwijl met een CD40 knock-out muis gedurende het hele ziekte proces geen CD40 aanwezig is. Door trafinib op verschillende tijdstippen toe te dienen, kunnen wij vervolgens ook

onderzoeken in welke fase van de ziekte CD40 een belangrijke rol speelt. Mocht trafinib niet werken, dan is het onderzoek zeker niet voor 'niets' geweest, aangezien we nog steeds de rol van CD40 in HLH hebben onderzocht en daarnaast ook uitgebreid hebben geanalyseerd hoe de immuun respons verloopt in HLH. Dit geeft de mogelijkheid tot verder onderzoek naar een behandel strategie voor deze groep patiënten. 5.1 lid2h

. Binnen deze aanvraag gebruiken wij trafinib dus vooral om een rol van CD40 in HLH te bevestigen, maar is het niet ons uitgangspunt om binnen deze aanvraag een behandeling voor HLH bij patiënten te vinden. Ons doel binnen deze aanvraag is om de immuun respons die plaatsvindt in HLH op te helderen bij de muis, waarbij wij ons specifiek richten op CD40. Het uiteindelijke doel zal zijn om een behandeling voor HLH bij patiënten te vinden, en wij hopen met ons onderzoek binnen deze aanvraag daar aan bij te dragen.

5.1 lid2h, 5.1 lid2e

- Datum antwoord 7 maart, 9 mei, 13 mei, 30 mei
- Verstrekt(e) antwoord(en) De antwoorden zijn voor de leesbaarheid direct onder de vragen geplaatst.

De antwoorden hebben wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag  
Het voorstel en de bijlage zijn aangepast.

10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC) n.v.t.
- Aard expertise
  - Deskundigheid expert
  - Datum verzoek
  - Strekking van het verzoek
  - Datum expert advies
  - Advies expert

## B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

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

De hoofddoelstelling van deze aanvraag is concreet en helder omschreven: "Inzicht krijgen in de werking van het immuun checkpoint eiwit CD40, alsook de mediators en signaleringsmoleculen die betrokken zijn bij de CD40 signaleringscascade, in een HLH muismodel en hoe deze het ziekteverloop beïnvloeden".

De volgende sub-onderzoeksvragen zijn geformuleerd:

1. Via welke processen reguleren het immuun checkpoint CD40 en de daarbij betrokken mediators en signaleringsmoleculen de activatie van verschillende (immuun)celtypen in een HLH ziektemodel en wat is het effect hiervan op het ziekteverloop?
2. Wat zijn de effecten van interventies (onder andere genetisch, farmacologisch) in deze processen op specifieke (immuun)cel functies die belangrijk zijn bij HLH en hoe beïnvloedt dit het ziekteverloop?

De relatie tussen het hoofddoel en de subdoelen is logisch en navolgbaar. Het project lijkt het meest op voorbeeld 4B uit de handreiking "invulling definitie project". Subdoel 2 is afhankelijk van de uitkomsten uit het voorgaande subdoel. De DEC vindt dat beide subdoelen bijdragen aan de hoofddoelstelling en samen een project vormen.

Allereerst zal onderzocht worden welke mediators een belangrijke rol spelen in HLH in de muis. Vervolgens zal onderzocht worden of interventies gericht tegen deze parameter het ziekteverloop kunnen verminderen. Het onderzoek is volledig en duidelijk uitgewerkt zodat de mate van ongerief en de dieren aantallen duidelijk zijn, waardoor de aanvraag toetsbaar en navolgbaar is.

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).

n.v.t.

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 aanvrager heeft de doelcategorieën 'fundamenteel' en 'translationeel' aangekruist. Het fundamentele aspect van het onderzoek is duidelijk aanwezig omdat onderzoek gedaan wordt naar de rol die CD40 in de pathogenese speelt. Het project heeft ook een translationeel aspect omdat onderzocht wordt of interventies gericht tegen deze mediators het ziekteverloop kunnen afremmen.

*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 ("Inzicht krijgen in de werking van het immuun checkpoint eiwit CD40, alsook de mediators en signaleringsmoleculen die betrokken zijn bij de CD40 signaleringscascade, in een HLH muismodel en hoe deze het ziekteverloop beïnvloeden.") heeft een directe en reële relatie met het uiteindelijke doel ('Onderzoeken of CD40 signalering een aangrijpingspunt is voor een interventie, bijvoorbeeld met trafinib, die gebruikt kan worden voor de ontwikkeling van een behandeling van HLH patiënten'). Deze kennis draagt bij aan het ontwikkelen van een therapie bij deze zeer acute ontsporing van het immuunsysteem (hyperactieve macrofagen) die optreedt als gevolg van een virusinfectie of kankertherapie. Deze ontsporing is levensbedreigend. De aanvragers verwachten dat het remmen van CD40 ook in deze ziekte therapeutisch zou kunnen werken.

De DEC heeft veel aanvullende vragen gesteld om een beter beeld te krijgen van deze relatie. Er waren twijfels over de transleerbaarheid van het model maar ook over de haalbaarheid van het uiteindelijke doel. Is het überhaupt wel mogelijk om zo'n ontspoorde immuunrespons nog bij te sturen. De aanvrager heeft dit verhelderd door aan te geven wat de overeenkomsten zijn tussen het beeld in de patiënt en het model. De DEC beoordeelde het model daarom geschikt voor deze (mechanistische) proeven. De aanvrager heeft daarnaast aangegeven dat trafinib in een ander acuut ontstekingsmodel (sepsis) in staat was om de ontstekingsreactie te remmen. Dit ondersteunt de hypothese dat een ontspoorde immuunrespons nog bij te sturen valt. 'Nieuw' aangetrokken immuuncellen kunnen een niet-inflammatoir fenotype houden waardoor uiteindelijk de ontspoorde immuunrespons bijgestuurd kan worden. Uiteindelijk blijft er (natuurlijk) onzekerheid of de hypothesen bevestigd zullen worden maar dit is inherent aan onderzoek doen naar een behandeling van een complexe immuunrespons. De DEC was niet unaniem in de beoordeling van deze relatie. Eén DEC lid was van mening dat er teveel onzekerheid was dat dit onderzoek een geneesmiddel kan opleveren, de overige DEC-leden waardeerden de bijdrage van dit onderzoek aan de ontwikkeling van een behandeling veel hoger (*Zie verder de ethische afweging*).

De DEC acht het onderzoek naar het onderliggende mechanisme, gerechtvaardigd binnen de context van het onderzoeksveld en de onderzoekslijn van deze onderzoeksgroep. Deze groep heeft al veel onderzoek gedaan naar CD40 in andere ontstekingsziekten. Dit ziekte model is echter nieuw voor deze groep.

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*)

Er is een groot verschil in de termijn waarop verschillende belanghebbenden een voordeel of nadeel ervaren. Een langere termijn zorgt voor meer onzekerheid in het effect op het belang. Het directe belang wordt daarom ingeschat als "belangrijker" en het belang op langere termijn wordt daarom ingeschat als "minder". De belanghebbenden die direct in hun morele waarden worden aangetast of bevorderd zijn in dit fundamentele en translationele project respectievelijk de proefdieren en de onderzoekers. Op langere termijn wordt het belang van de patiënten met HLH bevorderd. De muizen (n=1222) zullen licht (6%:82/1222) tot ernstig (94%: 1140/1222) ongerief ervaren door dit onderzoek. Met dit onderzoek zullen de onderzoekers hun kennis en inzichten vergroten over de mogelijkheid om CD40 signalering te remmen én of dit leidt tot een vermindering van het ziektebeeld. Deze inzichten zullen gedeeld worden met het wetenschappelijk veld. Aanvullende belangen van onderzoekers zouden kunnen zijn dat het onderzoek hun carrièremogelijkheden vergroot door publicaties.

6. Is er aanleiding voor de DEC om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken?  
De DEC heeft geen aanleiding om te vermoeden dat er schadelijke effecten op het milieu zouden zijn.

*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*).  
De IvD ziet er op toe dat alle personen die betrokken zijn bij dit onderzoek, zowel de onderzoekers als de analisten die de experimenten gaan uitvoeren, als de onderzoekers die het project hebben vormgegeven en hebben opgeschreven, voldoen aan de wettelijke eisen van kennis en deskundigheid.  
De aanvragers zijn nieuw met dit model maar hebben veel ervaring met onderzoek aan CD40 in andere ziektemodellen. De DEC waardeert dat er pilot experimenten worden gedaan om te bepalen of de uitleesparameters niet eerder verkregen kunnen worden zodat de dieren minder lang (ernstig) ziek hoeven te zijn. De DEC oordeelt op basis hiervan dat de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen voldoende gewaarborgd zijn.
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*).  
Het project is goed opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en de uitkomstparameters sluiten logisch en helder aan bij de aangegeven doelstellingen. Het is een relatief exploratieve studie waarbij eerst de CD40 signalering onderzocht zal worden en ook naar latere mediators gekeken wordt die door CD40 geactiveerd worden. Doordat de onderzoeksvraag gefocust is op één immuuncheckpoint (CD40) binnen één ziektemodel schat de DEC in dat de doelstelling gehaald kan worden.

*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 een bijzondere categorie in deze aanvraag.

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 afgeweken van bijlage III als dieren een canule aangelegd krijgen om continu medicijnen toe te kunnen dienen. De dieren worden dan individueel gehuisvest om te voorkomen dat kooigenoten de canule doorknagen. De DEC vindt dat de individuele huisvesting om deze reden voldoende onderbouwd is. Echter omdat de dieren ook erg ziek worden, merkt de DEC op dat, indien mogelijk, het plaatsen van een Alzet pompje onderzocht zou moeten worden, zodat de dieren nog steeds sociaal gehuisvest kunnen worden. Juist bij dieren die zo ernstig ziek worden, kan het individueel huisvesten zorgen voor extra ongerief.

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*).

Ongeriefinschatting is in overleg met de IvD tot stand gekomen, met gebruikmaking van de Toelichting Codering Ongerief. De dieren worden door de ontsporing van het immuunsysteem ziek. De muizen zullen veel energie gebruiken terwijl ze ook weinig eetlust hebben. De muizen zullen hierdoor snel afvallen. De DEC is van mening dat de dieren ernstig ongerief zullen ondergaan omdat ze zich een aantal dagen (erg) ziek kunnen voelen. De aanvrager geeft aan in een pilot te onderzoeken of eerdere tijdstippen bruikbaar zijn om de vragen te beantwoorden. Dit kan de duur van het ernstige ongerief verkorten. De DEC is van mening dat het induceren van deze cytokinestorm ingeschat moet worden als ernstig, ook als de proef uiteindelijk 'maar' 5 dagen i.p.v. 10 dagen zou duren. De beenmergdonoren worden zonder voorafgaande handelingen gedood. Het ongerief van deze dieren is ingeschat als 'licht' volgens de richtlijn van de NVWA.

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).

Er wordt inbreuk gemaakt op de integriteit doordat de muizen geïnjecteerd worden met substanties om de ziekte op te wekken. Hier aan voorafgaand kunnen de muizen een beenmergtransplantatie ondergaan zodat ze transgene T en/of B cellen zullen hebben tijdens het HLH-model. De muizen zullen hiervoor bestraald worden. Dit tast hun integriteit aan omdat het beenmerg beschadigd wordt om ruimte te maken voor het getransplanteerde beenmerg. De muizen worden erg ziek van het HLH-model waardoor hun natuurlijke gedrag zeer sterk verstoord wordt. Het eventueel huisvesten is ook een inbreuk op het kunnen vertonen van natuurlijk gedrag. Ook wordt er bloed afgenomen. Aan het einde van de proef wordt de muis gedood.

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*).

Het HEP is gedefinieerd als ziektescore 3. Dit is een score waarbij pilo-erectie, sterk verminderd actief gedrag, gebogen houding en meer dan 20% gewichtsverlies voorkomt. In de grafiek is te zien dat het gewichtsverlies vooral in de eerste twee dagen optreedt en dan min of meer stabiliseert. Het HEP van 20% gewichtsverlies zorgt er voor dat dieren waarbij het gewichtsverlies niet stabiliseert vroegtijdig uit de proef gehaald worden. Dit beperkt het ernstige ongerief. De DEC heeft aanvullende vragen gesteld of het HEP kan voorkomen dat er dieren dood gevonden zullen worden in het experiment. De aanvrager heeft in de paragraaf over de HEP aangegeven dat als dieren nog geen 20% zijn afgevallen maar er zo slecht aan toe zijn dat de kans dat dieren zullen overlijden groot wordt geacht, ze ook uit de proef genomen zullen worden.

De DEC heeft ook gediscussieerd over de relatie van deze HEP met het



uitvalspercentage. De aanvragers geven aan dat 50% van de muizen het HEP kan bereiken. Al zullen ze proberen om dit terug te brengen tot 30% in de pilots. Bovendien zijn de muizen die een HEP bereiken nog steeds heel waardevol voor het onderzoek, en zouden niet als 'uitval' beschouwd moeten worden. Deze dieren worden ook geanalyseerd. In deze gevallen overlappen de wetenschappelijke eindpunten met de HEPs. Desondanks zou de 'uitval' sterk beperkt kunnen worden als het HEP als 25% gewichtsverlies gedefinieerd zou worden. In de grafiek is te zien dat het gemiddelde gewichtsverlies rond de 20% is. De DEC schat in dat het ongerief wel (sterk) beperkt wordt door dieren die meer dan 20% gewicht verliezen uit de proef te halen. Deze dieren stabiliseren niet en lopen meer risico om te sterven tijdens de proef. De aanvrager voorkomt dit door dit HEP te kiezen. De DEC vindt dit gekozen HEP daarom passend. De DEC geeft de voorkeur aan het zoveel mogelijk beperken van het ernstige ongerief voor de individuele muis, ook al heeft dit als consequentie dat er meer dieren gebruikt moeten worden en zodoende ook meer dieren ernstig ongerief zullen ondergaan.

### 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*).

De aanvrager zal humaan materiaal gebruiken om de resultaten uit het proefdiermodel direct te toetsen voor de humane situatie. Het proefdiermodel is nodig om de communicatie tussen de verschillende immuuncellen en de aangedane weefsels in kaart te brengen. De DEC vindt het voldoende aannemelijk dat voor deze onderzoeksvragen een proefdiermodel noodzakelijk is.

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*).

Het maximale aantal dieren per groep is geschat op basis van een powerberekening met eerdere experimentele data. Er is ook rekening gehouden met uitval omdat verwacht wordt dat relatief veel muizen (tot 50%) een HEP zullen bereiken. De aanvrager geeft aan dat deze dieren wel geanalyseerd zullen worden en ook bijdragen aan het beantwoorden van de onderzoeksvragen. De DEC vindt dit een belangrijk aspect. Het ondergaan van het ernstige ongerief is dan tenminste niet voor 'niets' geweest. Om voldoende statistische power te hebben op de verschillende tijdstippen moeten er echter wel voldoende dieren overblijven. (Zie ook punt 13 over het HEP). De rekensom voor het totaal aantal dieren is navolgbaar en lijkt realistisch ingeschat te zijn.

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*).

Dit model zal ernstig ongerief veroorzaken in de muizen. Gezien de vraagstelling valt dit niet te voorkomen. Binnen dit kader vindt de DEC 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 onderzoekers verschillende pilots zullen uitvoeren om te bepalen of de onderzoeksvragen ook op een eerder tijdstip in het model beantwoord kunnen worden en om te onderzoeken of het bereiken van ziektescore 3 beperkt kan worden;
- 2) de onderzoeksstrategie erop gericht is om eerst op een grove manier te bepalen of CD40 wel betrokken is bij de pathogenese van HLH, met CD40KO muizen, voordat

er vervolgonderzoeken gestart worden;

3) er een HEP gedefinieerd is op ziekte verschijnselen én niet meer dan 20% gewichtsverlies, zo wordt het ernstige ongerief zoveel mogelijk beperkt;

4) er wordt geen pijnstilling gebruikt maar de DEC verwacht dat het meeste ongerief veroorzaakt wordt door het zich ziek voelen en niet zozeer door pijn;

5) de dieren hoogenenergetisch voer krijgen.

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.

n.v.t.

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

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

Er zal in dit onderzoek gebruik gemaakt worden van mannelijke en vrouwelijke muizen.

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, geeft ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

Alle dieren worden in het kader van het onderzoek gedood.

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

n.v.t.

*NTS*

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 beantwoorden van de onderzoeksvraag "Inzicht krijgen in de werking van het immuun checkpoint eiwit CD40, alsook de mediators en signaleringsmoleculen die betrokken zijn bij de CD40 signaleringscascade, in een HLH muismodel en hoe deze het ziekteverloop beïnvloeden", het gebruik van 1222 muizen die licht (6%:82/1222) tot ernstig (94%: 1140/1222) ongerief kunnen ervaren door dit onderzoek?

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 op korte termijn in dit fundamentele en translationele project zijn de proefdieren en de onderzoekers (zie ook het antwoord bij vraag C5).

Op de langere termijn bestaan de belanghebbenden uit patiënten met HLH. De toepassing van deze kennis in patiënten valt buiten het directe onderzoeksdoel van deze studie. Het belang van de patiënten dat een behandeling wordt gevonden is zeer groot maar of dit project daar direct aan bijdraagt is onzeker. Het belang van de bijdragen van het project wordt daarom op dit moment ingeschat op een gering voordeel. De (meerderheid van de) DEC is wel van mening dat dit op langere termijn wel een groot belang kan worden.

De muizen worden direct door dit onderzoek geschaad zoals beschreven onder punt 11 en 12. De andere groep belanghebbenden, namelijk de onderzoekers, zullen door dit onderzoek hun kennis en inzichten vergroten, welke gedeeld zullen worden met het wetenschappelijk veld. Aanvullende belangen van onderzoekers zouden kunnen zijn dat het onderzoek hun carrière mogelijkheden vergroot door publicaties.

Hoewel maximaal 1222 muizen gebruikt zullen worden voor dit onderzoek, waarvan 1140 dieren ernstig ongerief zullen ervaren, acht de meerderheid van de DEC dit gerechtvaardigd door de verwachte nuttige gevolgen van dit onderzoek. Het wetenschappelijk en maatschappelijk belang is in dit project duidelijk geformuleerd en dit projectvoorstel zal hier aan bijdragen. De meerderheid van de DEC waardeert de verwachte resultaten die kunnen leiden tot een betere behandeling van HLH, als de meest zwaarwegende waarde die tegen het gebruik en het ongerief van maximaal 1222 muizen opweegt.

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*).

### **Kan een behandeling gericht op de CD40 signalering de acute immuunziekte "hemofagocytair lymfocytose" remmen in muizen?**

Het antwoord op de centrale morele vraag was niet unaniem bij dit project. Voor één DEC lid wegen de verwachte opbrengsten niet op tegen het ernstige ongerief dat de muizen moeten ondergaan. In het beantwoorden van de morele vraag zal uitgegaan worden van het meerderheidsstandpunt maar wordt ook het minderheidsstandpunt verwoord.

De (meerderheid van de) DEC is van mening dat het onderzoeken van de vraag "Inzicht krijgen in de werking van het immuuncheckpoint eiwit CD40, alsook de mediators en signaleringsmoleculen die betrokken zijn bij de CD40 signaleringscascade, in een HLH muismodel en hoe deze het ziekteverloop beïnvloeden", het gebruik van 1222 muizen en

het licht (6%:82/1222) tot ernstige (94%: 1140/1222) ongerief dat ze kunnen ondergaan door dit onderzoek, rechtvaardigt.

Hemofagocytair lymfocytose is een ontsporing van het immuunsysteem, met name van de macrofagen, die acuut op kan treden bij patiënten die behandeld worden met een chemotherapie of als complicatie bij een virusinfectie. Deze aandoening is levensbedreigend. CD40 speelt een belangrijke rol in de communicatie tussen immuuncellen. In dit onderzoek wordt de hypothese getoetst dat het remmen van deze signalering de immuunontsporing en het ziekteverloop kan remmen. In de muizen worden kunstmatig de macrofagen geactiveerd waardoor een cytokinestorm opgewekt wordt, waarna de rol van CD40 nader bestudeerd zal worden. Er wordt onderzocht of een interventie op de CD40 signalering het ziekteverloop kan remmen.

De DEC heeft geworsteld met deze aanvraag zoals te zien is in het aantal vragen dat de DEC gesteld heeft in meerdere vragenrondes. De grootste worsteling was het rechtvaardigen van het ernstige ongerief bij de proefdieren zonder garantie dat de studie (direct) gaat leiden tot een waardevol medicijn voor de HLH-patiënt. Het model dat gebruikt wordt, zal ernstig ongerief veroorzaken bij de muizen. De dieren zullen maximaal 9 dagen erg ziek zijn. De DEC heeft vooral veel gediscussieerd en extra vragen gesteld over de uiteindelijke mogelijke opbrengsten van dit onderzoek. Er was twijfel of het wel mogelijk is om een ontspoorde immuunrespons nog bij te kunnen sturen. Kan een interventie tijdens een reeds ontspoorde immuunrespons nog voorkomen dat mensen overlijden aan HLH? De aanvragers gaven hier een realistisch antwoord op. Zij konden deze vraag nog niet beantwoorden om de simpele reden dat dit nog niet onderzocht is. De aanvragers onderbouwden wel hun hypothese met een eerder uitgevoerde 'proof of concept' proef in een sepsis model waarbij trafinib in staat was de ontwikkeling van sepsis te voorkomen. Ondanks dat dit niet vergelijkbaar is met het toedienen van trafinib tijdens de ontspoorde immuunrespons (i.p.v. gelijktijdig met het induceren van sepsis), geeft het wel aan dat het mogelijk kan voorkomen dat 'nieuwe' immuuncellen die aangetrokken worden, niet verder ontwikkelen tot het hyperinflammatoire fenotype. Het gaat in deze aanvraag vooral om het onderzoeken van de immuunrespons en de daar bijpassende interventies, waaronder trafinib, op het verloop van de ziekte. Het meerderheidstandpunt van de DEC was uiteindelijk dat deze vermeerdering in kennis, gezien de ernst van de ziekte, opweegt tegen het ernstige ongerief van de dieren. Er is eerst meer kennis nodig over wat de ontspoorde immuunrespons kan afremmen voordat er een behandeling ontwikkeld kan worden voor de HLH-patiënt. Het aantal patiënten die dit per jaar treft, is relatief klein. De meeste DEC-leden vonden dit onderzoek ondanks het relatieve lage aantal patiënten gerechtvaardigd door de ernst en dodelijkheid van deze ziekte. Eén DEC-lid vond het aantal patiënten dat uiteindelijk belang heeft bij de opbrengsten van dit project te klein om het ernstige ongerief van maximaal 1140 muizen te rechtvaardigen. Bovendien vond dit DEC-lid ook de uiteindelijke meerwaarde voor de patiënten die in leven zouden blijven door een uiteindelijk medicijn te onzeker omdat er nu nog geen goede voorspelling gedaan kan worden over de kwaliteit van leven na deze behandeling. De patiënten die het betreft vaak ernstig onderliggend lijden hebben.

De aanvragers hebben door de strategie (pilots t.b.v. vermindering en verfijning) en het definiëren van het HEP zoveel mogelijk geprobeerd het ongerief te beperken. Het ongerief blijft ernstig maar dit komt doordat het een model is voor een ziekte waar mensen maar ook deze muizen levensbedreigend ziek door worden. De DEC miste in het voorstel de onderbouwing dat het voorgestelde model transleerbaar is naar HLH in mensen. De extra literatuurverwijzingen en een heldere beschrijving van de vergelijkbare ziekteprocessen in de mens en het model heeft de DEC overtuigd van de waarde van het model.

Het ongerief in deze proeven wordt veroorzaakt door het opwekken van een cytokine storm waardoor de dieren zich echt ziek zullen voelen. Het experiment duurt maximaal 10 dagen. De aanvrager zal in pilots onderzoeken of de duur zoveel mogelijk beperkt kan

worden. Desondanks zullen de muizen deze ontsparing van het immuunsysteem moeten ondergaan en schat de DEC het ongerief als ernstig in, ook bij een kortere duur. De HEP's zijn zo gedefinieerd dat het ernstige ongerief zoveel mogelijk beperkt wordt en voorkomen wordt dat dieren sterven in de proef. De dieren worden vroegtijdig uit de proef gehaald als ze meer dan 20% gewicht verliezen. De DEC heeft besproken of de HEP niet gedefinieerd zou moeten worden als een hoger gewichtsverlies, dit zou het aantal dieren dat nodig is, kunnen beperken. De kans dat muizen dan sterven in de proef neemt dan wel toe. De DEC verkiest uit het oogpunt van verfijning het gewichtsverlies van 20% i.p.v. een hoger percentage (zie C13). Er wordt rekening gehouden met maximaal 50% uitval. 'Uitval' heeft in dit onderzoek echter een andere betekenis dan normaal gesproken. Dieren die eerder uit de proef gehaald worden, zullen wel geanalyseerd worden om de immuunrespons in kaart te brengen. De DEC waardeert dat deze muizen gebruikt worden voor het beantwoorden van de onderzoeksvraag.

De DEC acht het aannemelijk dat de doelstellingen binnen de kaders van het project behaald kunnen worden. De onderzoeksstrategie is logisch en navolgbaar en de uitkomstparameters sluiten logisch en helder aan bij de aangegeven doelstellingen. De DEC heeft hier aanvullende vragen over gesteld om een beter beeld te krijgen (zie antwoord op vraag C4).

De aanvrager legt goed uit waarom er voor deze vragen geen proefdiervrije alternatieven kunnen worden gebruikt (zie C14). De DEC is er van overtuigd dat de aanvrager voldoende kennis en kunde heeft om de doelstellingen te behalen. Tevens verwacht de DEC op basis van deze aanvraag dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken door de onderzoeksstrategie en het gebruik van powerberekeningen. Er is een duidelijk go/no go moment beschreven. Eerst zal het model verfijnd worden in de faciliteit en zal onderzocht worden of CD40 een belangrijke rol speelt. Pas als dit het geval is zullen er vervolggexperimenten uitgevoerd worden waarin ook signaleringseiwitten bestudeerd kunnen worden. Deze go/no go voorkomt dat er proeven worden uitgevoerd terwijl CD40 uiteindelijk geen rol blijkt te spelen. Bovendien zal in de pilots indien 30% van de dieren een HEP bereikt op een bepaald tijdstip alle muizen gedood worden voor analyse. Dit voorkomt extra lijden bij de overige dieren. Uit de pilot moet blijken of de vragen ook op een eerder tijdstip beantwoord kunnen worden waardoor het aantal dagen met ernstig ongerief verkort kan worden.

Dit onderzoek maakt geen gebruik van dieren met een speciale herkomst. Ook is er geen speciale wet- en regelgeving van toepassing op dit project.

Gezien het bovenstaande komt de DEC tot het meerderheidstandpunt dat dit project het gebruik van proefdieren rechtvaardigt.

## E. Advies

### 1. Advies aan de CCD

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

- De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
  - De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen:...
  - De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...
  - De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...
- 2. Het uitgebrachte advies kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt in de DEC. Indien gebaseerd op een meerderheidsstandpunt, 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 niet unaniem tot stand gekomen. We hebben ervoor gekozen om het minderheidsstandpunt van één DEC-lid toch ook te beschrijven in de ethische weging. Het is deel geweest van de discussie waarbij uiteindelijk ieder DEC leden een eigen persoonlijke afweging heeft gemaakt. Beide standpunten zijn daarom in de ethische weging beschreven.

Maar volgens het gevraagde voorbeeld:

Het advies is gebaseerd op een meerderheidsstandpunt. Eén DEC-lid kwam tot een negatief advies. Dit lid is 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 dat er sprake is van ernstig ongerief voor een aanzienlijke groep dieren (1140 van de in totaal 1222 dieren). Dat kan alleen gerechtvaardigd zijn als daar grote en vrij zekere baten tegenover staan, maar dat is zijn optiek niet het geval. Het is wel zo dat de trafenib-behandeling levensreddend kan zijn, dus dat zou een significante baat voor patiënten die het betreft zijn. Maar tegelijkertijd betreft het vermoedelijk niet heel veel patiënten: HLH is met 50-100 Nederlandse gevallen per jaar volgens de onderzoekers een 'zeer zeldzame ziekte', waarvan een uiteenlopend percentage daadwerkelijk overlijdt, maar ook een deel het met de huidige behandelingen al overleeft. Daarbij is onduidelijk hoeveel de overlevingskansen (en kwaliteit van leven) dankzij trafenib zouden gaan stijgen. Zoals hij het begrijpt hebben HLH-patiënten vaak ernstig onderliggend lijden en daarom sowieso al geen goede vooruitzichten, en is het ook maar de vraag hoe effectief de behandeling in de praktijk kan worden ingezet, gezien de korte tijd waarin HLH kritiek kan worden en de tijd die nodig is voor het stellen van de juiste diagnose. Om deze redenen schat hij de baten van het onderzoek niet als heel hoog in, en is hij er dus niet van overtuigd dat deze baten zullen opwegen tegen het ernstige ongerief voor 1140 dieren (plus licht ongerief voor 82 dieren). Derhalve geeft hij een negatief advies. Overigens is hij ook niet overtuigd van de opzet met pilots waardoor het daadwerkelijke experiment bekort kan worden maar behoorlijk veel extra dieren nodig zijn (zo'n 25% van de dieren zit in de pilots), en waarvan de data volgens de onderzoekers niet vergeleken kunnen worden met de data uit het daadwerkelijke experiment."

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*).  
Bij het bespreken van deze projectaanvraag kwam het dilemma naar voren of een behandeling voor een kleine patiëntenpopulatie het gebruik van dieren 'waard' is. Zie de ethische weging hoe de DEC-leden hiermee om zijn gegaan.

## **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.....”



## Formulier

### Projectvoorstel dierproeven

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

### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in. 5.1 lid2h
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in. 5.1 lid2h
- 1.3 Vul de titel van het project in. De rol van het immuun checkpoint eiwit CD40 in secundaire hemofagocyttaire lymfocytose

### 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 2.1 aangekruiste categorieën.

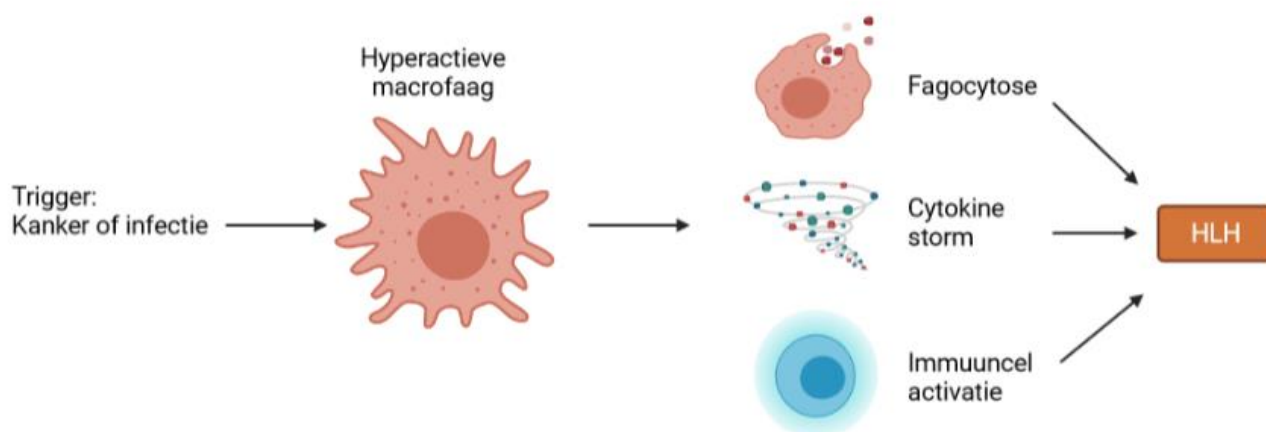
#### Aanleiding:

Secundaire hemofagocyttaire lymfocytose (HLH) is een inflammatoire aandoening die zowel kinderen als volwassenen treft. HLH wordt gekenmerkt door een overmatige activatie van het afweersysteem die wordt uitgelokt door een onderliggende ziekte, zoals een infectie, kanker, immuunziekte, of door immuuntherapieën, zoals chimeric antigen receptor (CAR) T-cel therapie. Dit leidt onder andere tot hoge

koorts, vergroting van lymfeklieren, lever en milt, afbraak van bloedcellen, ernstige schade aan organen, en neurologische verschijnselen. Patiënten zijn hierdoor levensbedreigend ziek en opname op een intensive care afdeling is frequent noodzakelijk. Per jaar worden in Nederland circa 50-100 mensen getroffen door HLH. De huidige behandeling van secundaire (de niet-erfelijke variant) HLH bestaat uit de toediening van ontstekingsremmende medicijnen, zoals hoge dosis dexamethason, en chemotherapie. Daarnaast dient de ziekte die HLH uitlokt, zoals een infectie of kanker, behandeld te worden. Helaas is de huidige behandeling vaak ontoereikend en overlijdt circa 8-54% van de patiënten in de acute fase van HLH (Kleyenberg *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2017). Daarnaast zijn patiënten in de acute fase van HLH vaak te ziek om optimale behandeling van de onderliggende ziekte te krijgen. Aanvullende behandelingen voor de acute fase van HLH zijn dringend nodig om de prognose van patiënten met deze zeldzame aandoening te verbeteren.

### Achtergrond:

De macrofaag, een fagocytair immuuncel, heeft een centrale rol in het ontstaan van HLH. Tijdens HLH is er sprake van hyperactivatie van macrofagen waardoor lichaamseigen bloedcellen 'opgegeten' worden door de macrofagen, wat weer leidt tot overmatige activatie van de andere immuuncellen. Daarnaast worden er te veel schadelijke ontstekingsmediatoren geproduceerd, waardoor uiteindelijk een vicieuze cirkel ontstaat die zich kenmerkt door een levensbedreigende en ongecontroleerde macrofaag-gedreven ontstekingsreactie (Figuur 1). Patiënten worden hierdoor ernstig ziek en een groot deel van de patiënten overlijdt aan multipel orgaan falen. Het afremmen van de hyperactieve macrofagen is dan ook een veelbelovende behandelstrategie voor HLH.



**Figuur 1 HLH ziekteproces** Een trigger, bijvoorbeeld kanker of een infectie, kan leiden tot hyperactivatie van macrofagen. Deze kunnen vervolgens lichaamseigen bloedcellen opeten (fagocytose). Ook produceren de hyperactieve macrofagen veel cytokines, wat kan leiden tot een cytokine storm waarbij ook andere immuuncellen geactiveerd kunnen worden. Deze hyperactivatie van macrofagen is kenmerkend voor de ziekte HLH.

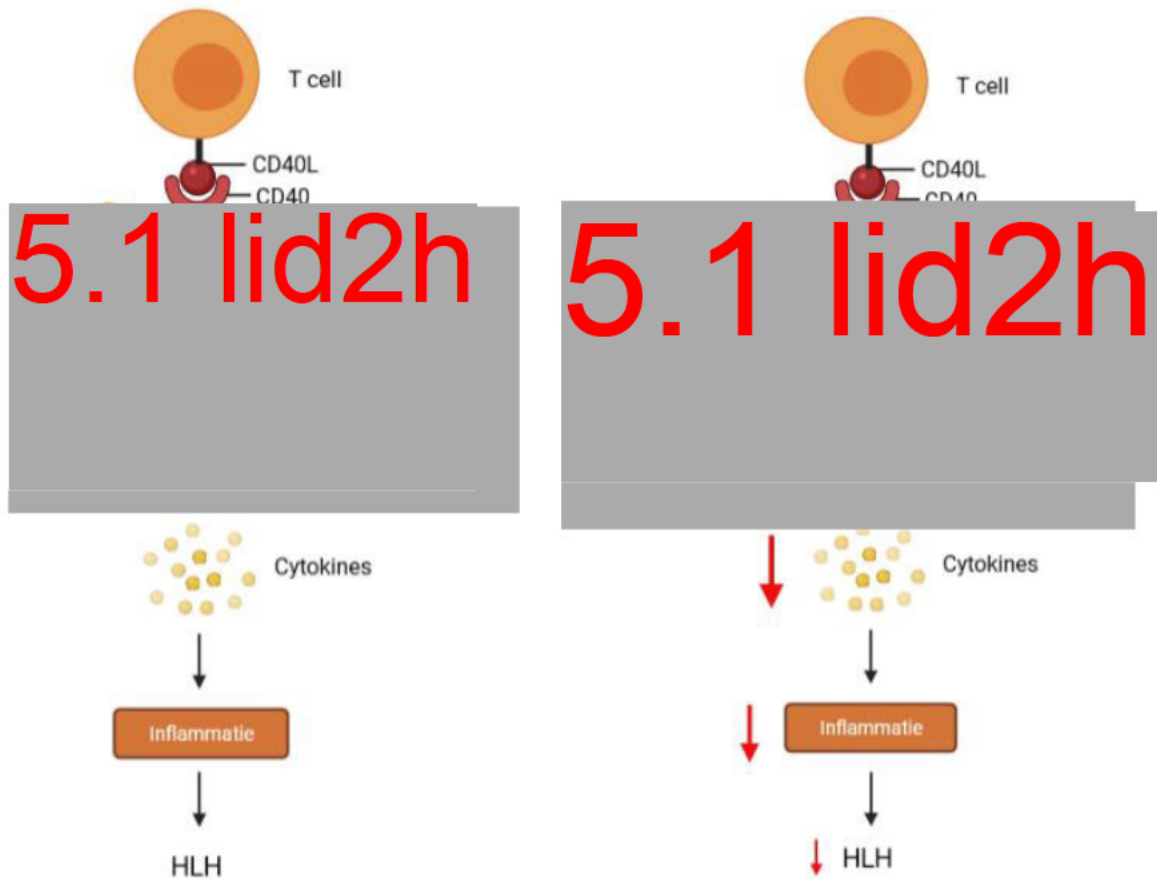
Het immuunsysteem bestaat uit verschillende celtypen (zoals T cellen, B cellen, dendritische cellen, monocytten, en macrofagen) die met elkaar interacteren en zo een immunoreactie kunnen veroorzaken. Activatie van immuuncellen leidt tot de productie van ontstekingsmediatoren, die een belangrijke rol spelen in immuunziekten. De interacties tussen de verschillende immuuncellen worden gemedieerd door immuun checkpoint eiwitten. Immuun checkpoints bestaan uit een receptor-ligand paar, die niet alleen tot expressie worden gebracht op diverse typen immuuncellen, maar ook op epitheelcellen, vetcellen, en zelfs bloedplaatjes. Voorbeelden van immuun checkpoint receptoren-ligand combinaties zijn CD40-CD40L, CD27-CD70, en PD1-PDL1 (Ley *et al.*, 2017). Als een ligand aan de receptor op een immuuncel bindt kan deze interactie zorgen dat een immunoreactie versterkt of juist verzwakt wordt. Op deze manier spelen immuun checkpoint eiwitten een essentiële rol in het immuunsysteem door de activatie status van onder andere T cellen, B cellen, en macrofagen te reguleren tijdens infecties.

Eerder onderzoek van onze groep heeft het belang van diverse immuun checkpoints in het ontstaan van hart- en vaatziekten en obesitas geïnduceerde ontstekingen aangetoond in muizen. Interventies van downstream-mediators van deze immuun checkpoints hebben laten zien dat door het mediëren van immuun checkpoint-gemedieerde-ontstekingsreacties de ernst van atherosclerose en type 2 diabetes afnemen in muizen (Chatzigeorgiou *et al.*, 2014; Lameijer *et al.*, 2018). Dit geeft de potentie aan van het interveniëren in immuun checkpoint-cascades in inflammatie-gedreven ziekten, zoals HLH. In deze aanvraag willen wij ons derhalve richten op het onderzoeken van de rol van immuun checkpoint eiwitten in HLH.

In dit project zal specifiek het immuun checkpoint CD40, alsmede de mediators en signaleringsmoleculen die betrokken zijn bij de CD40 signaleringscascade, onderzocht worden in HLH. CD40 is een activerend immuun checkpoint welke de interactie tussen verschillende immuuncellen kan controleren en reguleren.

5.1 lid2h

. Inhibitie van CD40 signalering 5.1 lid2h laat zeer veel potentie zien in zowel chronisch inflammatoire ziekten zoals atherosclerose en multiple sclerose, als acute inflammatoire ziekten zoals sepsis. Wij verwachten hierdoor dat ook in de acute inflammatoire ziekte HLH een modulering van CD40 signalering therapeutische potentie heeft. In dit project willen wij eerst de rol van het immuun checkpoint CD40, alsmede de mediators en signaleringsmoleculen betrokken zijn bij de CD40 signaleringscascade, onderzoeken in HLH. Vervolgens willen wij onderzoeken of inhibitie van CD40 signalering door middel van het kandidaat-medicijn trafinib 5.1 lid2h een positief effect heeft op het ziekteverloop in HLH. Met de kennis opgedaan in dit project dragen wij bij aan mogelijke immuun checkpoint therapieën voor HLH en kunnen wij een eerste stap zetten naar het ontwikkelen en onderzoeken van deze interventies.



**Figuur 2 Immune checkpoints in HLH** CD40 activatie van macrofagen **5.1 lid2h**, wat leidt tot de productie van cytokines die inflammatie kunnen induceren. Wanneer dit ontregeld ontstaat er hyperactivatie van de macrofaag en dit kan leiden tot HLH. Ons kandidaat-medicijn trafinib kan de CD40 signalering remmen, waardoor de inflammatie reactie afneemt en het ziekteverloop van HLH mogelijk minder ernstig verloopt.

#### Referenties

- **5.1 lid2h, 5.1 lid2e**
- Ley, K., Gerdes, N., & Winkels, H. (2017). ATVB distinguished scientist award: how costimulatory and coinhibitory pathways shape atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 37(5), 764-777.
- **5.1 lid2h, 5.1 lid2e**

#### 3.2 Doel

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

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

Het directe doel van dit project is inzicht krijgen in de werking van het immuun checkpoint eiwit CD40, alsook de mediators en signaleringsmoleculen betrokken zijn bij de CD40 signaleringscascade, in een HLH muismodel en hoe deze het ziekteverloop beïnvloeden. Het uiteindelijke doel is om te onderzoeken of CD40 signalering een aangrijpingspunt is voor een interventie, bijvoorbeeld met trafinib, die gebruikt kan worden voor de ontwikkeling van een behandeling van HLH patiënten.

Verschillende subdoelen moeten behaald worden om tot het directe doel te komen, te weten:

1. Via welke processen reguleren het immuun checkpoint CD40 en de daarbij betrokken mediators en signaleringsmoleculen de activatie van verschillende (immuun)celtypen in een HLH ziektemodel en wat is het effect hiervan op het ziekteverloop.
2. Wat zijn de effecten van interventies (onder andere genetisch, farmacologisch) in deze processen op specifieke (immuun)cel functies die belangrijk zijn bij HLH en hoe beïnvloedt dit het ziekteverloop.

3.2.2 Hoe wordt de haalbaarheid van het directe doel gewaarborgd?

De onderzoeksgroep heeft meer dan 15 jaar ervaring met studies naar immuun checkpoint eiwitten (CD40, CD40L, GITR) en ontstekingsziekten in zowel *in vitro* onderzoek in cellen als *in vivo* in immunologische muismodellen voor vaccinatie, slagaderverkalking, obesitas, en multiple sclerose, hetgeen heeft geresulteerd in meer dan 100 wetenschappelijke publicaties. De onderzoeksgroep is van voldoende omvang (promovendi, postdocs, analisten) om de voorgestelde experimenten uit te voeren. Tevens beschikt het onderzoeksinstituut over de faciliteiten die noodzakelijk zijn voor deze experimenten. Er is binnen onze dierenfaciliteit nog geen ervaring met het HLH model, wij baseren ons model eerdere studies gedaan in een HLH muismodel (Albeituni *et al.*, 2019, Blood). Wel is er al uitgebreide ervaring met andere modellen voor chronische en acute ontstekingsziekten, waaronder atherosclerose, *E.coli* sepsis, polymicrobiële sepsis, en multiple sclerose.

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

Nee

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

### 3.3 Belang

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

#### Maatschappelijk belang

Per jaar worden er in Nederland ongeveer 50-100 mensen gediagnostiseerd met HLH, waarbij 8-54% komt te overlijden in de acute fase van HLH. Met de kennis verkregen in dit project willen we nieuwe immunologische mechanismen ontrafelen die bijdragen aan het ontstaan van HLH bij de muis. Wanneer deze kennis in de toekomst geëxtrapoleerd wordt naar de mens kan CD40 therapie een uitkomst bieden in de behandeling van HLH. Onze onderzoeksgroep [5.1 lid2h](#)

[5.1 lid2h, 5.1 lid2e](#) Wanneer blijkt dat trafinib een mogelijke behandelstrategie is voor HLH in muizen, kan hierdoor sneller de stap worden gemaakt om trafinib in een klinische studie bij HLH patiënten te onderzoeken. Daarnaast blijkt uit eerdere studies dat het muismodel van HLH veel overlap vertoont met het ziektebeeld dat wordt gezien bij HLH patiënten. De voor HLH kenmerkende macrofaag geïnduceerde cytokine storm is vergelijkbaar in mens en muis en wordt gekenmerkt door onder andere een verhoogde productie van de cytokines IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , en IL-6 (Albeituni

et al., Blood, 2019; Henderson & Cron, Paediatr Drugs, 2020). Ook lopen er op dit moment klinische studies naar de effectiviteit van emampalumab (IFN $\gamma$ -blokkerend antilichaam) bij primaire HLH (de erfelijke variant), deze bevindingen zijn gedaan in de muis en zijn in de eerste klinische trials ook al effectief gebleken bij HLH patiënten (NCT03312751; NCT01818492). Dit toont aan dat resultaten behaald in de muis geëxtrapoleerd kunnen worden naar de mens, wat een goede indicatie is dat de bevindingen die in dit project worden gedaan van belang zijn voor het patiënten welzijn en daarmee bijdragen aan het maatschappelijke belang van dit project. Ondanks dat emampalumab effectief lijkt te zijn in de behandeling van primaire HLH, is er een maatschappelijk belang om te blijven zoeken naar alternatieve therapieën van HLH. Voor secundaire HLH kan emampalumab namelijk minder effectief zijn, doordat secundaire HLH een andere oorzaak heeft dan primaire HLH. Waar bij primaire HLH erfelijkheid een grote rol speelt, is de onderliggende oorzaak bij secundaire HLH vaak een infectie of kanker. Emampalumab blokkeert de IFN $\gamma$  respons, een belangrijke respons bij virale infecties, waardoor deze therapie niet geschikt is wanneer de secundaire HLH wordt uitgelokt door een virale infectie. Hierdoor is het van belang om specifiek voor secundaire HLH op zoek te gaan naar nieuwe en betere therapeutische strategieën. Daarom willen wij in dit project onderzoeken of CD40 therapie effectief is in secundaire HLH, doordat CD40 therapie specifiek aangrijpt op de door HLH gedysreguleerde macrofagen, maar ondertussen wel de rest van de immuun respons intact laat.

### Wetenschappelijk belang

Wetenschappelijk gezien zal de kennis die we met dit project vergaren bijdragen aan het begrijpen van de rol van het immuun checkpoint CD40 in HLH, en deze kennis is mogelijk ook relevant voor andere immuun gerelateerde ziekten. [5.1 lid2h](#)

([5.1 lid2h](#), [5.1 lid2e](#))

. Interventies van downstream-mediators van het immuun checkpoint CD40 hebben laten zien dat door het mediëren van immuun checkpoint-gemedieerde-ontstekingsreacties de ernst van atherosclerose en type 2 diabetes afnemen in muizen [5.1 lid2h](#), [5.1 lid2e](#)

. Met dit project kunnen wij verder bijdragen aan het ontrafelen de rol van CD40 in acute immuun ziekten zoals HLH.

### Referenties:

- [5.1 lid2h](#), [5.1 lid2e](#)
- 
- 
- 
- 
- 
- 
- 
-

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

Onderzoeksafdeling: De onderzoeksafdeling doet onderzoek naar immuun checkpoints in immuun gerelateerde ziektes. Dit project draagt bij aan het verkrijgen van meer informatie over het belang van immuun checkpoints in immuunziekten, specifiek voor HLH in dit project.

Onderzoeksveld: Het fundamentele onderzoek in HLH is beperkt. De rol van immuun checkpoints in HLH is minimaal, en dit project zal er aan bijdragen de kennis te vergroten.

Patiënten: Bij HLH overlijden 8-54% van de patiënten door een gebrek aan een adequate behandeling. Dit project draagt bij aan het ophelderend van het ziektebeeld wat de mogelijkheid geeft tot het vinden van nieuwe therapieën bij HLH.

Proefdieren: HLH is een complexe ziekte waarbij het mis gaat in de communicatie tussen immuuncellen. Dit kan niet nagebootst worden met bijvoorbeeld *in vitro* experimenten, waardoor het gebruik van proefdieren nodig is voor dit onderzoek. In dit onderzoek zullen ze ongerief ervaren en worden ze gedood om hun weefsels te kunnen analyseren.

### 3.4 Strategie

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

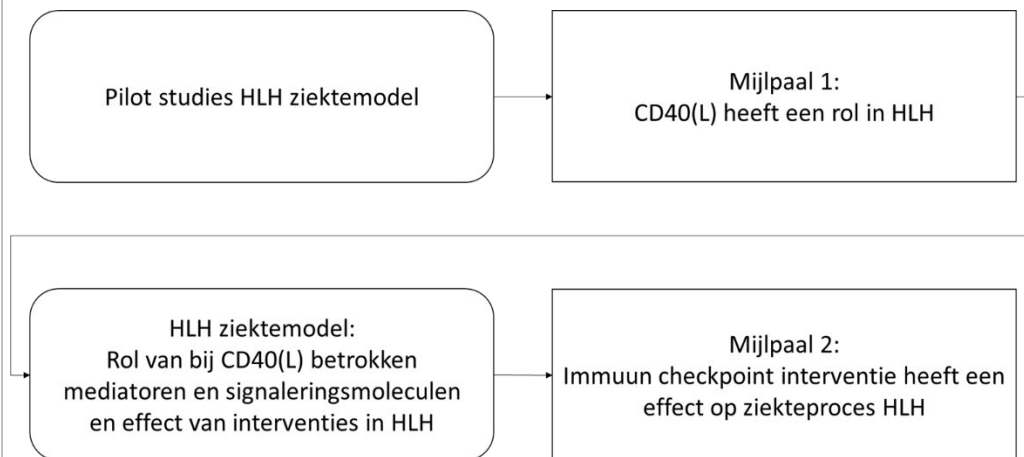
Voordat wij beginnen aan de studie naar de rol van het immuun checkpoint CD40 in het HLH ziektemodel voeren wij eerst pilot studies uit om het ziektemodel goed werkend te krijgen in onze dierenfaciliteit. Om een rol van CD40 in het HLH ziekteproces te bevestigen zullen wij eerst een pilot studie uitvoeren waarbij wij het ziekteverloop van HLH bekijken in transgene muizen met een CD40 of CD40L knock-out en deze vergelijken met wildtype muizen. Daarna zullen wij met een pilot studie bepalen hoe lang de dieren in experiment moeten blijven om onze wetenschappelijke vragen te beantwoorden. Dit doen wij door op meerdere tijdstippen na HLH inductie de dieren te doden, waarna wij onder andere immuun parameters, zoals immuun cel activatie en cytokine productie, zullen meten om het verloop van HLH te bepalen. Dit doen wij zodat de dieren zo kort mogelijk in experiment zijn, waardoor ze minder lang ernstig ongerief ervaren, maar waarbij wij wel nog de effecten van CD40 modulatie op HLH parameters zien. Vanwege de ernst van de ziekte zullen wij na de inductie van HLH de dieren maximaal tien dagen in het experiment houden, maar aan de hand van pilot studies gaan wij dit proberen te verkorten. Echter kan het enkele dagen duren voordat er een effect van een anti-inflammatoire interventie zichtbaar is. Om een gunstig effect van een interventie te karakteriseren kan het nodig zijn om het experiment het maximum van tien dagen te laten duren.

Om HLH te induceren worden de muizen geïnjecteerd met CpG oligodeoxynucleotide (CpG-ODN1826) en anti-IL10R antilichaam. Gedurende de experimenten zal het klinisch verloop van de ziekte worden gescoord (gewichtsverlies) en zullen bloedwaarden (hemoglobine concentratie, bloedplaatjes, witte bloedcellen, cytokines, etc.) worden gevolgd en na doden van de dieren (aan het eind van het experiment of bij het bereiken van het humaan eindpunt) zal uitgebreide analyse van de organen en het immuunsysteem worden uitgevoerd. Zodra het diermodel goed werkend is in onze dierfaciliteit én wij een effect zien van CD40 en/of CD40L knock-out op HLH parameters zullen verdere experimenten van start kunnen gaan (eerste mijlpaal). Dit is tevens een "go/no-go" moment, waarbij verdere experimenten niet uitgevoerd worden als wij het HLH ziektemodel niet lopend krijgen in onze dierenfaciliteit of als er geen effect van CD40 op het HLH ziekteproces blijkt te zijn. De kennis opgedaan in de pilot studie helpt tevens ook bij het behalen van het eerste subdoel, te weten als welke processen reguleren het immuun checkpoint CD40 en de activatie van verschillende (immuun)celtypen in een HLH ziektemodel en wat is het effect hiervan op het ziekteverloop.

Nadat in de pilot studies naar voren is gekomen dat het immuun checkpoint CD40 en/of CD40L een effect heeft op het verloop van HLH, kan dit verder onderzocht worden. Hierbij kan gebruik worden gemaakt van cel-specifieke knock-out modellen of van knock-out modellen van andere mediators en signaleringsmoleculen die betrokken zijn bij de CD40 signaleringscascade. Parallel hieraan kunnen farmacologische interventies die de werkwijze van het immuun checkpoint CD40 potentieel beïnvloeden



worden getest. Dit wordt gedaan door interventies (bijvoorbeeld farmacologisch, antilichamen, siRNA, lncRNA, miRNA) die aangrijpen op het betreffende immuun checkpoint *in vivo* te onderzoeken in het HLH ziektemodel. Hiermee kunnen wij zowel de rol van het immuun checkpoint in HLH verder bevestigen en een eerste stap zetten in een mogelijke therapie voor HLH in de muis. De tweede mijlpaal wordt behaald zodra een immuun checkpoint interventie een effect heeft op het ziekteproces HLH. Er kunnen meerdere interventies getest worden, die direct op CD40 kunnen aangrijpen of op één van de bij de signalering betrokken mediators of moleculen.



**Figuur 3 Strategie** De experimentele workflow met daarin aangegeven de mijlpalen die bereikt kunnen worden in dit project. Eerst worden pilot studies uitgevoerd om het model te verfijnen en een rol van CD40 of CD40L in HLH te bevestigen. Vervolgens kunnen andere bij CD40 betrokken mediators en signaleringsmoleculen of cel-specifieke effecten van CD40(L) knock-out worden onderzocht voor hun rol in het HLH ziekte proces. Tegelijkertijd kan worden gekeken naar het effect van een interventie van het immuun checkpoint op HLH.

### 3.4.2 Onderbouw de gekozen strategie.

De onderzoeksgroep beschikt al over veel ervaring en kennis over de rol van immuun checkpoints in verschillende ontstekingsziekten. De rol van CD40, en ook de modulatie daarvan, op verschillende immuuncellen en cel processen (bijvoorbeeld de voor HLH relevante cel processen proliferatie en cytokine productie) zijn al uitgebreid onderzocht. Hierdoor gaan wij direct de rol van CD40 *in vivo* in het ziektemodel HLH onderzoeken.

In het HLH ziektemodel is het gewichtsverlies van de muis een goede surrogaat parameter om de ernst van HLH te bepalen, mede doordat het gewicht van de muis een snelle en niet-invasieve meetmethode is. Dit maakt gewichtsverlies, welke kan oplopen tot 20% (>20% is een HEP), de meest geschikte parameter die wij kunnen uitlezen om het verloop van de ziekte te bepalen. Ernstig gewichtsverlies is kenmerkend voor HLH en hoort bij het ziekteverloop en is een surrogaat parameter die gebruikt kan worden om het verloop van HLH te monitoren. De muizen hebben algehele malaise waardoor de ze minder eten en tegelijkertijd hebben de muizen een verhoogd energieverbruik als gevolg van de ontstekingsreacties in hun lichaam. Samen zorgt dit er voor dat de muizen ernstig gewichtsverlies zullen ondervinden. Veel immunologische parameters die de ernst van de ziekte, en het eventuele effect van het immuun checkpoint, aangeven kunnen namelijk pas achteraf bepaald worden. Een aantal parameters, zoals ontstekingswaarden in het bloed, kunnen wel gedurende het experiment worden bepaald. Deze kunnen alleen niet meerdere malen per dag bepaald worden, zoals bij de mens gebeurt, aangezien dit zorgt voor te veel ongerief bij de muizen. Gewichtsverlies dient dus als surrogaat parameter tijdens het experiment om het verloop van HLH te bepalen bij de muizen en zo onze wetenschappelijke vraag te beantwoorden. Achteraf kan het effect van een interventie bepaald worden door immunologische bepalingen te analyseren.

Om de betrokkenheid van CD40 per immuun celtype te onderzoeken zal soms gebruik worden gemaakt van een beenmergtransplantatie waardoor specifiek naar de effecten van uit het beenmerg afkomstige

immuuncellen gekeken kan gaan worden, of met de transfer van B- en/of T cellen van transgene muizen in muizen zonder eigen T en/of B cellen. Dit is een aanpak die een snellere maar vooral efficiëntere route is naar beter begrip van de functie van een gen in immuuncellen in de ontwikkeling van HLH en het voorkomt complexe kruisingen waarbij veel muizen nodig zijn. Derhalve draagt dit dus bij aan een efficiënter proefdiergebruik.

Wanneer interessante bevindingen, zoals een biologische relevante verlaging van de cytokine productie of verminderde immuun cel activiteit, worden gedaan *in vivo* zal voor het betreffende immuun checkpoint onderzocht worden of het effect bevestigd kan worden door middel van een interventie op het immuun checkpoint. Dit zal verder het belang van het immuun checkpoint in HLH onderstrepen en is ook een eerste stap in de richting van het bepalen en onderzoeken van een therapeutische strategie.

Om de rol van de kandidaat immuun checkpoint te verifiëren kunnen wij interventies toedienen gericht op het immuun checkpoint. Hiervoor kunnen wij gebruik maken van geneesmiddelen, liganden, of cellen die wij bij de muizen zullen injecteren. Dit kunnen al bestaande geneesmiddelen zijn, bijvoorbeeld antilichamen, die gericht zijn tegen ons kandidaat immuun checkpoint en mogelijk een toepassing hebben in HLH. Ook zullen wij de effectiviteit van door ons ontworpen geneesmiddelen, onder andere trafinib, aangrijpend op de CD40 signaleringscascade onderzoeken in HLH.

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

Volgnummer	Titel bijlage Beschrijving dierproef
1	Muizenmodel Hemofagocyttaire Lymfocytose (HLH)
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

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

### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in. 5.1 lid2h
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in. 5.1 lid2h
- 1.3 Vul het volgnummer en de titel van de dierproef in.
- |  | Volgnummer | Titel dierproef                               |
|--|------------|---|
|  | 1          | Muizenmodel voor Hemofagocyttaire Lymfocytose |

*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.3 van het format Projectvoorstel.*

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

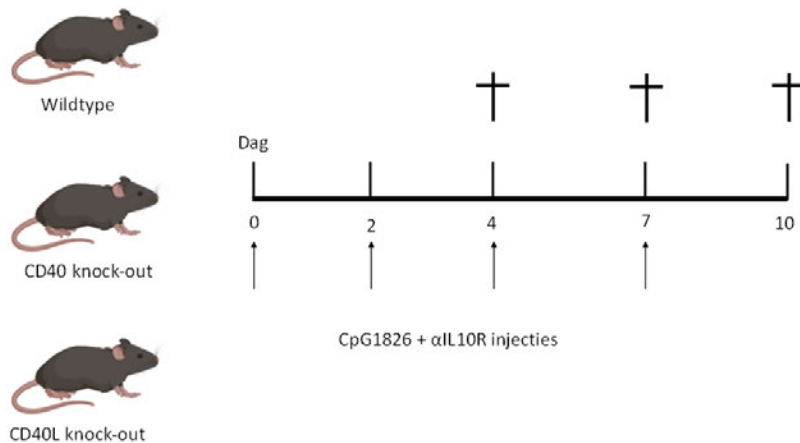
Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

Afhankelijk van het immuun checkpoint (o.a. CD40 of CD40L) of de betrokken mediators of signaleringsmoleculen die bestudeerd worden zullen transgene, knock-in, knock-out, of conditionele (bijvoorbeeld cel specifieke of induceerbare) muismodellen gebruikt worden. Deze muizen zullen vervolgens onderworpen worden aan het HLH model en zo kan de rol van het immuun checkpoint CD40 en de betrokken mediators of signaleringsmoleculen in kaart worden gebracht, waarna interventies onderzocht kunnen worden. Het effect van de kandidaat op HLH kan gemeten worden aan de hand van de ernst en de duur van de symptomen. De primaire uitkomstparameter is gewichtsverlies, welke al snel na inductie van HLH zichtbaar is en na ongeveer vier dagen stabiliseert (Albeituni *et al.*, Blood, 2019). De dieren verliezen veel gewicht vanwege onder andere een verminderde eetlust en verhoogd energieverbruik ten gevolge van de cytokine storm. Andere uitingen van een cytokine storm zoals koorts, anemie, hypotensie, of heptosplenomegalie ontstaan vaak parallel aan het gewichtsverlies, maar zijn geen specifieke prodromen voor het cytokine release syndroom en dus voor HLH. Gewichtsverlies is zeer geschikt als surrogaatparameter om een indicatie te krijgen van de ernst van het HLH ziekteverloop en het eventuele effect van een interventie. Aan de hand van pilot studies zullen wij op meerdere momenten bloed afnemen om ontstekingswaarden te meten en zullen wij bekijken of hier een geschikte uitleesparameter tussen zit waardoor wij onze wetenschappelijke vragen eerder in het ziekteproces kunnen beantwoorden en de ziekteduur, en daarmee het ongerief, te verkorten. Bij deze metingen zullen wij kijken naar een verandering in absolute aantallen immuun cellen en veranderingen in immuun cel activiteit, zoals een verhoogde cel proliferatie en verhoogde productie van cytokines. Voor een aantal analyses, zoals histologie, flow cytometrie, qPCR van de door HLH aangedane weefsels moeten de organen uitgenomen worden. In pilot studies zullen wij de muizen op verschillende tijdstippen doden, om te onderzoeken wat de ideale tijdslijn is waarin wij het ongerief van de muizen beperkt kunnen houden, maar wij wel onze wetenschappelijke vragen kunnen beantwoorden.

#### Aanpak:

**Pilot:** Voor de introductie van dit model in onze dierenfaciliteit zullen pilot proeven uitgevoerd moeten worden. In het kader van verfijning zullen wij meerdere pilots uitvoeren met als doel het ongerief voor de muizen te verminderen en/of de duur van het ongerief te verkorten. Allereerst gaan wij de rol van CD40 signalering in HLH bevestigen door wildtype muizen en CD40/CD40L knock-out muizen te onderwerpen aan het HLH ziektemodel. Alleen wanneer er een effect van CD40 en/of CD40L op het HLH verloop wordt gezien, zullen wij verdere experimenten uitvoeren. Deze kennis draagt tevens bij aan het behalen van het eerste subdoel van dit project, waarin wij onderzoeken via welke processen het immuun checkpoint CD40 en de daarbij betrokken mediators en signaleringsmoleculen de activatie van verschillende (immuun)celtypen in een HLH ziektemodel reguleren en wat het effect hiervan is op het ziekteverloop. Deze eerste pilot studie vormt ook een basis voor verdere pilot experimenten, waarin wij zullen bepalen of het ongerief van de dieren verminderd kan worden. Om ook in de eerste pilot het ongerief niet hoger te laten worden dan strikt noodzakelijk zullen wij op het moment dat meer dan 30% van de dieren een HEP bereikt alle muizen doden en het experiment stopzetten. Dit eindpunt zal dan ook het eindpunt worden van de tweede pilot, waarbij wij zullen bepalen of de tijdslijn van het experiment verkort kan worden, en daarmee ook de duur van het ongerief verminderd wordt.

In een tweede pilot studie gaan wij de muizen op verschillende tijdstippen na HLH inductie te doden, en vervolgens bepalen of er een effect is van de CD40 of CD40L knock-out op HLH. Ook hier geldt, wanneer blijkt dat op een bepaald tijdstip 30% van de dieren het humane eindpunt bereikt van meer dan 20% gewichtsverlies zullen wij alle muizen doden en is dit het eindpunt van de pilot studie. Dieren die het humane eindpunt bereiken worden vervolgens wel gebruikt om de wetenschappelijke vragen te beantwoorden. Aan de hand van analyses op de uitgenomen weefsels en het meten van immunologische parameters zoals cytokine productie en immuun cel activatie markers wordt bepaald of de dieren de voor HLH karakteristieke cytokine storm hebben doorgemaakt. Op deze manier kunnen wij bepalen of het wel of niet noodzakelijk is om de dieren langer in het experiment te houden om onze wetenschappelijke vragen te beantwoorden. Samen zullen deze pilot studies bijdragen aan de verfijning van de experimenten.



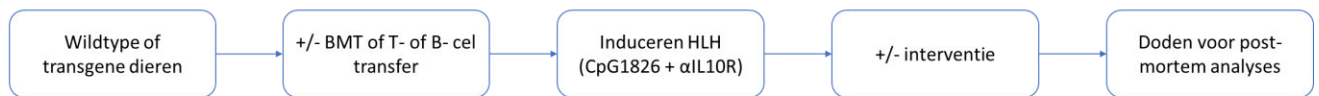
**Figuur 1 Mogelijke opzet pilot studies** In de pilot studies zullen wij eerst de rol van CD40 signalering in HLH bevestigen door gebruik te maken van een CD40 of CD40L knock-out muis. Daarnaast zullen wij in deze pilot experimenten bepalen op welk tijdstip de effecten van de CD40 of CD40L knock-out goed meetbaar zijn en het ongerief voor de muizen niet ernstiger dan strikt noodzakelijk laat zijn om onze wetenschappelijke vragen te beantwoorden. De tijdstippen van het doden van de muizen aangegeven in het figuur dienen enkel als voorbeeld, maar zal maximaal tot dag 10 zijn.

**Experimenten:** Afhankelijk van de conclusies die uit de pilot experimenten worden getrokken worden de muizen over een tijdsbestek van maximaal tien dagen meerdere malen intra peritoneaal geïnjecteerd met CpG1826 en  $\alpha$ IL10R voor de inductie van HLH (Albeituni *et al.*, Blood, 2019). HLH inductie kan eventueel worden voorafgegaan door een beenmergtransplantatie of T- of B cel transfer. Interventie injecties (i.p., i.v., of s.c.) kunnen gegeven worden met factoren die immuun checkpoints reguleren of hun signaaltransductie moduleren zoals small molecules, cytokines, siRNAs, en antilichamen, dit kan zowel voorafgaand of tijdens HLH inductie zijn. Tijdens en aan het einde van het experiment vinden bloedafnames plaats voor biochemische en immunologische bepalingen. Op maximaal tien dagen na de eerste HLH injectie worden de dieren gedood voor de analyse van (immuun)cellen. De experimentele flow is aangegeven in onderstaande figuren:

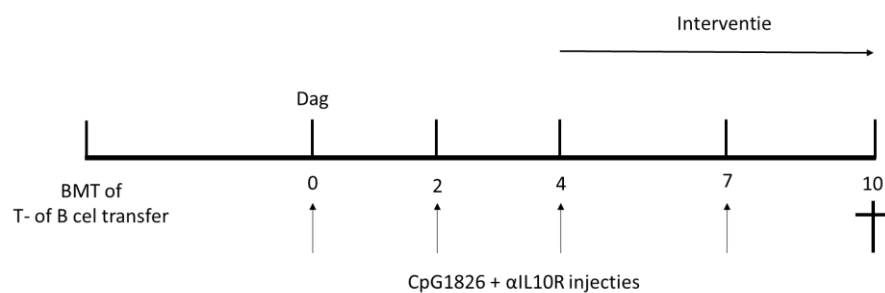
**Subdoel 1: Effect van het immuun checkpoint CD40 en daarbij betrokken mediators en signaleringsmoleculen op HLH**



**Subdoel 2: Effect van het immuun checkpoint interventie op HLH**



**Figuur 2 Algemene experimenten flow** Om de wetenschappelijke vraag te beantwoorden maken wij gebruik van een experimentele flow zoals in het figuur weergegeven. Voor het experiment worden wildtype of transgene (bijvoorbeeld een cel-specifieke CD40 of CD40L knock-out) dieren gebruikt. Het is ook mogelijk dat de muizen een beenmergtransplantatie (BMT) of een T- of B- cel transfer ondergaan om een immuuncel-specifieke knock-out van het immuun checkpoint CD40 of een betrokken mediator of signaleringsmolecuul te verkrijgen zonder kruisingen van een muizenlijn. Vervolgens ondergaan de muizen HLH, waarbij ze geïnjecteerd worden met CpG1826 en  $\alpha$ IL10R. Bij het onderzoeken van een interventie die aangrijpt of het immuun checkpoint CD40 ontvangen de muizen injecties met de interventie gedurende het HLH ziekteproces. Maximaal tien dagen na de eerste injectie voor HLH inductie worden de muizen gedood voor post-mortem analyses.



**Figuur 3 Tijdslijn HLH ziekteproces** Afhankelijk van de pilot experimenten is dit een mogelijke tijdslijn voor de HLH experimenten. Op dag 0 krijgen de muizen de eerste CpG1826 en αIL10R injectie. Een interventie kan toegediend worden na inductie van HLH. Dit kan zoals hierboven aangegeven vanaf dag 4, wanneer naar alle waarschijnlijkheid HLH het meest ernstig is. Afhankelijk van de pilot studies kan er ook besloten worden de interventies eerder of later te starten.

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

#### Handelingen:

**Oorknip:** om dieren te kunnen identificeren zal, alleen indien nodig, in bepaalde experimenten muizen geoorknip worden om ze te kunnen identificeren.

**Beenmergtransplantatie (BMT):** Bij een beenmergtransplantatie wordt het beenmerg van de dieren vervangen door het gewenste beenmerg (geïsoleerd uit donordieren) om zo de effecten van het immuun checkpoint CD40 in de verschillende hematopoëtische cellen te kunnen bestuderen en wat het effect hiervan is op HLH. Voor de vervanging worden de acceptor dieren twee maal bestraald met maximaal 6 Gray en vervolgens i.v. geïnjecteerd met donor beenmerg (geïsoleerd zoals beschreven bij beenmergisolatie) en een herstel van zes weken (ongeveer matig voor de acceptor dieren; ongeveer licht voor donordieren).

**Beenmergisolatie:** Om beenmerg te isoleren worden de dieren gedood en worden de botten geïsoleerd voor cel isolatie.

**T- of B cel transfer:** Bij een T- of B cel transfer worden T cellen of B cellen, met bijvoorbeeld een deletie van het immuun checkpoint CD40 of de daarbij betrokken signaleringsmoleculen, uit de milt en/of lymfeklieren gehaald en worden vervolgens één keer per twee weken (zolang behouden de cellen hun activiteit) gedurende maximaal acht weken intraveneus ingespoten in muizen zonder T- of B cellen om zo de effecten van veranderingen in T- of B cellen te kunnen bestuderen.

**Dieet:** Nat gemaakt hoog energetisch dieet wordt tijdelijk gegeven wanneer de dieren verzwakt zijn door een voorgaande handeling (na bestraling voorafgaand aan BMT) en tijdens HLH inductie.

**HLH model:** Muizen (op een C57BL/6 achtergrond) worden i.p. geïnjecteerd met een TLR9 agonist (CpG1826) en een IL10 receptor antagonist ( $\alpha$ IL10R) (op dag 0, 2, 4 en 7) voor de inductie van HLH (Albeituni *et al.*, Blood, 2019). Tijdens bepaalde experimenten zal op om en nabij dag 2 en 7 bloed worden afgenomen. Door bloed op bijvoorbeeld dag 2 af te nemen, wat mogelijk net voor de start van de interventie is, kunnen wij beter inschatten wat het effect is van de interventie. Maximaal tien dagen na inductie worden de muizen gedood voor analyse van aantallen rode- en witte bloedcellen en bloedplaatjes, en specifieke typen immuun cellen en cytokines.

**Intraperitoneale (i.p.) toediening:** Het intra peritoneaal toedienen van geneesmiddelen, liganden of cellen door middel van een injectienaald. Frequentie hangt af van de proef, maar is maximaal twee keer per dag gedurende maximaal tien dagen. Twee keer per dag kan soms nodig zijn doordat er bij HLH sprake is van een zeer acute en zeer heftige inflammatoire respons is. Om de continue aanwas van activatie en de nieuw geproduceerde immuuncellen tegen te gaan, kan het soms nodig zijn om de dieren twee keer per dag te injecteren. Dit is het absolute maximum, maar wij verwachten de muizen minder vaak te moeten injecteren. Het precieze aantal injecties zal bepaald worden aan de hand van de farmacologische eigenschappen van het geneesmiddel en in overleg met de IvD.

**Subcutane (s.c.) toediening:** Het subcutaan toedienen van geneesmiddelen, liganden of cellen door middel van een injectienaald. Frequentie hangt af van de proef, maar is maximaal twee keer per dag gedurende maximaal tien dagen. Twee keer per dag kan soms nodig zijn doordat er bij HLH sprake is van een zeer acute en zeer heftige inflammatoire respons is. Om de continue aanwas van activatie en de nieuw geproduceerde immuuncellen tegen te gaan, kan het soms nodig zijn om de dieren twee keer per dag te injecteren. Dit is het absolute maximum, maar wij verwachten de muizen minder vaak te moeten injecteren. Het precieze aantal injecties zal bepaald worden aan de hand van de farmacologische eigenschappen van het geneesmiddel en in overleg met de IvD.

**Intraveneuze (i.v.) toediening:** Het intraveneus toedienen van geneesmiddelen, liganden of cellen door middel van een injectienaald. Frequentie hangt af van de proef, maar is maximaal één keer per dag gedurende maximaal tien dagen. Eén keer per dag kan soms nodig zijn doordat er bij HLH sprake is van een zeer acute en zeer heftige inflammatoire respons is. Om de continue aanwas van activatie en de nieuw geproduceerde immuuncellen tegen te gaan, kan het soms nodig zijn om de dieren dagelijks te injecteren. Dit is het absolute maximum, maar wij verwachten de muizen minder vaak te moeten injecteren. Het precieze aantal injecties zal bepaald worden aan de hand van de farmacologische eigenschappen van het geneesmiddel en in overleg met de IvD. Als er vaker dan één keer per dag een i.v. injectie nodig is kan een canule aangelegd worden in de jugularis veine of een Alzet pompje geplaatst worden.

**Plaatsen canule:** Wanneer een interventie één of meerdere keren per dag i.v. geïnjecteerd moet worden kan besloten worden om een canule te plaatsen in de vena jugularis of een Alzet pompje om de belasting voor de muis lager te houden. Vervolgens kan via deze canule de interventie worden toegediend. Deze procedure vindt plaats voor de inductie van HLH.

**Bloedafname:** Bloedmonsters worden genomen voor biochemische analyses (o.a. lipiden, cytokines) en immunologische analyses (o.a. flow cytometrie) met een maximaal van <10% van het circulerend volume per

twee weken. De volgende richtlijn zal worden gevolgd: <https://www.nc3rs.org.uk/mouse-decision-tree-blood-sampling>

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

Het aantal muizen per proef is gebaseerd op statistische berekeningen, rekening houdend met mogelijk uitval van dieren, alsook gebaseerd op eigen ervaring of ervaring van naaste collega's. Hierin wordt rekening gehouden met de hoeveelheden cellen/weefsel die nodig zijn voor de beschreven analyses. Het aantal proeven is gebaseerd op ervaring van de onderzoeksgroep, rekening houdend met de grootte van de onderzoeksgroep en verwachte aantallen experimenten die we willen en kunnen uitvoeren. Voor het uitvoeren van de powerberekening wordt mede gebruik gemaakt van software voor groepsgrootteberekeningen (bijv. nQuery, PiFace en GPower).

Wij willen verschillen tussen immuuncel populaties, cytokines, en activatie markers kunnen aantonen van minimaal 10%, wij verwachten dat dit effect biologisch relevant is. Uit eigen ervaring blijkt dat bij flow cytometrie een inter-groepvariatie is van circa 5-10% (afhankelijk van de exact gekozen uitkomstparameter). Als we uitgaan van een  $\alpha=0.05$ , een power van 80,  $\mu_1=1$ ,  $\mu=0.9$ ,  $\sigma=0.05-0.1$  komen wij uit op een groepsgrootte tussen de 6-17 muizen, we rekenen verder met een gemiddelde van 10 muizen per groep. In de pilot studies zullen wij de proefopzet zodanig proberen te optimaliseren dat niet meer dan 30% van de muizen het humane eindpunt bereikt. Als de wetenschappelijke vragen op een eerder tijdstip beantwoord kunnen worden, zullen namelijk minder dieren het HEP (>20% gewichtsverlies) bereiken. Als uit pilots blijkt dat een later tijdstip nodig is, zullen meer dieren het HEP bereiken. Alle muizen die een HEP bereiken worden geanalyseerd om zo toch een beeld te krijgen van het ziekteverloop. Om er zeker van te zijn dat gemiddeld 10 muizen per groep het einde van het experiment halen, houden wij rekening met een uitval tot 50%. Per groep zullen wij dus maximaal 20 muizen gebruiken, maar in de pilot experimenten zullen wij de uitval van muizen proberen te verminderen waardoor we uiteindelijk kleinere groepen kunnen gebruiken.

## B. De dieren

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

Volgnr.	Diersoort	Herkomst	Levensstadium	Aantal	Geslacht	Genetisch gewijzigd	Stam
6l	Muizen	Eigen fok of commerciële fokkers	6-24 weken	1222	Man en Vrouw	Ja	C57BL/6

Onderbouw de bovengenoemde keuzes.

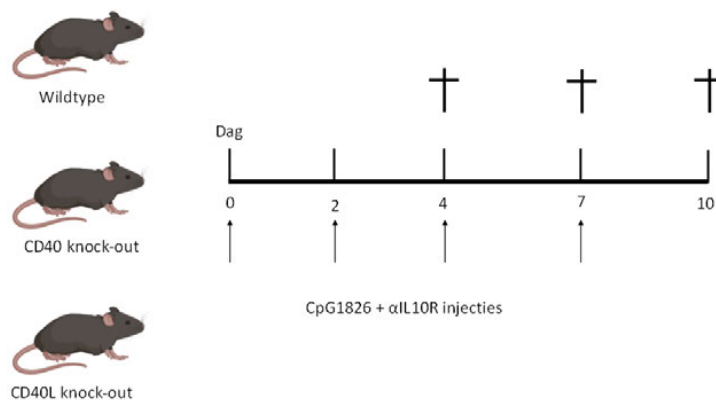
Diersoort	Muizen hebben de voorkeur binnen dit project omdat de groep zeer uitgebreide ervaring heeft met muizen en dit een goed en geaccepteerd model is voor hemofagocytair lymfocytose (Albeituni <i>et al.</i> , Blood, 2019).
Herkomst	Een deel van de muizen, bijvoorbeeld wildtype muizen, kan worden aangeschaft bij commerciële leveranciers. Muizen met specifieke genetische achtergrond zullen in veel gevallen uit eigen fok komen of via samenwerkingsverbanden worden verkregen.
Levensstadia	Afhankelijk van de vraagstelling worden dieren met een bepaalde leeftijd gebruikt. In de meeste gevallen starten de experimenten als de dieren een leeftijd van 6-24 weken hebben.



In de pilot experimenten gaan wij wildtype dieren vergelijken met transgene dieren (CD40 en CD40L knock-out). Per groep worden in de pilot experimenten 15 dieren gebruikt. Als controle nemen wij per genotype een groep mee die geen HLH krijgt, deze groep bestaat uit 10 dieren aangezien hier minder uitval wordt verwacht. Voor dit onderdeel van de pilot studie verwachten wij **75 muizen** te gebruiken (3 x 15 muizen/genotype (HLH) + 3 x 10 muizen/genotype (controle)).

Om de proefopzet te verfijnen door de duur van het experiment proberen te verkorten zullen wij de dieren op bijvoorbeeld drie verschillende tijdstippen na HLH inductie doden (zie figuur). In totaal verwachten wij hiervoor 45 dieren (15 x 3 tijdstippen) per genotype (wildtype/CD40 knock-out /CD40L knock-out) nodig te hebben, voor drie genotypen typen zijn dit **135 muizen**.

Wanneer HLH inductie vooraf wordt gegaan aan een beenmergtransplantatie of een T- of B-cel transfer zullen wij dit door middel van een pilot studie optimaliseren, voor twee pilot studies zijn hiervoor maximaal **72 muizen** nodig (wildtype + wel/geen BMT óf T/B transfer) en twaalf donordieren (4 x 15 dieren + 12). Voor de pilot experimenten zijn in totaal **maximaal 282 muizen** nodig.



Aantal

Na de pilot experimenten verwachten wij drie proeven per jaar te doen, waarbij gevarieerd kan worden met de targetgenen. In deze experimenten worden twee of meerdere genotypes of interventies (bijvoorbeeld wildtype, transgeen, siRNA, small molecules) met elkaar vergeleken en hiervoor zijn, rekening houdend met maximaal 50% die een HEP bereikt, twintig muizen per groep nodig, in totaal dus gemiddeld 180 muizen per jaar uitgaande van drie groepen die met elkaar vergeleken worden per experiment. Tijdens de pilot experimenten proberen wij de proefopzet zodanig te optimaliseren dat minder dan 50% een HEP eindpunt bereikt. Daarnaast zullen de muizen die een HEP eindpunt bereiken wel gebruikt worden in de analyse en zullen op deze manier wel bijdragen aan het beantwoorden van onze wetenschappelijke vragen. Over een periode van vijf jaar verwachten wij **maximaal 900 muizen**.

Daarnaast zijn er donordieren nodig voor de BMT en/of de T- of B cel transfers, waarbij wordt uitgegaan van het feit dat één donordier voldoende beenmerg of T- of B cellen oplevert voor ongeveer vijf acceptor dieren. Wij verwachten dat er bij één van de drie proeven per jaar een BMT of T- of B cel transfer zal plaatsvinden. Totaal zijn er maximaal 200 acceptor dieren, delen door 5 (één donor per vijf dieren) = **40 donor dieren** voor vijf jaar.

Totaal: **maximaal 1222 dieren** voor vijf jaar

Geslacht

Er is geen voorkeur voor mannelijke of vrouwelijke dieren bij dit ziektemodel.

Genetisch gewijzigd	Zowel wildtype als genetisch gewijzigde dieren worden gebruikt, waar mogelijk worden voor de controles wildtype nakomelingen gebruikt. Om de rol van een immuun checkpoint <i>in vivo</i> te onderzoeken zal het in veel gevallen nodig zijn om hiervoor genetisch gemodificeerde muizen te gebruiken, waarbij bijvoorbeeld een deletie is van de kandidaat immuun checkpoint. We verwachten niet dat er lijnen met constitutioneel ongerief ('fok met ongerief') gebruikt zullen worden. De huisvesting binnen de dierverblijven is zodanig dat immuungecompromiteerde dieren geen schade ondervinden van hun genotype. Momenteel is het een discussiepunt of deze lijnen toch onder een 'fok met ongerief'-vergunning gefokt moeten worden. Indien deze genetische lijnen toch onder een vergunning gefokt moeten worden, zal dit onder een generieke vergunning van het onderzoeksinstituut gefokt (gaan) worden.
Stam	Wij gebruiken C57BL/6 muizen, waarvan bekend is dat ze geschikt zijn voor inductie van HLH (Albeituni <i>et al.</i> , Blood, 2019). Ook heeft onze onderzoeksgroep al zeer veel ervaring met deze stam.

### C. Huisvesting en verzorging

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

Ja

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

Dieren die gecannuleerd worden, moeten alleen gehuisvest worden om te voorkomen dat de cannules doorgebeten worden door kooigenoten.

### D. Pijn en welzijnsaantasting

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

Nee >

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

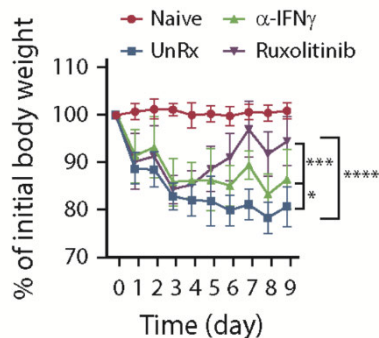
Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

Operaties voor het plaatsen van een canule in de vena jugularis of het plaatsen van een Alzet pompje zal onder volledige anesthesie worden uitgevoerd. De fysiologische status van de muizen wordt tijdens de gehele procedure goed gemonitord en wanneer nodig wordt de dosis anesthesie omhoog of omlaag aangepast.

Verdere pijnstilling tijdens HLH wordt niet gebruikt aangezien dit onverenigbaar is met de proefopzet. De meeste pijnstilling werkt ontstekingsremmend en zal dus ook de HLH-geassocieerde ontsteking remmen. We kiezen ervoor om geen opiaten als pijnstilling te geven, omdat wij de bijwerkingen van het gebruik van opiaten (obstipatie, misselijkheid en sufheid) niet vinden opwegen tegen de pijn die de dieren ervaren vanwege de HLH.

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

1. BMT: verminderde eetlust en gewichtsverlies
2. De dieren kunnen stress ondervinden, irritatie, en pijn ten gevolge van het injecteren van de interventies.
3. HLH specifiek ongerief: ernstig gewichtsverlies, algehele malaise, en anemie. Een gewichtsverlies van 20% is onderdeel van het ziektebeloop tijdens HLH en de dieren zullen het gehele experiment ondergewicht houden (HEP is maximaal 20% gewichtsverlies ten opzichte van het gewicht aan de start van het experiment). De eerste dagen na inductie van HLH vertonen de muizen het meeste gewichtsverlies, dit stabiliseert daarna rond de 80% van het startgewicht van de muis. (Albeituni *et al.*, Blood, 2019, figuur 1B (zie hieronder)).



Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

1. Na de BMT is er tijdelijke uitputting van het beenmerg en milde stralingsschade waardoor dieren darmschade krijgen.
2. Toediening (s.c., i.p. of i.v) van interventie die immuun checkpoint regulatoren moduleren. De dieren worden hierbij regelmatig geïnjecteerd.
3. De cytokine storm en acute immuun activatie induceert direct gewichtsverlies. De muizen hebben verminderde voedselinname door algehele malaise en een verhoging van het energieverbruik ten gevolge van acute inflammatoire conditie, samen draagt dit bij aan ernstig gewichtsverlies.

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

1. Gedurende maximaal drie weken na BMT worden de dieren gevoerd met hoogenergetisch natgemaakt voer.
2. Maximale volumina worden bepaald op basis van beschikbare literatuur (Diehl *et al.*, 2001). De dieren worden goed gemonitord.
3. De dieren worden goed gemonitord en de humane eindpunten worden toegepast zodra er meer gewichtsverlies is dan vooraf verwacht had kunnen worden. De dieren worden tijdens HLH gevoerd met hoogenergetisch voer om het gewichtsverlies te beperken.

## E. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag F.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

In het algemeen geldt: Bij het bereiken van humane eindpunten (d.w.z. verminderd exploratief gedrag in combinatie met tekenen van algemeen onwelzijn – openstaande vacht, abnormale houding, of bij dieren zonder HLH een gewichtsverlies >15% t.o.v. hoogst gemeten of >10% t.o.v. vorige weegpunt over een periode van twee tot drie dagen zal overgegaan worden tot het doden van dat specifieke dier.

Verder zijn er nog specifieke humane eindpunten:

**A. Beenmergtransplantatie:** Verminderde activiteit, onverzorgde vacht, houding of enige andere afwijking zoals beschreven in de SOP van de faciliteit evenals gewichtsverlies >15% ten opzichte van het hoogst gemeten of >10% ten opzichte van het vorige weegpunt over een periode van twee dagen.

**B. Ziekte score voor het HLH model:**

Om vast te stellen of muizen ongerief ondervinden observeren we het gedrag en het gewicht van de muis. Deze observaties resulteren in een ziekte score die de basis zijn voor de humane eindpunten.

0: gezonde muis

1: Onverzorgde vacht en verminderde activiteit, minder dan 10% gewichtsverlies

2: Recht opstaande haren (pilo-erectie), minder actief gedrag, gebogen houding, 10-20% gewichtsverlies.

3 (HEP): Pilo-erectie, sterk verminderd actief gedrag, gebogen houding, en meer dan 20% gewichtsverlies.

Muizen zullen tijdens het experiment ernstig gewichtsverlies doormaken en zeer ziek zijn, dit is een beschreven beeld in het ziekteverloop van HLH. Het gewichtsverlies kan oplopen tot 20% ten opzichte van het startgewicht van de muis en is een goede surrogaat parameter voor andere uitingen van HLH zoals anemie, hypotensie en hepatosplenomegalie. Muizen met méér dan 20% gewichtsverlies ten opzichte van het startgewicht, ziektescore 3, zullen uit de studie gehaald worden, omdat dit als humaan eindpunt is gedefinieerd. Dieren die zo ernstig ziek zijn dat verwacht kan worden dat ze snel (de komende 12 uur) kunnen overlijden maar nog niet meer dan 20% zijn afgevallen, zullen ook gedood worden. Hierdoor kunnen deze dieren ook nog gebruikt worden voor wetenschappelijke analyses.

---

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

A: 2%

B: 50% (In de pilot experimenten proberen wij het diermodel te verfijnen waardoor dit percentage lager zal uitvallen. Daarnaast is het bereiken van een HEP ook een wetenschappelijk eindpunt, deze dieren worden wel in de analyse worden gebruikt en moeten dus niet als 'uitval' gezien worden).

---

**F. Classificatie van ongerief**

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

---

Procedure	Stam	Geslacht	Aantal dieren	Cumulatief ongerief	Handelingen die leiden tot ongerief
Pilot (HLH)	WT/TG	M/V	240	Ernstig	Oorknip (licht), BMT (matig), T- of B cel transfer (matig), inductie HLH (ernstig), bloedafname (licht), doden (licht)
Pilot (Placebo)	WT/TG	M/V	30	Licht	Oorknip (licht), injecties placebo (licht), bloedafname (licht), doden (licht)
Experimenten	WT/TG	M/V	900	Ernstig	Oorknip (licht), BMT (matig), T- of B cel transfer (matig), operatie voor zetten van canulatie/Alzet pompje (matig), inductie HLH (ernstig), interventie injecties (i.p., i.v., s.c.) (matig), bloedafname (licht), doden (licht)
Beenmerg donoren	TG	M/V	52	Licht	Doden (licht)
<b>Totaal</b>			1222	Licht: 82 Matig: 0 Ernstig: 1140	

### G. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging	HLH is een complexe immuun ziekte waarbij het met name mis gaat bij de 'communicatie' tussen de verschillende cellen in het immuunsysteem en de aangedane weefsels. Diermodellen zijn nodig om zowel de interactie tussen de immuuncellen te kunnen bestuderen, alsmede het effect hiervan op de door HLH aangedane weefsels. Parallel aan de studies met muismateriaal worden ook studies met humane cellen gedaan om in een vroeg stadium een relatie van bevindingen in de humane situatie te kunnen leggen. In patiënten materiaal zoals bloed kunnen wij ontstekingswaarden (o.a. cytokine productie, en immuuncel activatie) bepalen, om te onderzoeken of deze overeen komen met ons muismodel.
------------	--

<p>Vermindering</p>	<p>Ons onderzoekslab heeft al zeer veel ervaring met immuun checkpoints, waardoor al veel kennis beschikbaar is over de functie van immuun checkpoints, zoals CD40, in homeostase en in immuun ziekten zoals multiple sclerose, obesitas, en slagaderverkalking (Chatzigeorgiou <i>et al.</i>, 2014; Lameijer <i>et al.</i>, 2018; Kusters <i>et al.</i>, 2018; Aarts <i>et al.</i>, 2019; Reiche <i>et al.</i>, 2019). Hierdoor weten wij dat CD40 belangrijk is in de door HLH aangedane cel processen, wat de kans van slagen van dit project groot maakt. Er zijn al zeer goede <i>in vitro</i> karakterisaties gedaan in cel modellen (cellijnen, primaire muiscellen en humane cellen), waardoor wij in dit project geen extra muizen hoeven te gebruiken voor <i>in vitro</i> experimenten om de rol van CD40, en de daarbij betrokken mediators en signaleringsmoleculen, te onderzoeken. Hierdoor kunnen wij in dit project keuzes maken voor specifieke aanpakken gebaseerd op <i>in vitro</i> studies, en dit leidt tot specifiekere proeven en minder diergebruik.</p> <p>Er wordt ook deels gewerkt met beenmergtransplantatie studies waarbij door het transplanteren van beenmerg uit één enkele muis het immuunsysteem van vijf muizen wordt gerepopuleerd. Dit leidt tot een sterke vermindering van het aantal dieren vergeleken met het aantal dieren dat nodig zou zijn wanneer de juiste genotype verkregen zouden moeten worden door middel van kruisingen.</p> <p>Power berekeningen worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken. Bevindingen uit de literatuur (Albeituni <i>et al.</i>, Blood, 2019) worden meegenomen bij de power berekeningen. We hebben nu op basis van bekende gegevens een poweranalyse gedaan. Voor ieder experiment zal een nieuwe poweranalyse gedaan worden zodat het experiment met het minimum aantal dieren uitgevoerd wordt waarmee nog een betrouwbaar resultaat verkregen kan worden. Door de voorafgaande pilots om het model te optimaliseren, hopen we ook het aantal dieren dat gebruikt gaat worden in de experimenten te verminderen.</p>
<p>Verfijning</p>	<p>Aan de hand van meerdere pilot experimenten proberen wij de proefopzet te verfijnen. Dit doen wij onder andere door de muizen op verschillende tijdstippen te doden na HLH inductie, en op deze manier te kijken of wij op een eerder tijdstip al het effect van een interventie op het HLH ziekteproces kunnen zien. Daarnaast is het bereiken van een HEP óók een wetenschappelijk eindpunt. De dieren die het einde van het experiment niet halen vanwege het bereiken van een HEP zullen gebruikt worden voor post-mortem analyses. Hierdoor worden deze muizen toch gebruikt om meer inzicht te verkrijgen in de pathogenese van deze aandoening.</p> <p>Waar mogelijk zal het aantal handelingen van de muis, met name de injecties, zo laag mogelijk worden gehouden. Er wordt de voorkeur gegeven aan geneesmiddelen die met een minimale frequentie worden gegeven, maar vanwege de farmacologische eigenschappen, bijvoorbeeld een hoge halfwaardetijd of slechte oplosbaarheid, van een geneesmiddel zal er soms vaker geïnjecteerd moeten worden. Wij zullen de dieren niet over een langere periode injecteren dan strikt noodzakelijk. Wanneer wij de dieren meer dan één keer per dag intraveneus moeten injecteren zullen wij een canuleren of een Alzet pomp gebruiken, om het ongerief lager te houden. Hierbij heeft het plaatsen van een Alzet pomp de voorkeur, aangezien deze dieren niet individueel gehuisvest hoeven te worden.</p> <p>Een deel van de muizen zal een genetische modificatie hebben of een interventie krijgen, waardoor het ziektebeeld minder ernstig wordt. Hierdoor zal het uiteindelijke ongerief bij deze muizen ondanks de inductie van HLH lager zijn.</p> <p>Mannelijke muizen worden om vechten te voorkomen in groepjes van drie tot vier muizen gehuisvest en krijgen twee huisjes. Ook zullen de transplantatie dieren indien nodig met hoogenergetisch week gemaakt voer gevoed worden.</p>
<p>Zijn er nadelige milieueffecten te verwachten?</p>	

Nee

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

#### H. Hergebruik

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

Nee, ga verder met vraag I.

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

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

Nee

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

#### I. Herhaling

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

Niet van toepassing

#### J. Plaats waar de dierproef wordt uitgevoerd

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

Nee > Ga verder met vraag K.

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

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

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

Worden de dieren gedood?

Nee > Beschrijf de bestemming van de dieren.

Ja > Geef aan waarom de dieren worden gedood.

Er dienen cellen en/of organen uitgenomen te worden ten einde verder wetenschappelijke analyses. Indien dieren worden gedood, wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van Richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.

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

Nee > Beschrijf de dodingsmethode

Overdosis anesthesie of kooldioxide, gevolgd door cervicale discolatie of hartpunctie.

Ja > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.

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



**Format Niet technische samenvatting**

Let op: bij gebruik van dit word-format dient uiteindelijk alsnog het Excel-format te worden ingevuld voordat uw aanvraag vergund kan worden (zie Procesbeschrijving word-document NTS)

## Tab NTS

Country	NL
Language	NI
EU submission	<input checked="" type="checkbox"/> yes <input type="checkbox"/> no
Title of the project	Op zoek naar een behandeling voor de acute immuunziekte hemofagocyttaire lymfohistiocytose
NTS identifier	Deze wordt door de CCD ingevuld
NTS national identifier	Deze wordt door EC ingevuld
Duration of the project	60 (in months)
Keywords	
Keyword 1	Secundaire hemofagocyttaire lymfohistiocytose
Keyword 2	Immuunziekte
Keyword 3	Immuun checkpoint
Keyword 4	Macrofagen
Keyword 5	

**Purpose(s) of the project****Objectives of the project**

Secundaire hemofagocyttaire lymfohistiocytose (HLH) is een zeldzame en levensbedreigende aandoening die zowel kinderen als volwassenen treft. Helaas werken de huidige behandelingen niet goed genoeg en komen veel patiënten te overlijden in de eerste dagen van HLH. In dit project wordt fundamenteel en translationeel onderzoek gecombineerd om een nieuwe behandelstrategie voor patiënten met HLH te ontwikkelen.

De macrofaag, een specifiek type afweercel, heeft een centrale rol in het ontstaan van HLH. Tijdens secundaire HLH is er sprake van overactieve macrofagen, veroorzaakt door bijvoorbeeld een infectie, auto-immuunziekte of kanker (primaire HLH wordt veroorzaakt door een erfelijke oorzaak). Lichaamseigen bloedcellen worden 'opgegeten' en andere afweercellen worden juist overmatig geactiveerd. Daarnaast worden er teveel schadelijke ontstekingsstoffen geproduceerd. Uiteindelijk ontstaat er een vicieuze cirkel die zich kenmerkt door een levensbedreigende en ongecontroleerde ontstekingsreactie. Patiënten worden hierdoor ernstig ziek en komen vaak te overlijden doordat meerdere organen niet meer functioneren. Het afremmen van de overactieve macrofagen is dan ook een veelbelovende behandelstrategie voor HLH.

De activiteit van macrofagen wordt onder normale omstandigheden strikt gereguleerd door eiwitten op het oppervlak van de cel om te veel activiteit te voorkomen. Eén van de belangrijkste eiwitten op de macrofaag is CD40. Dit stimulerende eiwit zorgt ervoor dat de macrofagen meer ontstekingsstoffen produceren en op hun beurt weer andere afweercellen activeren. Eerder onderzoek van onze onderzoeksgroep heeft aangetoond dat het remmen van CD40 in macrofagen een effectieve manier is om activatie van de macrofaag te voorkomen. Op basis van deze bevindingen hebben wij een nieuwe remmer van CD40 in macrofagen ontwikkeld. Dit mogelijke medicijn, genaamd trafinib, voorkomt overactiviteit van macrofagen en vermindert de productie van ontstekingsstoffen. In diermodellen heeft trafinib een gunstig effect op verschillende ontstekingsziekten, zoals aderverkalking, multiple sclerose (MS), en ernstige bloedvergiftiging (sepsis). Omdat trafinib een veelbelovende en krachtige remmer van macrofaag activiteit is willen wij in dit project onderzoeken of dit medicijn ook gebruikt kan worden in de behandeling van HLH.

*Describe the objectives of the project (for example, addressing certain scientific unknowns, of scientific or clinical needs). Compulsory! Maximum length is 2500 characters*

#### Potential benefits likely to derive from this project

Per jaar krijgen er in Nederland ongeveer 50-100 mensen HLH, waarbij 8-54% komt te overlijden binnen een paar dagen door een gebrek aan een goede behandeling. Daarnaast zijn patiënten in de eerste dagen van HLH vaak te ziek om optimale behandeling van de onderliggende ziekte, vaak kanker of een infectie, te krijgen. Aanvullende behandelingen van HLH zijn dringend nodig om de prognose van patiënten met deze zeldzame aandoening te verbeteren. Op de korte termijn willen wij meer inzicht verkrijgen in het effect van het remmen van CD40 op het ziekteverloop van HLH in muizen. Hierbij kijken wij ook wat het effect is van CD40 remming op de (immuun)cel processen die betrokken zijn bij HLH. Op de langere termijn kan deze kennis bijdragen aan de ontwikkeling van een nieuwe behandeling bij HLH, gericht op CD40 remming. Wanneer blijkt dat de CD40-remmer trafinib een mogelijke behandelstrategie is voor HLH in muizen, kan de stap worden gemaakt om trafinib in een klinische studie bij HLH patiënten te onderzoeken.

*What are the potential benefits likely to derive from this project? Explain how science could be advanced, or humans, animals or environment may ultimately benefit from the projects. Where applicable, differentiate between short-term benefits (within the duration of the project) and long-term benefits (which may accrue after the project is finished) . Compulsory! Maximum length is 2500 characters*

#### Predicted harms

##### In what procedures will the animals typically be used

Om de muizen als ziektemodel te kunnen gebruiken moeten wij de immuunziekte opwekken, dit gebeurt met meerdere injecties. Verder kunnen de muizen geïnjecteerd worden met bijvoorbeeld een medicijn en er zal ook bloed afgenomen worden. Soms is het nodig om muizen te bestralen zodat ze een beenmergtransplantatie kunnen krijgen, op deze manier kunnen wij de muizen een "nieuw" immuunsysteem geven. Aan het einde van het experiment zullen de muizen gedood worden.

*In what procedures will the animals typically be used (for example, injections, surgical procedures)? Indicate the number and duration of these procedures. Compulsory! Maximum length is 2500 characters*

##### Expected impacts/adverse effects on the animals

Een gevolg van HLH is dat de muizen zich erg ziek voelen, veel gewicht verliezen, en bloedarmoede ontwikkelen. Ernstig gewichtsverlies is onderdeel van de ziekte en is een gevolg van een verhoogd energie verbruik om de ziekte te bestrijden en de dieren voelen zich ziek waardoor ze minder eten. Daarnaast zullen de dieren stress ondervinden doordat ze meerdere malen geïnjecteerd moeten worden en er ook bloedafnames plaatsvinden. Aan de hand van pilot studies zullen wij proberen de duur van het experiment, en daarmee het ongerief, zo kort mogelijk te laten duren. Het maximum aantal dagen dat de dieren de ziekte doormaken is tien.

*What are the expected impacts/adverse effects on the animals for example pain, weight loss, inactivity/reduced mobility, stress, abnormal behaviour, and the duration of those effects? Compulsory! Maximum length is 2500 characters*

#### Reasons for the planned fate of the animals after the procedure

Aan het eind van het experiment worden de dieren gedood, om weefsel voor verdere wetenschappelijke analyse te kunnen verkrijgen.

*Please provide reasons for the planned fate of the animals after the procedure. Compulsory! Maximum length is 2500 characters*

### Application of the Three Rs

#### 1. Replacement

HLH is een ingewikkelde immuun ziekte waarbij het met name mis gaat bij de 'communicatie' tussen de verschillende cellen in het immuunsysteem. Een diermodel is nodig om zowel de communicatie tussen de immuuncellen te kunnen bestuderen, alsmede het effect hiervan op de organen en weefsels die door HLH worden aangetast.

Tegelijkertijd met deze muizenstudie gaan wij ook studies met cellen van mensen uitvoeren. Hierdoor kunnen wij in een vroeg stadium al zien of de resultaten die wij krijgen uit de muizenstudie overeen komen met de situatie bij HLH patiënten. In patiëntmateriaal zoals bloed kunnen wij ook ontstekingswaarden (o.a. ontsteking stoffen, en immuuncel activatie) bepalen, zodat deze informatie verder onderzocht kan worden in het muismodel.

*State which non-animal alternatives are available in this field and why they cannot be used for the purposes of the project. Compulsory! Maximum length is 2500 characters*

#### 2. Reduction

Ons onderzoekslab heeft al zeer veel ervaring met CD40, waardoor al veel kennis beschikbaar is over de effecten van CD40 op verschillende celtypen. Hierdoor weten wij dat CD40 een belangrijke rol speelt in macrofaag activatie, de immuuncel die een centrale rol speelt in HLH. Deze eerder opgedane kennis over het effect van CD40 op macrofagen, maar ook op andere celtypen, kunnen wij inzetten in dit project waardoor wij minder dieren nodig hebben.

Door pilot studies uit te voeren om de proefopzet zo veel mogelijk te optimaliseren, hopen wij dat het aantal dieren dat nodig is voor de experimenten te verminderen. Daarnaast streven wij ernaar om zoveel mogelijk metingen te doen in één proefdier. We berekenen met statistische methoden hoeveel muizen er nodig zijn om een betrouwbaar antwoord te krijgen zodat er niet teveel dieren worden gebruikt.

Door gebruik te maken van een beenmergtransplantatie voorkomen we dat er eerst veel muizen met elkaar gefokt moeten worden om een ander immuunsysteem te krijgen.

*Explain how the numbers of animals for this project were determined. Describe steps that have been taken to reduce the number of animals to be used, and principles used throughout the project to minimise the number of animals used consistent with scientific objectives. Those practices may*

include e.g. pilot studies, computer modelling, sharing of tissue and reuse. Compulsory! **Maximum length is 2500 characters**

### 3. Refinement

Aan de hand van meerdere pilot experimenten proberen wij de proefopzet te verfijnen. Dit doen wij onder andere door te onderzoeken of wij op een eerder tijdstip al het effect van een behandeling op het HLH ziekteproces kunnen zien. Hierdoor zullen de muizen minder lang ernstig ziek zijn. De dieren die het einde van het experiment niet halen vanwege het bereiken van een humaan eindpunt zullen wél gebruikt worden om meer inzicht te verkrijgen in het ontstaan van HLH.

Waar mogelijk zal het aantal handelingen van de muis, met name de injecties, zo laag mogelijk worden gehouden. Er wordt de voorkeur gegeven aan geneesmiddelen die minder vaak gegeven hoeven te worden, maar vanwege bepaalde eigenschappen van een medicijn, zoals een snelle afbraak of slechte oplosbaarheid, zal er soms vaker geïnjecteerd moeten worden. Wij zullen de dieren niet over een langere periode injecteren dan strikt noodzakelijk. Wanneer wij de dieren meer dan één keer per dag in een bloedvat moeten injecteren zullen wij een buisje plaatsen op het bloedvat of een pompje gebruiken, zodat de dieren minder last ondervinden van de injecties. Hierbij heeft het plaatsen van een pompje de voorkeur, omdat dieren dan niet alleen geplaatst hoeven te worden.

Een deel van de muizen zal een genetische aanpassing hebben of een behandeling krijgen, waardoor het ziektebeeld minder ernstig wordt. Hierdoor zal het uiteindelijke ongerief bij deze muizen ondanks dat ze HLH hebben, lager zijn.

Mannelijke muizen worden om vechten te voorkomen in groepjes van drie tot vier muizen gehuisvest en krijgen twee huisjes. Ook zullen de beenmergtransplantatie dieren en de dieren die HLH hebben indien nodig nat gemaakt energierijk voer krijgen, zodat ze op een makkelijkere manier voldoende voedsel binnenkrijgen.

*Give examples of the specific measures (e.g., increased monitoring, post-operative care, pain management, training of animals) to be taken, in relation to the procedures, to minimise welfare costs (harms) to the animals. Describe the mechanisms to take up emerging refinement techniques during the lifetime of the project. Compulsory! **Maximum length is 2500 characters***

### Explain the choice of species and the related life stages

Muizen hebben de voorkeur binnen dit project omdat onze onderzoeksgroep zeer uitgebreide ervaring heeft met muizen en dit een goed en geaccepteerd model is voor HLH. Wij werken met volwassen muizen vanaf een leeftijd van zes weken, het experiment wordt ingezet wanneer de muizen tussen de zes en 24 weken oud zijn.

*Compulsory! **Maximum length is 2500 characters***

Tab Purpose of the project

Basic research: Immune System [PB7]

Translational and applied research: Human Immune Disorders [PT28]

Choose a purpose

Choose a purpose

Choose a purpose

**Tab Expected harms**

*What species and numbers of animals are expected to be used? What are the expected severities and the numbers of animals in each severity category (per species)?*

Estimated numbers per severity				
<i>Please fill in all categories for selected species with whole numbers (0 or higher)!</i>				
Species	Non-recovery	Mild	Moderate	Severe
Mice ( <i>Mus musculus</i> ) [A1]		82		1140
Choose a species				
Choose a species				
Choose a species				
Choose a species				
Choose a species				
Choose a species				
Choose a species				
Choose a species				
Choose a species				
Choose a species				
Choose a species				
Choose a species				
Choose a species				

**Tab Fate of animals kept alive**

*What will happen to the animals kept alive at the end of the procedure?*

Estimated numbers per severity			
<i>Please fill in all categories for selected species with whole numbers (0 or higher)!</i>			
Species	Reused	Returned	Rehomed
Choose a species			
Choose a species			
Choose a species			
Choose a species			
Choose a species			
Choose a species			
Choose a species			
Choose a species			
Choose a species			
Choose a species			
Choose a species			
Choose a species			
Choose a species			
Choose a species			



## Advies aan CCD

Datum 21 juni 2022  
 Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD202215811

Instelling: 5.1 lid2h  
 Onderzoeker: 5.1 lid2e  
 Project: De rol van het immuun checkpoint eiwit CD40 in hemofagocyttaire lymfocytose  
 Aanvraagnummer: AVD202215811  
 Betreft: Nieuwe aanvraag  
 Categorieën: Fundamenteel onderzoek  
 Translationeel of toegepast onderzoek

### 1 Inzicht in aanvraag en de eventuele knelpunten en risico's

<b>Proces</b>	<p>De volgende vragen zijn gesteld aan de aanvrager.</p> <p>Vragen over de NTS:          Een deel van de dieren zal individueel gehuisvest kunnen worden, Kunt u dit in uw NTS omschrijven onder 'Expected impacts/adverse effects on the animals'?</p> <p>Kunt u onder 'Explain the choice of species and the related life stages' en in de bijlage dierproeven onder 'B. De dieren - Diersoort' de translationele waarde van het gekozen diermodel beschrijven?</p>			
<b>Naam proef</b>	<b>Diersoort</b>	<b>Stam</b>	<b>Aantal dieren</b>	<b>Herkomst</b>
<b>3.4.3.1 Muizenmodel voor Hemofagocyttaire Lymfocytose</b>				
	Muizen (Mus musculus)	WT & GGO	1.222	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn

# Overzicht van opmerkingen bij AdviesNotaCCD\_5.1 lid2e.pdf

Pagina: 1

---

Nummer: 1      Auteur: 5.1 lid2e      Onderwerp: Sticky Note      Datum: 22-6-2022 10:54:13

Ze mogen als je toch vragen hebt bij refinement de term humaan eindpunt uitleggen.

---

Nummer: 2      Auteur: 5.1 lid2e      Onderwerp: Sticky Note      Datum: 22-6-2022 10:53:38

Ik mis in deze Word file, anders dan bij de Excel file bij de tabel van het ongerief het totaal aantal dieren.

---

Nummer: 3      Auteur: 5.1 lid2e      Onderwerp: Sticky Note      Datum: 22-6-2022 12:14:13

5.2 lid1

---

## Huisvesting en verzorging anders dan Bijlage III Richtlijn

### 3.4.3.1 Muizenmodel voor Hemofagocyttaire Lymfohistiocytose

Citaat:

Dieren die gecannuleerd worden, moeten alleen gehuisvest worden om te voorkomen dat de cannules doorgebeten worden door kooigenoten.

## Onverdoofd gebruik terwijl verdoving wel gewenst

### 3.4.3.1 Muizenmodel voor Hemofagocyttaire Lymfohistiocytose

Citaat D:

[...]

Verdere pijnstilling tijdens HLH wordt niet gebruikt aangezien dit onverenigbaar is met de proefopzet. De meeste pijnstilling werkt ontstekingsremmend en zal dus ook de HLH-geassocieerde ontsteking remmen. We kiezen ervoor om geen opiaten als pijnstilling te geven, omdat wij de bijwerkingen van het gebruik van opiaten (obstipatie, misselijkheid en sufheid) niet vinden opwegen tegen de pijn die de dieren ervaren vanwege de HLH.

## Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

### 3.4.3.1 Muizenmodel voor Hemofagocyttaire Lymfohistiocytose

Muizen (*Mus musculus*) Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

<b>Locatie uitvoering experimenten</b>	- Alle proeven vinden plaats in een instelling van een vergunninghouder. - Er zijn geen problemen bekend met de vergunninghouder.
--	--

## 2 DEC advies

<b>DEC-advies</b>	Citaat C4: [...] De DEC heeft veel aanvullende vragen gesteld om een beter beeld te krijgen van deze relatie. Er waren twijfels over de transleerbaarheid van het model maar ook over de haalbaarheid van het uiteindelijke doel. Is het überhaupt wel mogelijk om zo'n ontspoorde immuunrespons nog bij te sturen. De aanvrager heeft dit verhelderd door aan te geven wat de overeenkomsten zijn tussen het beeld in de patiënt en het model. De DEC beoordeelde het model daarom geschikt voor deze (mechanistische) proeven. De aanvrager heeft daarnaast aangegeven dat trafinib in een ander acuut ontstekingsmodel (sepsis) in staat was om de ontstekingsreactie te remmen. Dit ondersteunt de hypothese dat een ontspoorde immuunrespons nog bij te sturen valt. 'Nieuw' aangetrokken immuuncellen kunnen een niet-inflammatoir fenotype houden waardoor uiteindelijk de ontspoorde immuunrespons bijgestuurd kan worden. Uiteindelijk blijft er (natuurlijk) onzekerheid of de hypothesen bevestigd
-------------------	---



zullen worden maar dit is inherent aan onderzoek doen naar een behandeling van een complexe immunrespons. De DEC was niet unaniem in de beoordeling van deze relatie. Eén DEC lid was van mening dat er teveel onzekerheid was dat dit onderzoek een geneesmiddel kan opleveren, de overige DEC-leden waardeerden de bijdrage van dit onderzoek aan de ontwikkeling van een behandeling veel hoger (Zie verder de ethische afweging).

[...]

Citaat C10:

Er wordt afgeweken van bijlage III als dieren een canule aangelegd krijgen om continu medicijnen toe te kunnen dienen. De dieren worden dan individueel gehuisvest om te voorkomen dat kooigenoten de canule doorknagen. De DEC vindt dat de individuele huisvesting om deze reden voldoende onderbouwd is. Echter omdat de dieren ook erg ziek worden, merkt de DEC op dat, indien mogelijk, het plaatsen van een Alzet pompje onderzocht zou moeten worden, zodat de dieren nog steeds sociaal gehuisvest kunnen worden. Juist bij dieren die zo ernstig ziek worden, kan het individueel huisvesten zorgen voor extra ongerief.

Citaat C11:

Ongeriefinschatting is in overleg met de IvD tot stand gekomen, met gebruikmaking van de Toelichting Codering Ongerief. De dieren worden door de ontsparing van het immuunsysteem ziek. De muizen zullen veel energie gebruiken terwijl ze ook weinig eetlust hebben. De muizen zullen hierdoor snel afvallen. De DEC is van mening dat de dieren ernstig ongerief zullen ondergaan omdat ze zich een aantal dagen (erg) ziek kunnen voelen. De aanvrager geeft aan in een pilot te onderzoeken of eerdere tijdstippen bruikbaar zijn om de vragen te beantwoorden. Dit kan de duur van het ernstige ongerief verkorten. De DEC is van mening dat het induceren van deze cytokinestorm ingeschat moet worden als ernstig, ook als de proef uiteindelijk 'maar' 5 dagen i.p.v. 10 dagen zou duren. De beenmergdonoren worden zonder voorafgaande handelingen gedood. Het ongerief van deze dieren is ingeschat als 'licht' volgens de richtlijn van de NVWA.

Citaat C13:

[...]

De DEC heeft ook gediscussieerd over de relatie van deze HEP met het uitvalspercentage. De aanvragers geven aan dat 50% van de muizen het HEP kan bereiken. Al zullen ze proberen om dit terug te brengen tot 30% in de pilots. Bovendien zijn de muizen die een HEP bereiken nog steeds heel waardevol voor het onderzoek, en zouden niet als 'uitval' beschouwd moeten worden. Deze dieren worden ook geanalyseerd. In deze gevallen

overlappen de wetenschappelijke eindpunten met de HEPs. Desondanks zou de 'uitval' sterk beperkt kunnen worden als het HEP als 25% gewichtsverlies gedefinieerd zou worden. In de grafiek is te zien dat het gemiddelde gewichtsverlies rond de 20% is. De DEC schat in dat het ongerief wel (sterk) beperkt wordt door dieren die meer dan 20% gewicht verliezen uit de proef te halen. Deze dieren stabiliseren niet en lopen meer risico om te sterven tijdens de proef. De aanvrager voorkomt dit door dit HEP te kiezen. De DEC vindt dit gekozen HEP daarom passend. De DEC geeft de voorkeur aan het zoveel mogelijk beperken van het ernstige ongerief voor de individuele muis, ook al heeft dit als consequentie dat er meer dieren gebruikt moeten worden en zodoende ook meer dieren ernstig ongerief zullen ondergaan.



Ethische afweging van de DEC:

Citaat D:

1.  
Rechtvaardigt het beantwoorden van de onderzoeksvraag "Inzicht krijgen in de werking van het immuun checkpoint eiwit CD40, alsook de mediators en signaleringsmoleculen die betrokken zijn bij de CD40 signaleringscascade, in een HLH muismodel en hoe deze het ziekteverloop beïnvloeden", het gebruik van 1222 muizen die licht (6%:82/1222) tot ernstig (94%: 1140/1222) ongerief kunnen ervaren door dit onderzoek?

2.  
De belangrijkste belanghebbenden op korte termijn in dit fundamentele en translationele project zijn de proefdieren en de onderzoekers (zie ook het antwoord bij vraag C5).

Op de langere termijn bestaan de belanghebbenden uit patiënten met HLH. De toepassing van deze kennis in patiënten valt buiten het directe onderzoeksdoel van deze studie. Het belang van de patiënten dat een behandeling wordt gevonden is zeer groot maar of dit project daar direct aan bijdraagt is onzeker. Het belang van de bijdragen van het project wordt daarom op dit moment ingeschat op een gering voordeel. De (meerderheid van de) DEC is wel van mening dat dit op langere termijn wel een groot belang kan worden.

De muizen worden direct door dit onderzoek geschaad zoals beschreven onder punt 11 en 12. De andere groep belanghebbenden, namelijk de onderzoekers, zullen door dit onderzoek hun kennis en inzichten vergroten, welke gedeeld zullen worden met het wetenschappelijk veld. Aanvullende belangen van onderzoekers zouden kunnen zijn dat het onderzoek hun carrière mogelijkheden vergroot door publicaties.

Nummer: 1      Auteur: 5.1 lid2e      Onderwerp: Sticky Note      Datum: 22-6-2022 11:34:01

---

Deze zou ik er toch even bij zetten omdat bijna alle muizen ernstig ongerief zullen ondervinden: Citaat C16: Dit model zal ernstig ongerief veroorzaken in de muizen. Gezien de vraagstelling valt dit niet te voorkomen. Binnen dit kader vindt de DEC 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 onderzoekers verschillende pilots zullen uitvoeren om te bepalen of de onderzoeksvragen ook op een eerder tijdstip in het model beantwoord kunnen worden en om te onderzoeken of het bereiken van ziektescore 3 beperkt kan worden;
- 2) de onderzoeksstrategie er op gericht is om eerst op een grove manier te bepalen of CD40 wel betrokken is bij de pathogenese van HLH, met CD40KO muizen, voordat er vervolgonderzoeken gestart worden;
- 3) er een HEP gedefinieerd is op ziekte verschijnselen én niet meer dan 20% gewichtsverlies, zo wordt het ernstige ongerief zoveel mogelijk beperkt;
- 4) er wordt geen pijnstilling gebruikt maar de DEC verwacht dat het meeste ongerief veroorzaakt wordt door het zich ziek voelen en niet zozeer door pijn;
- 5) de dieren hoogenergetisch voer krijgen.

Hoewel maximaal 1222 muizen gebruikt zullen worden voor dit onderzoek, waarvan 1140 dieren ernstig ongerief zullen ervaren, acht de meerderheid van de DEC dit gerechtvaardigd door de verwachte nuttige gevolgen van dit onderzoek. Het wetenschappelijk en maatschappelijk belang is in dit project duidelijk geformuleerd en dit projectvoorstel zal hier aan bijdragen. De meerderheid van de DEC waardeert de verwachte resultaten die kunnen leiden tot een betere behandeling van HLH, als de meest zwaarwegende waarde die tegen het gebruik en het ongerief van maximaal 1222 muizen opweegt.

3.

Kan een behandeling gericht op de CD40 signalering de acute immuunziekte "hemofagocytair lymfocytose" remmen in muizen?

Het antwoord op de centrale morele vraag was niet unaniem bij dit project. Voor één DEC lid wegen de verwachte opbrengsten niet op tegen het ernstige ongerief dat de muizen moeten ondergaan. In het beantwoorden van de morele vraag zal uitgegaan worden van het meerderheidsstandpunt maar wordt ook het minderheidsstandpunt verwoord.

De (meerderheid van de) DEC is van mening dat het onderzoeken van de vraag "Inzicht krijgen in de werking van het immuuncheckpoint eiwit CD40, alsook de mediators en signaleringsmoleculen die betrokken zijn bij de CD40 signaleringscascade, in een HLH muismodel en hoe deze het ziekteverloop beïnvloeden", het gebruik van 1222 muizen en het licht (6%:82/1222) tot ernstige (94%: 1140/1222) ongerief dat ze kunnen ondergaan door dit onderzoek, rechtvaardigt.

Hemofagocytair lymfocytose is een ontsporing van het immuunsysteem, met name van de macrofagen, die acuut op kan treden bij patiënten die behandeld worden met een chemotherapie of als complicatie bij een virusinfectie. Deze aandoening is levensbedreigend. CD40 speelt een belangrijke rol in de communicatie tussen immuuncellen. In dit onderzoek wordt de hypothese getoetst dat het remmen van deze signalering de immuunontsporing en het ziekteverloop kan remmen. In de muizen worden kunstmatig de macrofagen geactiveerd waardoor een cytokinestorm opgewekt wordt, waarna de rol van CD40 nader bestudeerd zal worden. Er wordt onderzocht of een interventie op de CD40 signalering het ziekteverloop kan remmen.

De DEC heeft geworsteld met deze aanvraag zoals te zien is in het aantal vragen dat de DEC gesteld heeft in meerdere vragenrondes. De grootste

worsteling was het rechtvaardigen van het ernstige ongerief bij de proefdieren zonder garantie dat de studie (direct) gaat leiden tot een waardevol medicijn voor de HLH-patiënt. Het model dat gebruikt wordt, zal ernstig ongerief veroorzaken bij de muizen. De dieren zullen maximaal 9 dagen erg ziek zijn. De DEC heeft vooral veel gediscussieerd en extra vragen gesteld over de uiteindelijke mogelijke opbrengsten van dit onderzoek. Er was twijfel of het wel mogelijk is om een ontspoorde immuunrespons nog bij te kunnen sturen. Kan een interventie tijdens een reeds ontspoorde immuunrespons nog voorkomen dat mensen overlijden aan HLH? De aanvragers gaven hier een realistisch antwoord op. Zij konden deze vraag nog niet beantwoorden om de simpele reden dat dit nog niet onderzocht is. De aanvragers onderbouwden wel hun hypothese met een eerder uitgevoerde 'proof of concept' proef in een sepsis model waarbij trafinib in staat was de ontwikkeling van sepsis te voorkomen. Ondanks dat dit niet vergelijkbaar is met het toedienen van trafinib tijdens de ontspoorde immuunrespons (i.p.v. gelijktijdig met het induceren van sepsis), geeft het wel aan dat het mogelijk kan voorkomen dat 'nieuwe' immuuncellen die aangetrokken worden, niet verder ontwikkelen tot het hyperinflammatoire fenotype. Het gaat in deze aanvraag vooral om het onderzoeken van de immuunrespons en de daar bijpassende interventies, waaronder trafinib, op het verloop van de ziekte. Het meerderheidstandpunt van de DEC was uiteindelijk dat deze vermeerdering in kennis, gezien de ernst van de ziekte, opweegt tegen het ernstige ongerief van de dieren. Er is eerst meer kennis nodig over wat de ontspoorde immuunrespons kan afremmen voordat er een behandeling ontwikkeld kan worden voor de HLH-patiënt. Het aantal patiënten die dit per jaar treft, is relatief klein. De meeste DEC-leden vonden dit onderzoek ondanks het relatieve lage aantal patiënten gerechtvaardigd door de ernst en dodelijkheid van deze ziekte. Eén DEC-lid vond het aantal patiënten dat uiteindelijk belang heeft bij de opbrengsten van dit project te klein om het ernstige ongerief van maximaal 1140 muizen te rechtvaardigen. Bovendien vond dit DEC-lid ook de uiteindelijke meerwaarde voor de patiënten die in leven zouden blijven door een uiteindelijk medicijn te onzeker omdat er nu nog geen goede voorspelling gedaan kan worden over de kwaliteit van leven na deze behandeling. De patiënten die het betreft vaak ernstig onderliggend lijden hebben.

De aanvragers hebben door de strategie (pilots t.b.v. vermindering en verfijning) en het definiëren van het HEP zoveel mogelijk geprobeerd het ongerief te beperken. Het ongerief blijft ernstig maar dit komt doordat het een model is voor een ziekte waar mensen maar ook deze muizen levensbedreigend ziek door worden. De DEC miste in het voorstel de onderbouwing dat het voorgestelde model transleerbaar is naar HLH in

mensen. De extra literatuurverwijzingen en een heldere beschrijving van de vergelijkbare ziekteprocessen in de mens en het model heeft de DEC overtuigd van de waarde van het model.

Het ongerief in deze proeven wordt veroorzaakt door het opwekken van een cytokine storm waardoor de dieren zich echt ziek zullen voelen. Het experiment duurt maximaal 10 dagen. De aanvrager zal in pilots onderzoeken of de duur zoveel mogelijk beperkt kan worden. Desondanks zullen de muizen deze ontsparing van het immuunsysteem moeten ondergaan en schat de DEC het ongerief als ernstig in, ook bij een kortere duur. De HEP's zijn zo gedefinieerd dat het ernstige ongerief zoveel mogelijk beperkt wordt en voorkomen wordt dat dieren sterven in de proef. De dieren worden vroegtijdig uit de proef gehaald als ze meer dan 20% gewicht verliezen. De DEC heeft besproken of de HEP niet gedefinieerd zou moeten worden als een hoger gewichtsverlies, dit zou het aantal dieren dat nodig is, kunnen beperken. De kans dat muizen dan sterven in de proef neemt dan wel toe. De DEC verkiest uit het oogpunt van verfijning het gewichtsverlies van 20% i.p.v. een hoger percentage (zie C13). Er wordt rekening gehouden met maximaal 50% uitval. 'Uitval' heeft in dit onderzoek echter een andere betekenis dan normaal gesproken. Dieren die eerder uit de proef gehaald worden, zullen wel geanalyseerd worden om de immunrespons in kaart te brengen. De DEC waardeert dat deze muizen gebruikt worden voor het beantwoorden van de onderzoeksvraag.

De DEC acht het aannemelijk dat de doelstellingen binnen de kaders van het project behaald kunnen worden. De onderzoeksstrategie is logisch en navolgbaar en de uitkomstparameters sluiten logisch en helder aan bij de aangegeven doelstellingen. De DEC heeft hier aanvullende vragen over gesteld om een beter beeld te krijgen (zie antwoord op vraag C4). De aanvrager legt goed uit waarom er voor deze vragen geen proefdierlijke alternatieven kunnen worden gebruikt (zie C14). De DEC is er van overtuigd dat de aanvrager voldoende kennis en kunde heeft om de doelstellingen te behalen. Tevens verwacht de DEC op basis van deze aanvraag dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken door de onderzoeksstrategie en het gebruik van powerberekeningen. Er is een duidelijk go/no go moment beschreven. Eerst zal het model verfijnd worden in de faciliteit en zal onderzocht worden of CD40 een belangrijke rol speelt. Pas als dit het geval is zullen er vervolggelaxperimenten uitgevoerd worden waarin ook signaleringseiwitten bestudeerd kunnen worden. Deze go/no go voorkomt dat er proeven worden uitgevoerd terwijl CD40 uiteindelijk geen rol blijkt te spelen. Bovendien zal in de pilots indien 30% van de dieren een HEP bereikt op een bepaald tijdstip alle muizen gedood worden voor analyse. Dit voorkomt extra lijden bij de

overige dieren. Uit de pilot moet blijken of de vragen ook op een eerder tijdstip beantwoord kunnen worden waardoor het aantal dagen met ernstig ongerief verkort kan worden.

Dit onderzoek maakt geen gebruik van dieren met een speciale herkomst. Ook is er geen speciale wet- en regelgeving van toepassing op dit project.

Gezien het bovenstaande komt de DEC tot het meerderheidstandpunt dat dit project het gebruik van proefdieren rechtvaardigt.

De DEC heeft extern advies ingewonnen bij

- de aanvrager is om aanvullingen gevraagd

De DEC heeft over vier termijnonderbrekingen vragen gesteld aan de aanvrager over de onderbouwing van het ziektemodel, de klinische toepasbaarheid en eigenschappen van trafinib, de onderbouwing voor de sterftepercentages, het toelichten van de strategie, het ontwerp van de pilotstudies en de sterfte bij de dieren voordat een HEP wordt bereikt.

Het DEC advies is Verlenen onder voorwaarden

Het uitgebrachte advies is niet gebaseerd op consensus.

Citaat E2:

Dit DEC advies is niet unaniem tot stand gekomen. We hebben ervoor gekozen om het minderheidsstandpunt van één DEC-lid toch ook te beschrijven in de ethische weging. Het is deel geweest van de discussie waarbij uiteindelijk ieder DEC leden een eigen persoonlijke afweging heeft gemaakt. Beide standpunten zijn daarom in de ethische weging beschreven.

Maar volgens het gevraagde voorbeeld:

Het advies is gebaseerd op een meerderheidsstandpunt. Eén DEC-lid kwam tot een negatief advies. Dit lid is 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 dat er sprake is van ernstig ongerief voor een aanzienlijke groep dieren (1140 van de in totaal 1222 dieren). Dat kan alleen gerechtvaardigd zijn als daar grote en vrij zekere baten tegenover

staan, maar dat is zijn optiek niet het geval. Het is wel zo dat de trafinib-behandeling levensreddend kan zijn, dus dat zou een significante baat voor patiënten die het betreft zijn. Maar tegelijkertijd betreft het vermoedelijk niet heel veel patiënten: HLH is met 50-100 Nederlandse gevallen per jaar volgens de onderzoekers een 'zeer zeldzame ziekte', waarvan een uiteenlopend percentage daadwerkelijk overlijdt, maar ook een deel het met de huidige behandelingen al overleeft. Daarbij is onduidelijk hoeveel de overlevingskansen (en kwaliteit van leven) dankzij trafinib zouden gaan stijgen. Zoals hij het begrijpt hebben HLH-patiënten vaak ernstig onderliggend lijden en daarom sowieso al geen goede vooruitzichten, en is het ook maar de vraag hoe effectief de behandeling in de praktijk kan worden ingezet, gezien de korte tijd waarin HLH kritiek kan worden en de tijd die nodig is voor het stellen van de juiste diagnose. Om deze redenen schat hij de baten van het onderzoek niet als heel hoog in, en is hij er dus niet van overtuigd dat deze baten zullen opwegen tegen het ernstige ongerief voor 1140 dieren (plus licht ongerief voor 82 dieren). Derhalve geeft hij een negatief advies. Overigens is hij ook niet overtuigd van de opzet met pilots waardoor het daadwerkelijke experiment bekort kan worden maar behoorlijk veel extra dieren nodig zijn (zo'n 25% van de dieren zit in de pilots), en waarvan de data volgens de onderzoekers niet vergeleken kunnen worden met de data uit het daadwerkelijke experiment."

De volgende dilemma's zijn gesignaleerd door de DEC:


Citaat E3:



Bij het bespreken van deze projectaanvraag kwam het dilemma naar voren of een behandeling voor een kleine patiëntenpopulatie het gebruik van dieren 'waard' is. Zie de ethische weging hoe de DEC-leden hiermee om zijn gegaan.

### 3 Kwaliteit DEC advies

#### Kwaliteit DEC-advies

Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het DEC advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld. Bij de beantwoording van de beoordelvingsvragen verstrekt u een heldere onderbouwing. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen.


In C1 van uw advies verwijst u naar een voorbeeld uit de Handreiking <sup>1</sup> Vulling definitie project. Hierbij verwijst u naar een verouderde nummering. Kunt u in het <sup>2</sup>  volg de meest recente versie aanhouden, die is gepubliceerd op de website van de CCD?

De dieren zullen niet in alle gevallen adequate pijnbestrijding ontvangen, waar dit wel gewenst <sup>2</sup>  kan zijn. De CCD had de visie van de DEC hierop graag teruggezien onder C9 van uw advies <sup>2</sup> 




## Pagina: 9

---

 Nummer: 1      Auteur: **5.1 lid2e**      Onderwerp: Sticky Note      Datum: 22-6-2022 11:35:40  
bij toekomstige adviezen

---

 Nummer: 2      Auteur: **5.1 lid2e**      Onderwerp: Sticky Note      Datum: 22-6-2022 11:37:40  
De CCD waardeert de wijze waarop de DEC helder inzichtelijk heeft gemaakt waarom het advies met een meerderheidsstandpunt tot stand is gekomen, en de goed navolgbare onderbouwing waarom 1 DEC lid het positieve advies niet deelde.

#### 4 Inhoudelijke beoordeling

<p><b>Doelstelling</b> Doelstelling</p>	<p>Citaat: Het directe doel van dit project is inzicht krijgen in de werking van het immuun checkpoint eiwit CD40, alsook de mediators en signaleringsmoleculen betrokken zijn bij de CD40 signaleringscascade, in een HLH muismodel en hoe deze het ziekteverloop beïnvloeden. Het uiteindelijke doel is om te onderzoeken of CD40 signalering een aangrijpingspunt is voor een interventie, bijvoorbeeld met trafinib, die gebruikt kan worden voor de ontwikkeling van een behandeling van HLH patiënten.</p> <p>Verschillende subdoelen moeten behaald worden om tot het directe doel te komen, te weten:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Via welke processen reguleren het immuun checkpoint CD40 en de daarbij betrokken mediators en signaleringsmoleculen de activatie van verschillende (immuun)celtypen in een HLH ziektemodel en wat is het effect hiervan op het ziekteverloop.</li> <li>2. Wat zijn de effecten van interventies (onder andere genetisch, farmacologisch) in deze processen op specifieke (immuun)cel functies die belangrijk zijn bij HLH en hoe beïnvloedt dit het ziekteverloop.</li> </ol>
<p>Wetenschappelijk en maatschappelijk belang</p>	<p>Citaat: Maatschappelijk belang Per jaar worden er in Nederland ongeveer 50-100 mensen gediagnostiseerd met HLH, waarbij 8-54% komt te overlijden in de acute fase van HLH. Met de kennis verkregen in dit project willen we nieuwe immunologische mechanismen ontrafelen die bijdragen aan het ontstaan van HLH bij de muis. Wanneer deze kennis in de toekomst geëxtrapoleerd wordt naar de mens kan CD40 therapie een uitkomst bieden in de behandeling van HLH. <b>5.1 lid2h</b></p> <p><b>5.1 lid2h</b></p> <p><b>5.1 lid2h</b> (15.1 lid2h, 5.1 lid2e</p> <p><b>5.1 lid2h, 5.1 lid2e</b>. Wanneer blijkt dat trafinib een mogelijke behandelstrategie is voor HLH in muizen, kan hierdoor sneller de stap worden gemaakt om trafinib in een klinische studie bij HLH patiënten te onderzoeken. Daarnaast blijkt uit eerdere studies dat het muismodel van HLH veel overlap vertoont met het ziektebeeld dat wordt gezien bij HLH patiënten. De voor HLH kenmerkende macrofaag geïnduceerde cytokine storm is vergelijkbaar in mens en muis en wordt gekenmerkt door onder andere een verhoogde productie van de cytokines IFN<math>\gamma</math>, TNF<math>\alpha</math>, en IL-6 (Albeituni et al., Blood, 2019; <b>5.1 lid2h, 5.1 lid2e</b>). Ook lopen er op dit moment klinische studies naar de effectiviteit van emampalumab (IFN<math>\gamma</math>-blokkerend antilichaam) bij primaire HLH (de erfelijke variant), deze bevindingen zijn gedaan in de muis en zijn in de eerste klinische</p>

	<p>trials ook al effectief gebleken bij HLH patiënten <b>5.1 lid2h</b>  <b>5.1 lid2h</b> , Dit toont aan dat resultaten behaald in de muis  geëxtrapoleerd kunnen worden naar de mens, wat een goede indicatie is  dat de bevindingen die in dit project worden gedaan van belang zijn voor  het patiënten welzijn en daarmee bijdragen aan het maatschappelijke  belang van dit project. Ondanks dat emampalumab effectief lijkt te zijn in  de behandeling van primaire HLH, is er een maatschappelijk belang om te  blijven zoeken naar alternatieve therapieën van HLH. Voor secundaire  HLH kan emampalumab namelijk minder effectief zijn, doordat  secundaire HLH een andere oorzaak heeft dan primaire HLH. Waar bij  primaire HLH erfelijkheid een grote rol speelt, is de onderliggende  oorzaak bij secundaire HLH vaak een infectie of kanker. Emampalumab  blokkeert de IFN<math>\gamma</math> respons, een belangrijke respons bij virale infecties,  waardoor deze therapie niet geschikt is wanneer de secundaire HLH wordt  uitgelokt door een virale infectie. Hierdoor is het van belang om specifiek  voor secundaire HLH op zoek te gaan naar nieuwe en betere  therapeutische strategieën. Daarom willen wij in dit project onderzoeken  of CD40 therapie effectief is in secundaire HLH, doordat CD40 therapie  specifiek aangrijpt op de door HLH gedysreguleerde macrofagen, maar  ondertussen wel de rest van de immuun respons intact laat.</p> <p>Wetenschappelijk belang  Wetenschappelijk gezien zal de kennis die we met dit project vergaren  bijdragen aan het begrijpen van de rol van het immuun checkpoint CD40  in HLH, en deze kennis is mogelijk ook relevant voor andere immuun  gerelateerde ziekten. <b>5.1 lid2h</b>  <b>5.1 lid2h</b>  <b>5.1 lid2h</b> <b>5.1 lid2h, 5.1 lid2e</b>  <b>5.1 lid2h, 5.1 lid2e</b> . Interventies  van downstream-mediators van het immuun checkpoint CD40 hebben  laten zien dat door het mediëren van immuun  checkpoint-gemedieerde-ontstekingsreacties de ernst van atherosclerose  en type 2 diabetes afnemen in muizen <b>5.1 lid2h, 5.1 lid2e</b>  <b>5.1 lid2h, 5.1 lid2e</b> Met dit project kunnen wij verder bijdragen aan  het ontrafelen de rol van CD40 in acute immuun ziekten zoals HLH.</p>
Onderbouwing wetenschappelijk en maatschappelijk belang	Het belang is voldoende uitgewerkt en onderbouwd.

<p><b>Wetenschappelijke kwaliteit</b> Kwaliteit aanvrager/ onderzoeksgroep en onderzoek</p>	<p>Citaat DEC advies C7: De IvD ziet er op toe dat alle personen die betrokken zijn bij dit onderzoek, zowel de onderzoekers als de analisten die de experimenten gaan uitvoeren, als de onderzoekers die het project hebben vormgegeven en hebben opgeschreven, voldoen aan de wettelijke eisen van kennis en deskundigheid. De aanvragers zijn nieuw met dit model maar hebben veel ervaring met onderzoek aan CD40 in andere ziektemodellen. De DEC waardeert dat er pilot experimenten worden gedaan om te bepalen of de uitleesparameters niet eerder verkregen kunnen worden zodat de dieren minder lang (ernstig) ziek hoeven te zijn. De DEC oordeelt op basis hiervan dat de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen voldoende gewaarborgd zijn.  Het Secretariaat heeft geen reden te twifelen aan de kwaliteit van de aanvragers en het onderzoek.</p>
---	--

**3V's**

<p>Vervanging</p>	
	<p><b>3.4.3.1 Muizenmodel voor Hemofagocyttaire Lymfohistiocytose :</b> Citaat: HLH is een complexe immuun ziekte waarbij het met name mis gaat bij de 'communicatie' tussen de verschillende cellen in het immuunsysteem en de aangedane weefsels. Diermodellen zijn nodig om zowel de interactie tussen de immuuncellen te kunnen bestuderen, alsmede het effect hiervan op de door HLH aangedane weefsels. Parallel aan de studies met muismateriaal worden ook studies met humane cellen gedaan om in een vroeg stadium een relatie van bevindingen in de humane situatie te kunnen leggen. In patiënten materiaal zoals bloed kunnen wij ontstekingswaarden (o.a. cytokine productie, en immuuncel activatie) bepalen, om te onderzoeken of deze overeen komen met ons muismodel.</p>

Verminderen

**3.4.3.1 Muizenmodel voor Hemofagocyttaire Lymfocytose :**

Citaat:

**5.1 lid2h**

5.1 lid2h

5.1 lid2h, 5.1 lid2e

5.1 lid2h, 5.1 lid2e

5.1 lid2h, 5.1 lid2e Hierdoor weten wij dat CD40 belangrijk is in de door HLH aangedane cel processen, wat de kans van slagen van dit project groot maakt. Er zijn al zeer goede in vitro karakterisaties gedaan in cel modellen (cellijnen, primaire muiscellen en humane cellen), waardoor wij in dit project geen extra muizen hoeven te gebruiken voor in vitro experimenten om de rol van CD40, en de daarbij betrokken mediators en signaleringsmoleculen, te onderzoeken. Hierdoor kunnen wij in dit project keuzes maken voor specifieke aanpakken gebaseerd op in vitro studies, en dit leidt tot specifiekere proeven en minder diergebruik.

Er wordt ook deels gewerkt met beenmergtransplantatie studies waarbij door het transplanteren van beenmerg uit één enkele muis het immuunsysteem van vijf muizen wordt gerepopuleerd. Dit leidt tot een sterke vermindering van het aantal dieren vergeleken met het aantal dieren dat nodig zou zijn wanneer de juiste genotype verkregen zouden moeten worden door middel van kruisingen.

Power berekeningen worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken. Bevindingen uit de literatuur (Albeituni et al., Blood, 2019) worden meegenomen bij de power berekeningen. We hebben nu op basis van bekende gegevens een poweranalyse gedaan. Voor ieder experiment zal een nieuwe poweranalyse gedaan worden zodat het experiment met het minimum aantal dieren uitgevoerd wordt waarmee nog een betrouwbaar resultaat verkregen kan worden. Door de voorafgaande pilots om het model te optimaliseren, hopen we ook het aantal dieren dat gebruikt gaat worden in de experimenten te verminderen.

<b>Verfijnen</b>	
	<p><b>3.4.3.1 Muizenmodel voor Hemofagocyttaire Lymfocytose :</b> Citaat: Aan de hand van meerdere pilot experimenten proberen wij de proefopzet te verfijnen. Dit doen wij onder andere door de muizen op verschillende tijdstippen te doden na HLH inductie, en op deze manier te kijken of wij op een eerder tijdstip al het effect van een interventie op het HLH ziekteproces kunnen zien. Daarnaast is het bereiken van een HEP óók een wetenschappelijk eindpunt. De dieren die het einde van het experiment niet halen vanwege het bereiken van een HEP zullen gebruikt worden voor post-mortem analyses. Hierdoor worden deze muizen toch gebruikt om meer inzicht te verkrijgen in de pathogenese van deze aandoening.</p> <p>Waar mogelijk zal het aantal handelingen van de muis, met name de injecties, zo laag mogelijk worden gehouden. Er wordt de voorkeur gegeven aan geneesmiddelen die met een minimale frequentie worden gegeven, maar vanwege de farmacologische eigenschappen, bijvoorbeeld een hoge halfwaardetijd of slechte oplosbaarheid, van een geneesmiddel zal er soms vaker geïnjecteerd moeten worden. Wij zullen de dieren niet over een langere periode injecteren dan strikt noodzakelijk. Wanneer wij de dieren meer dan één keer per dag intraveneus moeten injecteren zullen wij een canuleren of een Alzet pomp gebruiken, om het ongerief lager te houden. Hierbij heeft het plaatsen van een Alzet pomp de voorkeur, aangezien deze dieren niet individueel gehuisvest hoeven te worden.</p> <p>Een deel van de muizen zal een genetische modificatie hebben of een interventie krijgen, waardoor het ziektebeeld minder ernstig wordt. Hierdoor zal het uiteindelijke ongerief bij deze muizen ondanks de inductie van HLH lager zijn.</p> <p>Mannelijke muizen worden om vechten te voorkomen in groepjes van drie tot vier muizen gehuisvest en krijgen twee huisjes. Ook zullen de transplantatie dieren indien nodig met hoogenergetisch week gemaakt voer gevoed worden.</p>
<b>Hergebruik</b>	Er is geen sprake van hergebruik van dieren.

Naam proef	Worden de dieren gedood?	Doden volgens richtlijn?
3.4.3.1 Muizenmodel voor Hemofagocyttaire Lymfocytose	Ja	volgens de richtlijn.

Naam proef		
<b>3.4.3.1 Muizenmodel voor Hemofagocyttaire Lymfocytose</b>	HEP: A: 2% B: 50% (In de pilot experimenten proberen wij het diermodel te verfijnen waardoor dit percentage lager zal uitvallen. Daarnaast is het bereiken van een HEP ook een wetenschappelijk eindpunt, deze dieren worden wel in de analyse worden gebruikt en moeten dus niet als 'uitval' gezien worden).	<p>Citaat:</p> <p>In het algemeen geldt: Bij het bereiken van humane eindpunten (d.w.z. verminderd exploratief gedrag in combinatie met tekenen van algemeen onwelzijn – openstaande vacht, abnormale houding, of bij dieren zonder HLH een gewichtsverlies &gt;15% t.o.v. hoogst gemeten of &gt;10% t.o.v. vorige weegpunt over een periode van twee tot drie dagen zal overgegaan worden tot het doden van dat specifieke dier.</p> <p>Verder zijn er nog specifieke humane eindpunten:</p> <p>A. Beenmergtransplantatie: Verminderde activiteit, onverzorgde vacht, houding of enige andere afwijking zoals beschreven in de SOP van de faciliteit evenals gewichtsverlies &gt;15% ten opzichte van het hoogst gemeten of &gt;10% ten opzichte van het vorige weegpunt over een periode van twee dagen.</p> <p>B. Ziekte score voor het HLH model: Om vast te stellen of muizen ongerief ondervinden observeren we het gedrag en het gewicht van de muis. Deze observaties resulteren in een ziekte score die de basis zijn voor de humane eindpunten.</p> <p>0: gezonde muis 1: Onverzorgde vacht en verminderde activiteit, minder dan 10% gewichtsverlies 2: Recht opstaande haren (pilo-erectie), minder actief gedrag, gebogen houding, 10-20% gewichtsverlies.</p> <p>3 (HEP): Pilo-erectie, sterk verminderd actief gedrag, gebogen houding, en meer dan 20% gewichtsverlies.</p>

		Muizen zullen tijdens het experiment ernstig gewichtsverlies doormaken en zeer ziek zijn, dit is een beschreven beeld in het ziekteverloop van HLH. Het gewichtsverlies kan oplopen tot 20% ten opzichte van het startgewicht van de muis en is een goede surrogaat parameter voor andere uitingen van HLH zoals anemie, hypotensie en heptosplenomegalie. Muizen met méér dan 20% gewichtsverlies ten opzichte van het startgewicht, ziektescore 3, zullen uit de studie gehaald worden, omdat dit als humaan eindpunt is gedefinieerd. Dieren die zo ernstig ziek zijn dat verwacht kan worden dat ze snel (de komende 12 uur) kunnen overlijden maar nog niet meer dan 20% zijn afgevallen, zullen ook gedood worden. Hierdoor kunnen deze dieren ook nog gebruikt worden voor wetenschappelijke analyses.
Muizen ( <i>Mus musculus</i> )	Ongerief: 93,3% Ernstig 6,7% Licht	

## 5 Samenvatting

# 5.2 lid1

De aanvrager geeft aan dat de dieren tijdens het geïnduceerde HLH ziektebeeld geen pijnbestrijding zullen ontvangen, omdat dit zou stroken met de proefopzet. **5.2 lid1**

Dieren die gecanuleerd worden, zullen individueel worden gehuisvest om te voorkomen dat kooigenoten aan de canules zullen knagen. **5.2 lid1**  
**5.2 lid1**


De DEC heeft in een minderheidsstandpunt weer dat de ethische afweging van één van de DEC leden resulteerde in een negatieve schade/baten analyse. Dit is op basis van de kleine patiëntenpopulatie en het gebruik van relatief veel proefdieren. Daarnaast zijn voor dit DEC lid de effectiviteit van de interventie en de opzet van de pilotexperimenten niet overtuigend. Het meerderheidsstandpunt van de DEC is tot stand gekomen op basis van de toegevoegde waarde van de ongedane kennis van het voorgestelde project.

## 5.2 lid1

Een groot deel van de dieren (±94%) zal naar verwachting ernstig ongerief



---

 Nummer: 1    Auteur: 5.1 lid2e    Onderwerp: Sticky Note    Datum: 22-6-2022 12:09:22  
Het positieve advies van de DEC is tot stand gekomen op basis van een meerderheidsstandpunt.



ondervinden. 5.2 lid1

**5.2 lid1**

**6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning**

**5.2 lid1**

*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 februari 2028 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

De ingangsdatum van de vergunning kan niet voor de verzenddatum van de beschikking zijn en zal indien van toepassing aangepast worden. Dit is ook het geval bij een voorgenomen besluit.

**7 Concept beschikking voor akkoord CCD**

het ernstige ongerief is inherent aan het diermodel.



# Advies aan CCD

Datum 22 juni 2022  
 Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD202215811

Instelling: 5.1 lid2h  
 Onderzoeker: 5.1 lid2e  
 Project: De rol van het immuun checkpoint eiwit CD40 in hemofagocyttaire lymfohistiocytose  
 Aanvraagnummer: AVD202215811  
 Betreft: Nieuwe aanvraag  
 Categorieën: Fundamenteel onderzoek  
 Translationeel of toegepast onderzoek

## 1 Inzicht in aanvraag en de eventuele knelpunten en risico's

<b>Proces</b>	De volgende vragen zijn gesteld aan de aanvrager.  Vragen over de NTS: Een deel van de dieren zal individueel gehuisvest kunnen worden. Kunt u dit in uw NTS omschrijven onder 'Expected impacts/adverse effects on the animals'?  Kunt u onder 'Explain the choice of species and the related life stages' en in de bijlage dierproeven onder 'B. De dieren - Diersoort' de translationele waarde van het gekozen diermodel beschrijven?  Kunt u onder 'Refinement' in uw NTS de term 'humaan eindpunt' verduidelijken voor het algemene publiek?  Kunt u in uw NTS onder 'Explain the choice of species and the related life stages' en in de bijlage dierproeven onder 'B. De dieren - Diersoort' de translationele waarde van het diermodel specifieker beschrijven?			
<b>Naam proef</b>	<b>Diersoort</b>	<b>Stam</b>	<b>Aantal dieren</b>	<b>Herkomst</b>
<b>3.4.3.1 Muizenmodel voor Hemofagocyttaire Lymfohistiocytose</b>				
	Muizen (Mus musculus)	WT & GGO	1.222	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn

## Huisvesting en verzorging anders dan Bijlage III Richtlijn

### 3.4.3.1 Muizenmodel voor Hemofagocyttaire Lymfohistiocytose

Citaat:

Dieren die gecannuleerd worden, moeten alleen gehuisvest worden om te voorkomen dat de cannules doorgebeten worden door kooigenoten.

## Onverdoofd gebruik terwijl verdoving wel gewenst

### 3.4.3.1 Muizenmodel voor Hemofagocyttaire Lymfohistiocytose

Citaat D:

[...]

Verdere pijnstilling tijdens HLH wordt niet gebruikt aangezien dit onverenigbaar is met de proefopzet. De meeste pijnstilling werkt ontstekingsremmend en zal dus ook de HLH-geassocieerde ontsteking remmen. We kiezen ervoor om geen opiaten als pijnstilling te geven, omdat wij de bijwerkingen van het gebruik van opiaten (obstipatie, misselijkheid en sufheid) niet vinden opwegen tegen de pijn die de dieren ervaren vanwege de HLH.

## Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

### 3.4.3.1 Muizenmodel voor Hemofagocyttaire Lymfohistiocytose

Muizen (*Mus musculus*) Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

<b>Locatie uitvoering experimenten</b>	- Alle proeven vinden plaats in een instelling van een vergunninghouder. - Er zijn geen problemen bekend met de vergunninghouder.
--	--

## 2 DEC advies

<b>DEC-advies</b>	Citaat C4: [...] De DEC heeft veel aanvullende vragen gesteld om een beter beeld te krijgen van deze relatie. Er waren twijfels over de transleerbaarheid van het model maar ook over de haalbaarheid van het uiteindelijke doel. Is het überhaupt wel mogelijk om zo'n ontspoorde immuunrespons nog bij te sturen. De aanvrager heeft dit verhelderd door aan te geven wat de overeenkomsten zijn tussen het beeld in de patiënt en het model. De DEC beoordeelde het model daarom geschikt voor deze (mechanistische) proeven. De aanvrager heeft daarnaast aangegeven dat trafinib in een ander acuut ontstekingsmodel (sepsis) in staat was om de ontstekingsreactie te remmen. Dit ondersteunt de hypothese dat een ontspoorde immuunrespons nog bij te sturen valt. 'Nieuw' aangetrokken immuuncellen kunnen een niet-inflammatoir fenotype houden waardoor uiteindelijk de ontspoorde immuunrespons bijgestuurd kan worden. Uiteindelijk blijft er (natuurlijk) onzekerheid of de hypothesen bevestigd
-------------------	---

zullen worden maar dit is inherent aan onderzoek doen naar een behandeling van een complexe immuunrespons. De DEC was niet unaniem in de beoordeling van deze relatie. Eén DEC lid was van mening dat er teveel onzekerheid was dat dit onderzoek een geneesmiddel kan opleveren, de overige DEC-leden waardeerden de bijdrage van dit onderzoek aan de ontwikkeling van een behandeling veel hoger (Zie verder de ethische afweging).

[...]

Citaat C10:

Er wordt afgeweken van bijlage III als dieren een canule aangelegd krijgen om continu medicijnen toe te kunnen dienen. De dieren worden dan individueel gehuisvest om te voorkomen dat kooigenoten de canule doorknagen. De DEC vindt dat de individuele huisvesting om deze reden voldoende onderbouwd is. Echter omdat de dieren ook erg ziek worden, merkt de DEC op dat, indien mogelijk, het plaatsen van een Alzet pompje onderzocht zou moeten worden, zodat de dieren nog steeds sociaal gehuisvest kunnen worden. Juist bij dieren die zo ernstig ziek worden, kan het individueel huisvesten zorgen voor extra ongerief.

Citaat C11:

Ongeriefinschatting is in overleg met de IvD tot stand gekomen, met gebruikmaking van de Toelichting Codering Ongerief. De dieren worden door de ontsparing van het immuunsysteem ziek. De muizen zullen veel energie gebruiken terwijl ze ook weinig eetlust hebben. De muizen zullen hierdoor snel afvallen. De DEC is van mening dat de dieren ernstig ongerief zullen ondergaan omdat ze zich een aantal dagen (erg) ziek kunnen voelen. De aanvrager geeft aan in een pilot te onderzoeken of eerdere tijdstippen bruikbaar zijn om de vragen te beantwoorden. Dit kan de duur van het ernstige ongerief verkorten. De DEC is van mening dat het induceren van deze cytokinestorm ingeschat moet worden als ernstig, ook als de proef uiteindelijk 'maar' 5 dagen i.p.v. 10 dagen zou duren. De beenmergdonoren worden zonder voorafgaande handelingen gedood. Het ongerief van deze dieren is ingeschat als 'licht' volgens de richtlijn van de NVWA.

Citaat C13:

[...]

De DEC heeft ook gediscussieerd over de relatie van deze HEP met het uitvalspercentage. De aanvragers geven aan dat 50% van de muizen het HEP kan bereiken. Al zullen ze proberen om dit terug te brengen tot 30% in de pilots. Bovendien zijn de muizen die een HEP bereiken nog steeds heel waardevol voor het onderzoek, en zouden niet als 'uitval' beschouwd moeten worden. Deze dieren worden ook geanalyseerd. In deze gevallen

overlappen de wetenschappelijke eindpunten met de HEPs. Desondanks zou de 'uitval' sterk beperkt kunnen worden als het HEP als 25% gewichtsverlies gedefinieerd zou worden. In de grafiek is te zien dat het gemiddelde gewichtsverlies rond de 20% is. De DEC schat in dat het ongerief wel (sterk) beperkt wordt door dieren die meer dan 20% gewicht verliezen uit de proef te halen. Deze dieren stabiliseren niet en lopen meer risico om te sterven tijdens de proef. De aanvrager voorkomt dit door dit HEP te kiezen. De DEC vindt dit gekozen HEP daarom passend. De DEC geeft de voorkeur aan het zoveel mogelijk beperken van het ernstige ongerief voor de individuele muis, ook al heeft dit als consequentie dat er meer dieren gebruikt moeten worden en zodoende ook meer dieren ernstig ongerief zullen ondergaan.

Citaat C16:

Dit model zal ernstig ongerief veroorzaken in de muizen. Gezien de vraagstelling valt dit niet te voorkomen. Binnen dit kader vindt de DEC 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 onderzoekers verschillende pilots zullen uitvoeren om te bepalen of de onderzoeksvragen ook op een eerder tijdstip in het model beantwoord kunnen worden en om te onderzoeken of het bereiken van ziektescore 3 beperkt kan worden;
- 2) de onderzoeksstrategie er op gericht is om eerst op een grove manier te bepalen of CD40 wel betrokken is bij de pathogenese van HLH, met CD40KO muizen, voordat er vervolgonderzoeken gestart worden;
- 3) er een HEP gedefinieerd is op ziekte verschijnselen én niet meer dan 20% gewichtsverlies, zo wordt het ernstige ongerief zoveel mogelijk beperkt;
- 4) er wordt geen pijnstilling gebruikt maar de DEC verwacht dat het meeste ongerief veroorzaakt wordt door het zich ziek voelen en niet zozeer door pijn;
- 5) de dieren hoogenenergetisch voer krijgen.

Ethische afweging van de DEC:

Citaat D:

1.

Rechtvaardigt het beantwoorden van de onderzoeksvraag "Inzicht krijgen in de werking van het immuun checkpoint eiwit CD40, alsook de mediators en signaleringsmoleculen die betrokken zijn bij de CD40 signaleringscascade, in een HLH muismodel en hoe deze het ziekteverloop beïnvloeden", het gebruik van 1222 muizen die licht (6%:82/1222) tot ernstig (94%: 1140/1222) ongerief kunnen ervaren door dit onderzoek?

2.

De belangrijkste belanghebbenden op korte termijn in dit fundamentele en translationele project zijn de proefdieren en de onderzoekers (zie ook het antwoord bij vraag C5).

Op de langere termijn bestaan de belanghebbenden uit patiënten met HLH. De toepassing van deze kennis in patiënten valt buiten het directe onderzoeksdoel van deze studie. Het belang van de patiënten dat een behandeling wordt gevonden is zeer groot maar of dit project daar direct aan bijdraagt is onzeker. Het belang van de bijdragen van het project wordt daarom op dit moment ingeschat op een gering voordeel. De (meerderheid van de) DEC is wel van mening dat dit op langere termijn wel een groot belang kan worden.

De muizen worden direct door dit onderzoek geschaad zoals beschreven onder punt 11 en 12. De andere groep belanghebbenden, namelijk de onderzoekers, zullen door dit onderzoek hun kennis en inzichten vergroten, welke gedeeld zullen worden met het wetenschappelijk veld. Aanvullende belangen van onderzoekers zouden kunnen zijn dat het onderzoek hun carrièremogelijkheden vergroot door publicaties.

Hoewel maximaal 1222 muizen gebruikt zullen worden voor dit onderzoek, waarvan 1140 dieren ernstig ongerief zullen ervaren, acht de meerderheid van de DEC dit gerechtvaardigd door de verwachte nuttige gevolgen van dit onderzoek. Het wetenschappelijk en maatschappelijk belang is in dit project duidelijk geformuleerd en dit projectvoorstel zal hier aan bijdragen. De meerderheid van de DEC waardeert de verwachte resultaten die kunnen leiden tot een betere behandeling van HLH, als de meest zwaarwegende waarde die tegen het gebruik en het ongerief van maximaal 1222 muizen opweegt.

3.

Kan een behandeling gericht op de CD40 signalering de acute immuunziekte "hemofagocytair lymfocytose" remmen in muizen?

Het antwoord op de centrale morele vraag was niet unaniem bij dit project. Voor één DEC lid wegen de verwachte opbrengsten niet op tegen het ernstige ongerief dat de muizen moeten ondergaan. In het beantwoorden van de morele vraag zal uitgegaan worden van het meerderheidsstandpunt maar wordt ook het minderheidsstandpunt verwoord.

De (meerderheid van de) DEC is van mening dat het onderzoeken van de



vraag "Inzicht krijgen in de werking van het immuuncheckpoint eiwit CD40, alsook de mediators en signaleringsmoleculen die betrokken zijn bij de CD40 signaleringscascade, in een HLH muismodel en hoe deze het ziekteverloop beïnvloeden", het gebruik van 1222 muizen en het licht (6%:82/1222) tot ernstige (94%: 1140/1222) ongerief dat ze kunnen ondergaan door dit onderzoek, rechtvaardigt.

Hemofagocytair lymfocytose is een ontsporing van het immuunsysteem, met name van de macrofagen, die acuut op kan treden bij patiënten die behandeld worden met een chemotherapie of als complicatie bij een virusinfectie. Deze aandoening is levensbedreigend. CD40 speelt een belangrijke rol in de communicatie tussen immuuncellen. In dit onderzoek wordt de hypothese getoetst dat het remmen van deze signalering de immuunontsporing en het ziekteverloop kan remmen. In de muizen worden kunstmatig de macrofagen geactiveerd waardoor een cytokinestorm opgewekt wordt, waarna de rol van CD40 nader bestudeerd zal worden. Er wordt onderzocht of een interventie op de CD40 signalering het ziekteverloop kan remmen.

De DEC heeft geworsteld met deze aanvraag zoals te zien is in het aantal vragen dat de DEC gesteld heeft in meerdere vragenrondes. De grootste worsteling was het rechtvaardigen van het ernstige ongerief bij de proefdieren zonder garantie dat de studie (direct) gaat leiden tot een waardevol medicijn voor de HLH-patiënt. Het model dat gebruikt wordt, zal ernstig ongerief veroorzaken bij de muizen. De dieren zullen maximaal 9 dagen erg ziek zijn. De DEC heeft vooral veel gediscussieerd en extra vragen gesteld over de uiteindelijke mogelijke opbrengsten van dit onderzoek. Er was twijfel of het wel mogelijk is om een ontspoorde immuunrespons nog bij te kunnen sturen. Kan een interventie tijdens een reeds ontspoorde immuunrespons nog voorkomen dat mensen overlijden aan HLH? De aanvragers gaven hier een realistisch antwoord op. Zij konden deze vraag nog niet beantwoorden om de simpele reden dat dit nog niet onderzocht is. De aanvragers onderbouwden wel hun hypothese met een eerder uitgevoerde 'proof of concept' proef in een sepsis model waarbij trafinib in staat was de ontwikkeling van sepsis te voorkomen. Ondanks dat dit niet vergelijkbaar is met het toedienen van trafinib tijdens de ontspoorde immuunrespons (i.p.v. gelijktijdig met het induceren van sepsis), geeft het wel aan dat het mogelijk kan voorkomen dat 'nieuwe' immuuncellen die aangetrokken worden, niet verder ontwikkelen tot het hyperinflammatoire fenotype. Het gaat in deze aanvraag vooral om het onderzoeken van de immuunrespons en de daarbijpassende interventies, waaronder trafinib, op het verloop van de ziekte. Het meerderheidstandpunt van de DEC was uiteindelijk dat deze vermeerdering in kennis, gezien de ernst van de ziekte, opweegt tegen

het ernstige ongerief van de dieren. Er is eerst meer kennis nodig over wat de ontspoorde immuunrespons kan afremmen voordat er een behandeling ontwikkeld kan worden voor de HLH-patiënt. Het aantal patiënten die dit per jaar treft, is relatief klein. De meeste DEC-leden vonden dit onderzoek ondanks het relatieve lage aantal patiënten gerechtvaardigd door de ernst en dodelijkheid van deze ziekte. Eén DEC-lid vond het aantal patiënten dat uiteindelijk belang heeft bij de opbrengsten van dit project te klein om het ernstige ongerief van maximaal 1140 muizen te rechtvaardigen. Bovendien vond dit DEC-lid ook de uiteindelijke meerwaarde voor de patiënten die in leven zouden blijven door een uiteindelijk medicijn te onzeker omdat er nu nog geen goede voorspelling gedaan kan worden over de kwaliteit van leven na deze behandeling. De patiënten die het betreft vaak ernstig onderliggend lijden hebben.

De aanvragers hebben door de strategie (pilots t.b.v. vermindering en verfijning) en het definiëren van het HEP zoveel mogelijk geprobeerd het ongerief te beperken. Het ongerief blijft ernstig maar dit komt doordat het een model is voor een ziekte waar mensen maar ook deze muizen levensbedreigend ziek door worden. De DEC miste in het voorstel de onderbouwing dat het voorgestelde model transleerbaar is naar HLH in mensen. De extra literatuurverwijzingen en een heldere beschrijving van de vergelijkbare ziekteprocessen in de mens en het model heeft de DEC overtuigd van de waarde van het model.

Het ongerief in deze proeven wordt veroorzaakt door het opwekken van een cytokine storm waardoor de dieren zich echt ziek zullen voelen. Het experiment duurt maximaal 10 dagen. De aanvrager zal in pilots onderzoeken of de duur zoveel mogelijk beperkt kan worden. Desondanks zullen de muizen deze ontsporing van het immuunsysteem moeten ondergaan en schat de DEC het ongerief als ernstig in, ook bij een kortere duur. De HEP's zijn zo gedefinieerd dat het ernstige ongerief zoveel mogelijk beperkt wordt en voorkomen wordt dat dieren sterven in de proef. De dieren worden vroegtijdig uit de proef gehaald als ze meer dan 20% gewicht verliezen. De DEC heeft besproken of de HEP niet gedefinieerd zou moeten worden als een hoger gewichtsverlies, dit zou het aantal dieren dat nodig is, kunnen beperken. De kans dat muizen dan sterven in de proef neemt dan wel toe. De DEC verkiest uit het oogpunt van verfijning het gewichtsverlies van 20% i.p.v. een hoger percentage (zie C13). Er wordt rekening gehouden met maximaal 50% uitval. 'Uitval' heeft in dit onderzoek echter een andere betekenis dan normaal gesproken. Dieren die eerder uit de proef gehaald worden, zullen wel geanalyseerd worden om de immuunrespons in kaart te brengen. De DEC waardeert dat deze muizen gebruikt worden voor het beantwoorden van de onderzoeksvraag.

De DEC acht het aannemelijk dat de doelstellingen binnen de kaders van het project behaald kunnen worden. De onderzoeksstrategie is logisch en navolgbaar en de uitkomstparameters sluiten logisch en helder aan bij de aangegeven doelstellingen. De DEC heeft hier aanvullende vragen over gesteld om een beter beeld te krijgen (zie antwoord op vraag C4). De aanvrager legt goed uit waarom er voor deze vragen geen proefdiervrije alternatieven kunnen worden gebruikt (zie C14). De DEC is er van overtuigd dat de aanvrager voldoende kennis en kunde heeft om de doelstellingen te behalen. Tevens verwacht de DEC op basis van deze aanvraag dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken door de onderzoeksstrategie en het gebruik van powerberekeningen. Er is een duidelijk go/no go moment beschreven. Eerst zal het model verfijnd worden in de faciliteit en zal onderzocht worden of CD40 een belangrijke rol speelt. Pas als dit het geval is zullen er vervolggexperimenten uitgevoerd worden waarin ook signaleringseiwitten bestudeerd kunnen worden. Deze go/no go voorkomt dat er proeven worden uitgevoerd terwijl CD40 uiteindelijk geen rol blijkt te spelen. Bovendien zal in de pilots indien 30% van de dieren een HEP bereikt op een bepaald tijdstip alle muizen gedood worden voor analyse. Dit voorkomt extra lijden bij de overige dieren. Uit de pilot moet blijken of de vragen ook op een eerder tijdstip beantwoord kunnen worden waardoor het aantal dagen met ernstig ongerief verkort kan worden.

Dit onderzoek maakt geen gebruik van dieren met een speciale herkomst. Ook is er geen speciale wet- en regelgeving van toepassing op dit project.

Gezien het bovenstaande komt de DEC tot het meerderheidstandpunt dat dit project het gebruik van proefdieren rechtvaardigt.

De DEC heeft extern advies ingewonnen bij

- de aanvrager is om aanvullingen gevraagd

De DEC heeft over vier termijnonderbrekingen vragen gesteld aan de aanvrager over de onderbouwing van het ziektemodel, de klinische toepasbaarheid en eigenschappen van trafinib, de onderbouwing voor de sterftepercentages, het toelichten van de strategie, het ontwerp van de pilotstudies en de sterfte bij de dieren voordat een HEP wordt bereikt.

Het DEC advies is Verlenen onder voorwaarden

Het uitgebrachte advies is niet gebaseerd op consensus.

Citaat E2:

Dit DEC advies is niet unaniem tot stand gekomen. We hebben ervoor gekozen om het minderheidsstandpunt van één DEC-lid toch ook te beschrijven in de ethische wegging. Het is deel geweest van de discussie waarbij uiteindelijk ieder DEC leden een eigen persoonlijke afweging heeft gemaakt. Beide standpunten zijn daarom in de ethische wegging beschreven.

Maar volgens het gevraagde voorbeeld:

Het advies is gebaseerd op een meerderheidsstandpunt. Eén DEC-lid kwam tot een negatief advies. Dit lid is 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 dat er sprake is van ernstig ongerief voor een aanzienlijke groep dieren (1140 van de in totaal 1222 dieren). Dat kan alleen gerechtvaardigd zijn als daar grote en vrij zekere baten tegenover staan, maar dat is zijn optiek niet het geval. Het is wel zo dat de trafinib-behandeling levensreddend kan zijn, dus dat zou een significante baat voor patiënten die het betreft zijn. Maar tegelijkertijd betreft het vermoedelijk niet heel veel patiënten: HLH is met 50-100 Nederlandse gevallen per jaar volgens de onderzoekers een 'zeer zeldzame ziekte', waarvan een uiteenlopend percentage daadwerkelijk overlijdt, maar ook een deel het met de huidige behandelingen al overleeft. Daarbij is onduidelijk hoeveel de overlevingskansen (en kwaliteit van leven) dankzij trafinib zouden gaan stijgen. Zoals hij het begrijpt hebben HLH-patiënten vaak ernstig onderliggend lijden en daarom sowieso al geen goede vooruitzichten, en is het ook maar de vraag hoe effectief de behandeling in de praktijk kan worden ingezet, gezien de korte tijd waarin HLH kritiek kan worden en de tijd die nodig is voor het stellen van de juiste diagnose. Om deze redenen schat hij de baten van het onderzoek niet als heel hoog in, en is hij er dus niet van overtuigd dat deze baten zullen opwegen tegen het ernstige ongerief voor 1140 dieren (plus licht ongerief voor 82 dieren). Derhalve geeft hij een negatief advies. Overigens is hij ook niet overtuigd van de opzet met pilots waardoor het daadwerkelijke experiment bekort kan worden maar behoorlijk veel extra dieren nodig zijn (zo'n 25% van de dieren zit in de pilots), en waarvan de data volgens de onderzoekers niet vergeleken kunnen worden met de data uit het daadwerkelijke experiment."

	<p>De volgende dilemma's zijn gesignaleerd door de DEC:  Citaat E3:  Bij het bespreken van deze projectaanvraag kwam het dilemma naar voren of een behandeling voor een kleine patiëntenpopulatie het gebruik van dieren 'waard' is. Zie de ethische weging hoe de DEC-leden hiermee om zijn gegaan.</p>
--	--

**3 Kwaliteit DEC advies**

<b>Kwaliteit DEC-advies</b>	<p>Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het DEC advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld. Bij de beantwoording van de beoordelingsvragen verstrekt u een heldere onderbouwing. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen.</p> <p>In C1 van uw advies verwijst u naar een voorbeeld uit de Handreiking Invulling definitie project. Hierbij verwijst u naar een verouderde nummering. Kunt u bij toekomstige adviezen de meest recente versie aanhouden, die is gepubliceerd op de website van de CCD?</p> <p>De dieren zullen niet in alle gevallen adequate pijnbestrijding ontvangen, waar dit wel gewenst kan zijn. De CCD had de visie van de DEC hierop graag teruggezien onder C9 van uw advies.</p> <p>De CCD waardeert de wijze waarop de DEC helder inzichtelijk heeft gemaakt waarom het advies met een meerderheidsstandpunt tot stand is gekomen, en de goed navolgbare onderbouwing waarom één DEC lid het positieve advies niet deelde.</p>
-----------------------------	--

#### 4 Inhoudelijke beoordeling

<b>Doelstelling</b> Doelstelling	<p>Citaat: Het directe doel van dit project is inzicht krijgen in de werking van het immuun checkpoint eiwit CD40, alsook de mediators en signaleringsmoleculen betrokken zijn bij de CD40 signaleringscascade, in een HLH muismodel en hoe deze het ziekteverloop beïnvloeden. Het uiteindelijke doel is om te onderzoeken of CD40 signalering een aangrijpingspunt is voor een interventie, bijvoorbeeld met trafinib, die gebruikt kan worden voor de ontwikkeling van een behandeling van HLH patiënten.</p> <p>Verschillende subdoelen moeten behaald worden om tot het directe doel te komen, te weten:</p> <ol style="list-style-type: none"><li>1. Via welke processen reguleren het immuun checkpoint CD40 en de daarbij betrokken mediators en signaleringsmoleculen de activatie van verschillende (immuun)celtypen in een HLH ziektemodel en wat is het effect hiervan op het ziekteverloop.</li><li>2. Wat zijn de effecten van interventies (onder andere genetisch, farmacologisch) in deze processen op specifieke (immuun)cel functies die belangrijk zijn bij HLH en hoe beïnvloedt dit het ziekteverloop.</li></ol>
Wetenschappelijk en maatschappelijk belang	<p>Citaat: Maatschappelijk belang Per jaar worden er in Nederland ongeveer 50-100 mensen gediagnostiseerd met HLH, waarbij 8-54% komt te overlijden in de acute fase van HLH. Met de kennis verkregen in dit project willen we nieuwe immunologische mechanismen ontrafelen die bijdragen aan het ontstaan van HLH bij de muis. Wanneer deze kennis in de toekomst geëxtrapoleerd wordt naar de mens kan CD40 therapie een uitkomst bieden in de behandeling van HLH. <b>5.1 lid2h</b></p> <p><b>5.1 lid2h, 5.1 lid2e</b></p> <p>Wanneer blijkt dat trafinib een mogelijke behandelstrategie is voor HLH in muizen, kan hierdoor sneller de stap worden gemaakt om trafinib in een klinische studie bij HLH patiënten te onderzoeken. Daarnaast blijkt uit eerdere studies dat het muismodel van HLH veel overlap vertoont met het ziektebeeld dat wordt gezien bij HLH patiënten. De voor HLH kenmerkende macrofaag geïnduceerde cytokine storm is vergelijkbaar in mens en muis en wordt gekenmerkt door onder andere een verhoogde productie van de cytokines IFN<math>\gamma</math>, TNF<math>\alpha</math>, en IL-6 (Albeituni et al., Blood, 2019; <b>5.1 lid2h, 5.1 lid2e</b>). Ook lopen er op dit moment klinische studies naar de effectiviteit van emampalumab (IFN<math>\gamma</math>-blokkerend antilichaam) bij primaire HLH (de erfelijke variant), deze bevindingen zijn gedaan in de muis en zijn in de eerste klinische</p>

	<p>trials ook al effectief gebleken bij HLH patiënten <a href="#">5.1 lid2h</a>, <a href="#">5.1 lid2e</a> . Dit toont aan dat resultaten behaald in de muis geëxtrapoleerd kunnen worden naar de mens, wat een goede indicatie is dat de bevindingen die in dit project worden gedaan van belang zijn voor het patiënten welzijn en daarmee bijdragen aan het maatschappelijke belang van dit project. Ondanks dat emampalumab effectief lijkt te zijn in de behandeling van primaire HLH, is er een maatschappelijk belang om te blijven zoeken naar alternatieve therapieën van HLH. Voor secundaire HLH kan emampalumab namelijk minder effectief zijn, doordat secundaire HLH een andere oorzaak heeft dan primaire HLH. Waar bij primaire HLH erfelijkheid een grote rol speelt, is de onderliggende oorzaak bij secundaire HLH vaak een infectie of kanker. Emampalumab blokkeert de IFN<math>\gamma</math> respons, een belangrijke respons bij virale infecties, waardoor deze therapie niet geschikt is wanneer de secundaire HLH wordt uitgelokt door een virale infectie. Hierdoor is het van belang om specifiek voor secundaire HLH op zoek te gaan naar nieuwe en betere therapeutische strategieën. Daarom willen wij in dit project onderzoeken of CD40 therapie effectief is in secundaire HLH, doordat CD40 therapie specifiek aangrijpt op de door HLH gedysreguleerde macrofagen, maar ondertussen wel de rest van de immuun respons intact laat.</p> <p>Wetenschappelijk belang  Wetenschappelijk gezien zal de kennis die we met dit project vergaren bijdragen aan het begrijpen van de rol van het immuun checkpoint CD40 in HLH, en deze kennis is mogelijk ook relevant voor andere immuun gerelateerde ziekten. Door onze onderzoeksgroep uitgevoerde dierproeven hebben wij reeds het belang van CD40, maar ook diverse andere immuun checkpoints, in het ontstaan van hart- en vaatziekten en obesitas geïnduceerde ontstekingen aangetoond (Kusters et al., 2018; Aarts et al., 2018; Aarts et al., 2019; Reiche et al., 2019). Interventies van downstream-mediators van het immuun checkpoint CD40 hebben laten zien dat door het mediëren van immuun checkpoint-gemedieerde-ontstekingsreacties de ernst van atherosclerose en type 2 diabetes afnemen in muizen (Chatzigeorgiou et al., 2014; Lameijer et al., 2018). Met dit project kunnen wij verder bijdragen aan het ontrafelen de rol van CD40 in acute immuun ziekten zoals HLH.</p>
Onderbouwing wetenschappelijk en maatschappelijk belang	Het belang is voldoende uitgewerkt en onderbouwd.

<p><b>Wetenschappelijke kwaliteit</b> Kwaliteit aanvrager/ onderzoeksgroep en onderzoek</p>	<p>Citaat DEC advies C7: De IVD ziet er op toe dat alle personen die betrokken zijn bij dit onderzoek, zowel de onderzoekers als de analisten die de experimenten gaan uitvoeren, als de onderzoekers die het project hebben vormgegeven en hebben opgeschreven, voldoen aan de wettelijke eisen van kennis en deskundigheid.</p> <p>De aanvragers zijn nieuw met dit model maar hebben veel ervaring met onderzoek aan CD40 in andere ziektemodellen. De DEC waardeert dat er pilot experimenten worden gedaan om te bepalen of de uitleesparameters niet eerder verkregen kunnen worden zodat de dieren minder lang (ernstig) ziek hoeven te zijn. De DEC oordeelt op basis hiervan dat de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen voldoende gewaarborgd zijn.</p> <p>Het Secretariaat heeft geen reden te twijfelen aan de kwaliteit van de aanvragers en het onderzoek.</p>
---	--

**3V's**

<p>Vervanging</p>	
	<p><b>3.4.3.1 Muizenmodel voor Hemofagocyttaire Lymfocytose :</b> Citaat: HLH is een complexe immuun ziekte waarbij het met name mis gaat bij de 'communicatie' tussen de verschillende cellen in het immuunsysteem en de aangedane weefsels. Diermodellen zijn nodig om zowel de interactie tussen de immuuncellen te kunnen bestuderen, alsmede het effect hiervan op de door HLH aangedane weefsels. Parallel aan de studies met muismateriaal worden ook studies met humane cellen gedaan om in een vroeg stadium een relatie van bevindingen in de humane situatie te kunnen leggen. In patiënten materiaal zoals bloed kunnen wij ontstekingswaarden (o.a. cytokine productie, en immuuncel activatie) bepalen, om te onderzoeken of deze overeen komen met ons muismodel.</p>



Verminderen

**3.4.3.1 Muizenmodel voor Hemofagocytaire Lymfocytose :**

Citaat:

5.1 lid2h

5.1 lid2h, 5.1 lid2e

Hierdoor weten wij dat CD40 belangrijk is in de door HLH aangedane cel processen, wat de kans van slagen van dit project groot maakt. Er zijn al zeer goede in vitro karakterisaties gedaan in cel modellen (cellijnen, primaire muiscellen en humane cellen), waardoor wij in dit project geen extra muizen hoeven te gebruiken voor in vitro experimenten om de rol van CD40, en de daarbij betrokken mediators en signaleringsmoleculen, te onderzoeken. Hierdoor kunnen wij in dit project keuzes maken voor specifieke aanpakken gebaseerd op in vitro studies, en dit leidt tot specifiekere proeven en minder diergebruik.

Er wordt ook deels gewerkt met beenmergtransplantatie studies waarbij door het transplanteren van beenmerg uit één enkele muis het immuunsysteem van vijf muizen wordt gerepopuleerd. Dit leidt tot een sterke vermindering van het aantal dieren vergeleken met het aantal dieren dat nodig zou zijn wanneer de juiste genotype verkregen zouden moeten worden door middel van kruisingen.

Power berekeningen worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken. Bevindingen uit de literatuur (Albeituni et al., Blood, 2019) worden meegenomen bij de power berekeningen. We hebben nu op basis van bekende gegevens een poweranalyse gedaan. Voor ieder experiment zal een nieuwe poweranalyse gedaan worden zodat het experiment met het minimum aantal dieren uitgevoerd wordt waarmee nog een betrouwbaar resultaat verkregen kan worden. Door de voorafgaande pilots om het model te optimaliseren, hopen we ook het aantal dieren dat gebruikt gaat worden in de experimenten te verminderen.

Verfijnen	<p><b>3.4.3.1 Muizenmodel voor Hemofagocytaire Lymfocytose :</b>  Citaat:  Aan de hand van meerdere pilot experimenten proberen wij de proefopzet te verfijnen. Dit doen wij onder andere door de muizen op verschillende tijdstippen te doden na HLH inductie, en op deze manier te kijken of wij op een eerder tijdstip al het effect van een interventie op het HLH ziekteproces kunnen zien. Daarnaast is het bereiken van een HEP óók een wetenschappelijk eindpunt. De dieren die het einde van het experiment niet halen vanwege het bereiken van een HEP zullen gebruikt worden voor post-mortem analyses. Hierdoor worden deze muizen toch gebruikt om meer inzicht te verkrijgen in de pathogenese van deze aandoening.</p> <p>Waar mogelijk zal het aantal handelingen van de muis, met name de injecties, zo laag mogelijk worden gehouden. Er wordt de voorkeur gegeven aan geneesmiddelen die met een minimale frequentie worden gegeven, maar vanwege de farmacologische eigenschappen, bijvoorbeeld een hoge halfwaardetijd of slechte oplosbaarheid, van een geneesmiddel zal er soms vaker geïnjecteerd moeten worden. Wij zullen de dieren niet over een langere periode injecteren dan strikt noodzakelijk. Wanneer wij de dieren meer dan één keer per dag intraveneus moeten injecteren zullen wij een canuleren of een Alzet pomp gebruiken, om het ongerief lager te houden. Hierbij heeft het plaatsen van een Alzet pomp de voorkeur, aangezien deze dieren niet individueel gehuisvest hoeven te worden.</p> <p>Een deel van de muizen zal een genetische modificatie hebben of een interventie krijgen, waardoor het ziektebeeld minder ernstig wordt. Hierdoor zal het uiteindelijke ongerief bij deze muizen ondanks de inductie van HLH lager zijn.</p> <p>Mannelijke muizen worden om vechten te voorkomen in groepjes van drie tot vier muizen gehuisvest en krijgen twee huisjes. Ook zullen de transplantatie dieren indien nodig met hoogenergetisch week gemaakt voer gevoed worden.</p>
<b>Hergebruik</b>	Er is geen sprake van hergebruik van dieren.

Naam proef	Worden de dieren gedood?	Doden volgens richtlijn?
3.4.3.1 Muizenmodel voor Hemofagocyttaire Lymfocytose	Ja	volgens de richtlijn.

Naam proef		
<b>3.4.3.1 Muizenmodel voor Hemofagocyttaire Lymfocytose</b>	HEP: A: 2% B: 50% (In de pilot experimenten proberen wij het diermodel te verfijnen waardoor dit percentage lager zal uitvallen. Daarnaast is het bereiken van een HEP ook een wetenschappelijk eindpunt, deze dieren worden wel in de analyse worden gebruikt en moeten dus niet als 'uitval' gezien worden).	<p>Citaat: In het algemeen geldt: Bij het bereiken van humane eindpunten (d.w.z. verminderd exploratief gedrag in combinatie met tekenen van algemeen onwelzijn – openstaande vacht, abnormale houding, of bij dieren zonder HLH een gewichtsverlies &gt;15% t.o.v. hoogst gemeten of &gt;10% t.o.v. vorige weegpunt over een periode van twee tot drie dagen zal overgegaan worden tot het doden van dat specifieke dier.</p> <p>Verder zijn er nog specifieke humane eindpunten:</p> <p>A. Beenmergtransplantatie: Verminderde activiteit, onverzorgde vacht, houding of enige andere afwijking zoals beschreven in de SOP van de faciliteit evenals gewichtsverlies &gt;15% ten opzichte van het hoogst gemeten of &gt;10% ten opzichte van het vorige weegpunt over een periode van twee dagen.</p> <p>B. Ziekte score voor het HLH model: Om vast te stellen of muizen ongerief ondervinden observeren we het gedrag en het gewicht van de muis. Deze observaties resulteren in een ziekte score die de basis zijn voor de humane eindpunten.</p> <p>0: gezonde muis 1: Onverzorgde vacht en verminderde activiteit, minder dan 10% gewichtsverlies 2:Recht opstaande haren (pilo-erectie), minder actief gedrag, gebogen houding, 10-20% gewichtsverlies.</p> <p>3 (HEP): Pilo-erectie, sterk verminderd actief gedrag, gebogen houding, en meer dan 20% gewichtsverlies.</p>

		Muizen zullen tijdens het experiment ernstig gewichtsverlies doormaken en zeer ziek zijn, dit is een beschreven beeld in het ziekteverloop van HLH. Het gewichtsverlies kan oplopen tot 20% ten opzichte van het startgewicht van de muis en is een goede surrogaat parameter voor andere uitingen van HLH zoals anemie, hypotensie en hepatosplenomegalie. Muizen met méér dan 20% gewichtsverlies ten opzichte van het startgewicht, ziektescore 3, zullen uit de studie gehaald worden, omdat dit als humaan eindpunt is gedefinieerd. Dieren die zo ernstig ziek zijn dat verwacht kan worden dat ze snel (de komende 12 uur) kunnen overlijden maar nog niet meer dan 20% zijn afgevallen, zullen ook gedood worden. Hierdoor kunnen deze dieren ook nog gebruikt worden voor wetenschappelijke analyses.
Muizen ( <i>Mus musculus</i> )	Ongerief: 93,3% Ernstig 6,7% Licht	

## 5 Samenvatting

### 5.2 lid1

De aanvrager geeft aan dat de dieren tijdens het geïnduceerde HLH ziektebeeld geen pijnbestrijding zullen ontvangen, omdat dit zou stroken met de proefopzet. 5.2 lid1

Dieren die gecanuleerd worden, zullen individueel worden gehuisvest om te voorkomen dat kooigenoten aan de canules zullen knagen. Zowe 5.2 lid1

Het positieve advies van de DEC is tot stand gekomen op basis van een meerderheidsstandpunt. De DEC geeft in een minderheidsstandpunt weer dat de ethische afweging van één van de DEC leden resulteerde in een negatieve schade/baten analyse. Dit is op basis van de kleine patiëntenpopulatie en het gebruik van relatief veel proefdieren. Daarnaast zijn voor dit DEC lid de effectiviteit van de interventie en de opzet van de pilotexperimenten niet overtuigend. Het meerderheidsstandpunt van de DEC is tot stand gekomen op basis van de toegevoegde waarde van de opgedane kennis van het voorgestelde project. 5.2 lid1

Een groot deel van de dieren ( $\pm 94\%$ ) zal naar verwachting ernstig ongerief ondervinden. Het ernstige ongerief is inherent aan het diermodel. [5.2 lid1](#)

[Redacted text block]

## **6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning**

[5.2 lid1](#)

[Redacted text block]

### *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 februari 2028 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

De ingangsdatum van de vergunning kan niet voor de verzenddatum van de beschikking zijn en zal indien van toepassing aangepast worden. Dit is ook het geval bij een voorgenomen besluit.

## **7 Concept beschikking voor akkoord CCD**

**Van:** info@zbo-ccd.nl  
**Verzonden:** woensdag 22 juni 2022 18:11  
**Aan:** 5.1 lid2e  
**CC:** 5.1 lid2e 5.1 lid2h  
**Onderwerp:** Aanhouden AVD 5.1 lid2h 202215811

Geachte 5.1 lid2e

Op 28-01-2022 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "De rol van het immuun checkpoint eiwit CD40 in hemofagocyttaire lymfohistiocytose " met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202215811. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In dit bericht leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

#### Welke informatie nog nodig

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

#### Niet technische samenvatting

Een deel van de dieren zal individueel gehuisvest kunnen worden. Kunt u dit in uw NTS omschrijven onder 'Expected impacts/adverse effects on the animals'?

Kunt u onder 'Explain the choice of species and the related life stages' en in de bijlage dierproeven onder 'B. De dieren - Diersoort' de translationele waarde van het gekozen diermodel beschrijven?

Kunt u onder 'Refinement' in uw NTS de term 'humaan eindpunt' verduidelijken voor het algemene publiek?

Kunt u in uw NTS onder 'Explain the choice of species and the related life stages' en in de bijlage dierproeven onder 'B. De dieren - Diersoort' de translationele waarde van het diermodel specifieker beschrijven?

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

#### Opsturen binnen veertien dagen

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

#### Wanneer een beslissing

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

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

Met vriendelijke groet,  
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

5.1 lid2e

[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

.....

Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag

.....  
T: 0800 789 0789

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



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

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

### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in. 5.1 lid2h
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in. 5.1 lid2h
- 1.3 Vul het volgnummer en de titel van de dierproef in.
- |  | Volgnummer | Titel dierproef                               |
|--|------------|---|
|  | 1          | Muizenmodel voor Hemofagocyttaire Lymfocytose |

*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.3 van het format Projectvoorstel.*

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

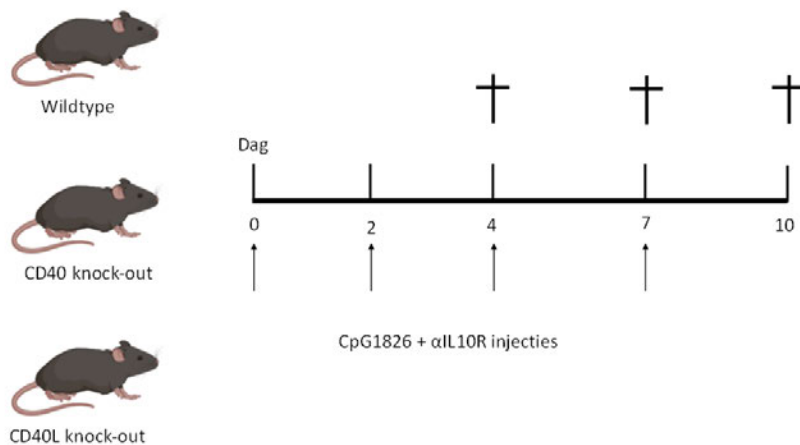


Afhankelijk van het immuun checkpoint (o.a. CD40 of CD40L) of de betrokken mediators of signaleringsmoleculen die bestudeerd worden zullen transgene, knock-in, knock-out, of conditionele (bijvoorbeeld cel specifieke of induceerbare) muismodellen gebruikt worden. Deze muizen zullen vervolgens onderworpen worden aan het HLH model en zo kan de rol van het immuun checkpoint CD40 en de betrokken mediators of signaleringsmoleculen in kaart worden gebracht, waarna interventies onderzocht kunnen worden. Het effect van de kandidaat op HLH kan gemeten worden aan de hand van de ernst en de duur van de symptomen. De primaire uitkomstparameter is gewichtsverlies, welke al snel na inductie van HLH zichtbaar is en na ongeveer vier dagen stabiliseert (Albeituni *et al.*, Blood, 2019). De dieren verliezen veel gewicht vanwege onder andere een verminderde eetlust en verhoogd energieverbruik ten gevolge van de cytokine storm. Andere uitingen van een cytokine storm zoals koorts, anemie, hypotensie, of heptosplenomegalie ontstaan vaak parallel aan het gewichtsverlies, maar zijn geen specifieke prodromen voor het cytokine release syndroom en dus voor HLH. Gewichtsverlies is zeer geschikt als surrogaatparameter om een indicatie te krijgen van de ernst van het HLH ziekteverloop en het eventuele effect van een interventie. Aan de hand van pilot studies zullen wij op meerdere momenten bloed afnemen om ontstekingswaarden te meten en zullen wij bekijken of hier een geschikte uitleesparameter tussen zit waardoor wij onze wetenschappelijke vragen eerder in het ziekteproces kunnen beantwoorden en de ziekteduur, en daarmee het ongerief, te verkorten. Bij deze metingen zullen wij kijken naar een verandering in absolute aantallen immuun cellen en veranderingen in immuun cel activiteit, zoals een verhoogde cel proliferatie en verhoogde productie van cytokines. Voor een aantal analyses, zoals histologie, flow cytometrie, qPCR van de door HLH aangedane weefsels moeten de organen uitgenomen worden. In pilot studies zullen wij de muizen op verschillende tijdstippen doden, om te onderzoeken wat de ideale tijdslijn is waarin wij het ongerief van de muizen beperkt kunnen houden, maar wij wel onze wetenschappelijke vragen kunnen beantwoorden.

#### Aanpak:

**Pilot:** Voor de introductie van dit model in onze dierenfaciliteit zullen pilot proeven uitgevoerd moeten worden. In het kader van verfijning zullen wij meerdere pilots uitvoeren met als doel het ongerief voor de muizen te verminderen en/of de duur van het ongerief te verkorten. Allereerst gaan wij de rol van CD40 signalering in HLH bevestigen door wildtype muizen en CD40/CD40L knock-out muizen te onderwerpen aan het HLH ziektemodel. Alleen wanneer er een effect van CD40 en/of CD40L op het HLH verloop wordt gezien, zullen wij verdere experimenten uitvoeren. Deze kennis draagt tevens bij aan het behalen van het eerste subdoel van dit project, waarin wij onderzoeken via welke processen het immuun checkpoint CD40 en de daarbij betrokken mediators en signaleringsmoleculen de activatie van verschillende (immuun)celtypen in een HLH ziektemodel reguleren en wat het effect hiervan is op het ziekteverloop. Deze eerste pilot studie vormt ook een basis voor verdere pilot experimenten, waarin wij zullen bepalen of het ongerief van de dieren verminderd kan worden. Om ook in de eerste pilot het ongerief niet hoger te laten worden dan strikt noodzakelijk zullen wij op het moment dat meer dan 30% van de dieren een HEP bereikt alle muizen doden en het experiment stopzetten. Dit eindpunt zal dan ook het eindpunt worden van de tweede pilot, waarbij wij zullen bepalen of de tijdslijn van het experiment verkort kan worden, en daarmee ook de duur van het ongerief verminderd wordt.

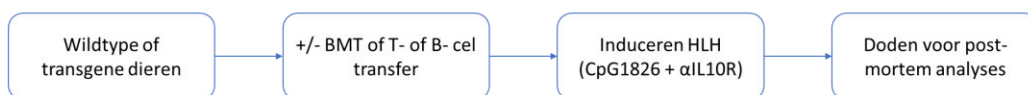
In een tweede pilot studie gaan wij de muizen op verschillende tijdstippen na HLH inductie te doden, en vervolgens bepalen of er een effect is van de CD40 of CD40L knock-out op HLH. Ook hier geldt, wanneer blijkt dat op een bepaald tijdstip 30% van de dieren het humane eindpunt bereikt van meer dan 20% gewichtsverlies zullen wij alle muizen doden en is dit het eindpunt van de pilot studie. Dieren die het humane eindpunt bereiken worden vervolgens wel gebruikt om de wetenschappelijke vragen te beantwoorden. Aan de hand van analyses op de uitgenomen weefsels en het meten van immunologische parameters zoals cytokine productie en immuun cel activatie markers wordt bepaald of de dieren de voor HLH karakteristieke cytokine storm hebben doorgemaakt. Op deze manier kunnen wij bepalen of het wel of niet noodzakelijk is om de dieren langer in het experiment te houden om onze wetenschappelijke vragen te beantwoorden. Samen zullen deze pilot studies bijdragen aan de verfijning van de experimenten.



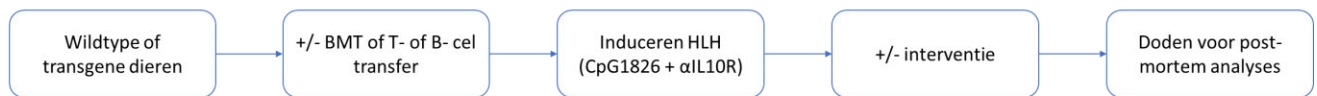
**Figuur 1 Mogelijke opzet pilot studies** In de pilot studies zullen wij eerst de rol van CD40 signalering in HLH bevestigen door gebruik te maken van een CD40 of CD40L knock-out muis. Daarnaast zullen wij in deze pilot experimenten bepalen op welk tijdstip de effecten van de CD40 of CD40L knock-out goed meetbaar zijn en het ongerief voor de muizen niet ernstiger dan strikt noodzakelijk laat zijn om onze wetenschappelijke vragen te beantwoorden. De tijdstippen van het doden van de muizen aangegeven in het figuur dienen enkel als voorbeeld, maar zal maximaal tot dag 10 zijn.

**Experimenten:** Afhankelijk van de conclusies die uit de pilot experimenten worden getrokken worden de muizen over een tijdsbestek van maximaal tien dagen meerdere malen intra peritoneaal geïnjecteerd met CpG1826 en  $\alpha$ IL10R voor de inductie van HLH (Albeituni *et al.*, Blood, 2019). HLH inductie kan eventueel worden voorafgegaan door een beenmergtransplantatie of T- of B cel transfer. Interventie injecties (i.p., i.v., of s.c.) kunnen gegeven worden met factoren die immuun checkpoints reguleren of hun signaaltransductie moduleren zoals small molecules, cytokines, siRNAs, en antilichamen, dit kan zowel voorafgaand of tijdens HLH inductie zijn. Tijdens en aan het einde van het experiment vinden bloedafnames plaats voor biochemische en immunologische bepalingen. Op maximaal tien dagen na de eerste HLH injectie worden de dieren gedood voor de analyse van (immuun)cellen. De experimentele flow is aangegeven in onderstaande figuren:

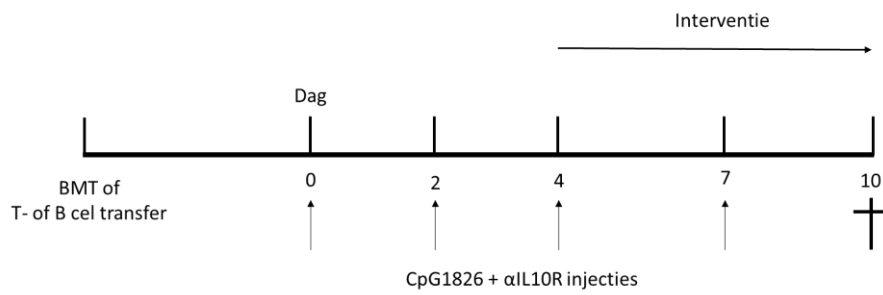
**Subdoel 1: Effect van het immuun checkpoint CD40 en daarbij betrokken mediators en signaleringsmoleculen op HLH**



**Subdoel 2: Effect van het immuun checkpoint interventie op HLH**



**Figuur 2 Algemene experimenten flow** Om de wetenschappelijke vraag te beantwoorden maken wij gebruik van een experimentele flow zoals in het figuur weergegeven. Voor het experiment worden wildtype of transgene (bijvoorbeeld een cel-specifieke CD40 of CD40L knock-out) dieren gebruikt. Het is ook mogelijk dat de muizen een beenmergtransplantatie (BMT) of een T- of B- cel transfer ondergaan om een immuuncel-specifieke knock-out van het immuun checkpoint CD40 of een betrokken mediator of signaleringsmolecuul te verkrijgen zonder kruisingen van een muizenlijn. Vervolgens ondergaan de muizen HLH, waarbij ze geïnjecteerd worden met CpG1826 en  $\alpha$ IL10R. Bij het onderzoeken van een interventie die aangrijpt of het immuun checkpoint CD40 ontvangen de muizen injecties met de interventie gedurende het HLH ziekteproces. Maximaal tien dagen na de eerste injectie voor HLH inductie worden de muizen gedood voor post-mortem analyses.



**Figuur 3 Tijdslijn HLH ziekteproces** Afhankelijk van de pilot experimenten is dit een mogelijke tijdslijn voor de HLH experimenten. Op dag 0 krijgen de muizen de eerste CpG1826 en αIL10R injectie. Een interventie kan toegediend worden na inductie van HLH. Dit kan zoals hierboven aangegeven vanaf dag 4, wanneer naar alle waarschijnlijkheid HLH het meest ernstig is. Afhankelijk van de pilot studies kan er ook besloten worden de interventies eerder of later te starten.

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

#### Handelingen:

**Oorknip:** om dieren te kunnen identificeren zal, alleen indien nodig, in bepaalde experimenten muizen geoorknip worden om ze te kunnen identificeren.

**Beenmergtransplantatie (BMT):** Bij een beenmergtransplantatie wordt het beenmerg van de dieren vervangen door het gewenste beenmerg (geïsoleerd uit donordieren) om zo de effecten van het immuun checkpoint CD40 in de verschillende hematopoëtische cellen te kunnen bestuderen en wat het effect hiervan is op HLH. Voor de vervanging worden de acceptor dieren twee maal bestraald met maximaal 6 Gray en vervolgens i.v. geïnjecteerd met donor beenmerg (geïsoleerd zoals beschreven bij beenmergisolatie) en een herstel van zes weken (ongeveer matig voor de acceptor dieren; ongeveer licht voor donordieren).

**Beenmergisolatie:** Om beenmerg te isoleren worden de dieren gedood en worden de botten geïsoleerd voor cel isolatie.

**T- of B cel transfer:** Bij een T- of B cel transfer worden T cellen of B cellen, met bijvoorbeeld een deletie van het immuun checkpoint CD40 of de daarbij betrokken signaleringsmoleculen, uit de milt en/of lymfeklieren gehaald en worden vervolgens één keer per twee weken (zolang behouden de cellen hun activiteit) gedurende maximaal acht weken intraveneus ingespoten in muizen zonder T- of B cellen om zo de effecten van veranderingen in T- of B cellen te kunnen bestuderen.

**Dieet:** Nat gemaakt hoog energetisch dieet wordt tijdelijk gegeven wanneer de dieren verzwakt zijn door een voorgaande handeling (na bestraling voorafgaand aan BMT) en tijdens HLH inductie.

**HLH model:** Muizen (op een C57BL/6 achtergrond) worden i.p. geïnjecteerd met een TLR9 agonist (CpG1826) en een IL10 receptor antagonist ( $\alpha$ IL10R) (op dag 0, 2, 4 en 7) voor de inductie van HLH (Albeituni *et al.*, Blood, 2019). Tijdens bepaalde experimenten zal op om en nabij dag 2 en 7 bloed worden afgenomen. Door bloed op bijvoorbeeld dag 2 af te nemen, wat mogelijk net voor de start van de interventie is, kunnen wij beter inschatten wat het effect is van de interventie. Maximaal tien dagen na inductie worden de muizen gedood voor analyse van aantallen rode- en witte bloedcellen en bloedplaatjes, en specifieke typen immuun cellen en cytokines.

**Intraperitoneale (i.p.) toediening:** Het intra peritoneaal toedienen van geneesmiddelen, liganden of cellen door middel van een injectienaald. Frequentie hangt af van de proef, maar is maximaal twee keer per dag gedurende maximaal tien dagen. Twee keer per dag kan soms nodig zijn doordat er bij HLH sprake is van een zeer acute en zeer heftige inflammatoire respons is. Om de continue aanwas van activatie en de nieuw geproduceerde immuuncellen tegen te gaan, kan het soms nodig zijn om de dieren twee keer per dag te injecteren. Dit is het absolute maximum, maar wij verwachten de muizen minder vaak te moeten injecteren. Het precieze aantal injecties zal bepaald worden aan de hand van de farmacologische eigenschappen van het geneesmiddel en in overleg met de IvD.

**Subcutane (s.c.) toediening:** Het subcutaan toedienen van geneesmiddelen, liganden of cellen door middel van een injectienaald. Frequentie hangt af van de proef, maar is maximaal twee keer per dag gedurende maximaal tien dagen. Twee keer per dag kan soms nodig zijn doordat er bij HLH sprake is van een zeer acute en zeer heftige inflammatoire respons is. Om de continue aanwas van activatie en de nieuw geproduceerde immuuncellen tegen te gaan, kan het soms nodig zijn om de dieren twee keer per dag te injecteren. Dit is het absolute maximum, maar wij verwachten de muizen minder vaak te moeten injecteren. Het precieze aantal injecties zal bepaald worden aan de hand van de farmacologische eigenschappen van het geneesmiddel en in overleg met de IvD.

**Intraveneuze (i.v.) toediening:** Het intraveneus toedienen van geneesmiddelen, liganden of cellen door middel van een injectienaald. Frequentie hangt af van de proef, maar is maximaal één keer per dag gedurende maximaal tien dagen. Eén keer per dag kan soms nodig zijn doordat er bij HLH sprake is van een zeer acute en zeer heftige inflammatoire respons is. Om de continue aanwas van activatie en de nieuw geproduceerde immuuncellen tegen te gaan, kan het soms nodig zijn om de dieren dagelijks te injecteren. Dit is het absolute maximum, maar wij verwachten de muizen minder vaak te moeten injecteren. Het precieze aantal injecties zal bepaald worden aan de hand van de farmacologische eigenschappen van het geneesmiddel en in overleg met de IvD. Als er vaker dan één keer per dag een i.v. injectie nodig is kan een canule aangelegd worden in de jugularis veine of een Alzet pompje geplaatst worden.

**Plaatsen canule:** Wanneer een interventie één of meerdere keren per dag i.v. geïnjecteerd moet worden kan besloten worden om een canule te plaatsen in de vena jugularis of een Alzet pompje om de belasting voor de muis lager te houden. Vervolgens kan via deze canule de interventie worden toegediend. Deze procedure vindt plaats voor de inductie van HLH.

**Bloedafname:** Bloedmonsters worden genomen voor biochemische analyses (o.a. lipiden, cytokines) en immunologische analyses (o.a. flow cytometrie) met een maximaal van <10% van het circulerend volume per

twee weken. De volgende richtlijn zal worden gevolgd: <https://www.nc3rs.org.uk/mouse-decision-tree-blood-sampling>

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

Het aantal muizen per proef is gebaseerd op statistische berekeningen, rekening houdend met mogelijk uitval van dieren, alsook gebaseerd op eigen ervaring of ervaring van naaste collega's. Hierin wordt rekening gehouden met de hoeveelheden cellen/weefsel die nodig zijn voor de beschreven analyses. Het aantal proeven is gebaseerd op ervaring van de onderzoeksgroep, rekening houdend met de grootte van de onderzoeksgroep en verwachte aantallen experimenten die we willen en kunnen uitvoeren. Voor het uitvoeren van de powerberekening wordt mede gebruik gemaakt van software voor groeps-grootteberekeningen (bijv. nQuery, PiFace en GPower).

Wij willen verschillen tussen immuuncel populaties, cytokines, en activatie markers kunnen aantonen van minimaal 10%, wij verwachten dat dit effect biologisch relevant is. Uit eigen ervaring blijkt dat bij flow cytometrie een inter-groepvariatie is van circa 5-10% (afhankelijk van de exact gekozen uitkomstparameter). Als we uitgaan van een  $\alpha=0.05$ , een power van 80,  $\mu_1=1$ ,  $\mu=0.9$ ,  $\sigma=0.05-0.1$  komen wij uit op een groeps-grootte tussen de 6-17 muizen, we rekenen verder met een gemiddelde van 10 muizen per groep. In de pilot studies zullen wij de proefopzet zodanig proberen te optimaliseren dat niet meer dan 30% van de muizen het humane eindpunt bereikt. Als de wetenschappelijke vragen op een eerder tijdstip beantwoord kunnen worden, zullen namelijk minder dieren het HEP (>20% gewichtsverlies) bereiken. Als uit pilots blijkt dat een later tijdstip nodig is, zullen meer dieren het HEP bereiken. Alle muizen die een HEP bereiken worden geanalyseerd om zo toch een beeld te krijgen van het ziekteverloop. Om er zeker van te zijn dat gemiddeld 10 muizen per groep het einde van het experiment halen, houden wij rekening met een uitval tot 50%. Per groep zullen wij dus maximaal 20 muizen gebruiken, maar in de pilot experimenten zullen wij de uitval van muizen proberen te verminderen waardoor we uiteindelijk kleinere groepen kunnen gebruiken.

## B. De dieren

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

Volgnr.	Diersoort	Herkomst	Levensstadium	Aantal	Geslacht	Genetisch gewijzigd	Stam
6l	Muizen	Eigen fok of commerciële fokkers	6-24 weken	1222	Man en Vrouw	Ja	C57BL/6

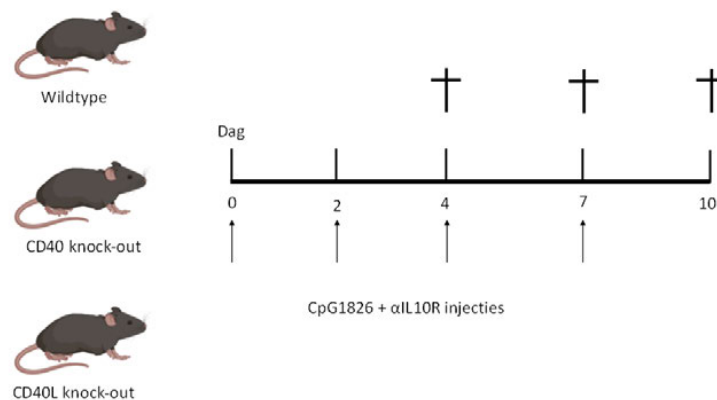
Onderbouw de bovengenoemde keuzes.

Diersoort	Muizen hebben de voorkeur binnen dit project omdat de groep zeer uitgebreide ervaring heeft met muizen en dit een goed en geaccepteerd model is voor hemofagocytair lymfocytair lymfocytose (Albeituni <i>et al.</i> , Blood, 2019). <b>Uit eerdere studies is gebleken dat het muismodel van HLH veel overlap vertoont met het ziektebeeld dat wordt gezien bij HLH patiënten. De voor HLH kenmerkende macrofaag geïnduceerde cytokine storm is vergelijkbaar in mens en muis en wordt gekenmerkt door onder andere een verhoogde productie van de cytokines IFN<math>\gamma</math>, TNF<math>\alpha</math>, en IL-6 (Albeituni <i>et al.</i>, Blood, 2019; Henderson &amp; Cron, Paediatr Drugs, 2020).</b>
Herkomst	Een deel van de muizen, bijvoorbeeld wildtype muizen, kan worden aangeschaft bij commerciële leveranciers. Muizen met specifieke genetische achtergrond zullen in veel gevallen uit eigen fok komen of via samenwerkingsverbanden worden verkregen.
Levensstadia	Afhankelijk van de vraagstelling worden dieren met een bepaalde leeftijd gebruikt. In de meeste gevallen starten de experimenten als de dieren een leeftijd van 6-24 weken hebben.

In de pilot experimenten gaan wij wildtype dieren vergelijken met transgene dieren (CD40 en CD40L knock-out). Per groep worden in de pilot experimenten 15 dieren gebruikt. Als controle nemen wij per genotype een groep mee die geen HLH krijgt, deze groep bestaat uit 10 dieren aangezien hier minder uitval wordt verwacht. Voor dit onderdeel van de pilot studie verwachten wij **75 muizen** te gebruiken (3 x 15 muizen/genotype (HLH) + 3 x 10 muizen/genotype (controle)).

Om de proefopzet te verfijnen door de duur van het experiment proberen te verkorten zullen wij de dieren op bijvoorbeeld drie verschillende tijdstippen na HLH inductie doden (zie figuur). In totaal verwachten wij hiervoor 45 dieren (15 x 3 tijdstippen) per genotype (wildtype/CD40 knock-out /CD40L knock-out) nodig te hebben, voor drie genotypen typen zijn dit **135 muizen**.

Wanneer HLH inductie vooraf wordt gegaan aan een beenmergtransplantatie of een T- of B-cel transfer zullen wij dit door middel van een pilot studie optimaliseren, voor twee pilot studies zijn hiervoor maximaal **72 muizen** nodig (wildtype + wel/geen BMT óf T/B transfer) en twaalf donordieren (4 x 15 dieren + 12). Voor de pilot experimenten zijn in totaal **maximaal 282 muizen** nodig.



Aantal

Na de pilot experimenten verwachten wij drie proeven per jaar te doen, waarbij gevarieerd kan worden met de targetgenen. In deze experimenten worden twee of meerdere genotypes of interventies (bijvoorbeeld wildtype, transgeen, siRNA, small molecules) met elkaar vergeleken en hiervoor zijn, rekening houdend met maximaal 50% die een HEP bereikt, twintig muizen per groep nodig, in totaal dus gemiddeld 180 muizen per jaar uitgaande van drie groepen die met elkaar vergeleken worden per experiment. Tijdens de pilot experimenten proberen wij de proefopzet zodanig te optimaliseren dat minder dan 50% een HEP eindpunt bereikt. Daarnaast zullen de muizen die een HEP eindpunt bereiken wel gebruikt worden in de analyse en zullen op deze manier wel bijdragen aan het beantwoorden van onze wetenschappelijke vragen. Over een periode van vijf jaar verwachten wij **maximaal 900 muizen**.

Daarnaast zijn er donordieren nodig voor de BMT en/of de T- of B cel transfers, waarbij wordt uitgegaan van het feit dat één donordier voldoende beenmerg of T- of B cellen oplevert voor ongeveer vijf acceptor dieren. Wij verwachten dat er bij één van de drie proeven per jaar een BMT of T- of B cel transfer zal plaatsvinden. Totaal zijn er maximaal 200 acceptor dieren, delen door 5 (één donor per vijf dieren) = **40 donor dieren** voor vijf jaar.

Totaal: **maximaal 1222 dieren** voor vijf jaar

Geslacht

Er is geen voorkeur voor mannelijke of vrouwelijke dieren bij dit ziektemodel.

Genetisch gewijzigd	Zowel wildtype als genetisch gewijzigde dieren worden gebruikt, waar mogelijk worden voor de controles wildtype nakomelingen gebruikt. Om de rol van een immuun checkpoint <i>in vivo</i> te onderzoeken zal het in veel gevallen nodig zijn om hiervoor genetisch gemodificeerde muizen te gebruiken, waarbij bijvoorbeeld een deletie is van de kandidaat immuun checkpoint. We verwachten niet dat er lijnen met constitutioneel ongerief ('fok met ongerief') gebruikt zullen worden. De huisvesting binnen de dierverblijven is zodanig dat immuungecompromiteerde dieren geen schade ondervinden van hun genotype. Momenteel is het een discussiepunt of deze lijnen toch onder een 'fok met ongerief'-vergunning gefokt moeten worden. Indien deze genetische lijnen toch onder een vergunning gefokt moeten worden, zal dit onder een generieke vergunning van het onderzoeksinstituut gefokt (gaan) worden.
Stam	Wij gebruiken C57BL/6 muizen, waarvan bekend is dat ze geschikt zijn voor inductie van HLH (Albeituni <i>et al.</i> , Blood, 2019). Ook heeft onze onderzoeksgroep al zeer veel ervaring met deze stam.

### C. Huisvesting en verzorging

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

Ja

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

Dieren die gecannuleerd worden, moeten alleen gehuisvest worden om te voorkomen dat de cannules doorgebeten worden door kooigenoten.

### D. Pijn en welzijnsaantasting

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

Nee >

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

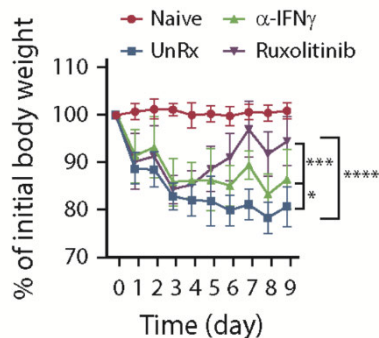
Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

Operaties voor het plaatsen van een canule in de vena jugularis of het plaatsen van een Alzet pompje zal onder volledige anesthesie worden uitgevoerd. De fysiologische status van de muizen wordt tijdens de gehele procedure goed gemonitord en wanneer nodig wordt de dosis anesthesie omhoog of omlaag aangepast.

Verdere pijnstilling tijdens HLH wordt niet gebruikt aangezien dit onverenigbaar is met de proefopzet. De meeste pijnstilling werkt ontstekingsremmend en zal dus ook de HLH-geassocieerde ontsteking remmen. We kiezen ervoor om geen opiaten als pijnstilling te geven, omdat wij de bijwerkingen van het gebruik van opiaten (obstipatie, misselijkheid en sufheid) niet vinden opwegen tegen de pijn die de dieren ervaren vanwege de HLH.

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

1. BMT: verminderde eetlust en gewichtsverlies
2. De dieren kunnen stress ondervinden, irritatie, en pijn ten gevolge van het injecteren van de interventies.
3. HLH specifiek ongerief: ernstig gewichtsverlies, algehele malaise, en anemie. Een gewichtsverlies van 20% is onderdeel van het ziektebeloop tijdens HLH en de dieren zullen het gehele experiment ondergewicht houden (HEP is maximaal 20% gewichtsverlies ten opzichte van het gewicht aan de start van het experiment). De eerste dagen na inductie van HLH vertonen de muizen het meeste gewichtsverlies, dit stabiliseert daarna rond de 80% van het startgewicht van de muis. (Albeituni *et al.*, Blood, 2019, figuur 1B (zie hieronder)).



Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

1. Na de BMT is er tijdelijke uitputting van het beenmerg en milde stralingsschade waardoor dieren darmschade krijgen.
2. Toediening (s.c., i.p. of i.v) van interventie die immuun checkpoint regulatoren moduleren. De dieren worden hierbij regelmatig geïnjecteerd.
3. De cytokine storm en acute immuun activatie induceert direct gewichtsverlies. De muizen hebben verminderde voedselinname door algehele malaise en een verhoging van het energieverbruik ten gevolge van acute inflammatoire conditie, samen draagt dit bij aan ernstig gewichtsverlies.

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

1. Gedurende maximaal drie weken na BMT worden de dieren gevoerd met hoogenergetisch natgemaakt voer.
2. Maximale volumina worden bepaald op basis van beschikbare literatuur (Diehl *et al.*, 2001). De dieren worden goed gemonitord.
3. De dieren worden goed gemonitord en de humane eindpunten worden toegepast zodra er meer gewichtsverlies is dan vooraf verwacht had kunnen worden. De dieren worden tijdens HLH gevoerd met hoogenergetisch voer om het gewichtsverlies te beperken.

## E. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag F.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.



In het algemeen geldt: Bij het bereiken van humane eindpunten (d.w.z. verminderd exploratief gedrag in combinatie met tekenen van algemeen onwelzijn – openstaande vacht, abnormale houding, of bij dieren zonder HLH een gewichtsverlies >15% t.o.v. hoogst gemeten of >10% t.o.v. vorige weegpunt over een periode van twee tot drie dagen zal overgegaan worden tot het doden van dat specifieke dier.

Verder zijn er nog specifieke humane eindpunten:

**A. Beenmergtransplantatie:** Verminderde activiteit, onverzorgde vacht, houding of enige andere afwijking zoals beschreven in de SOP van de faciliteit evenals gewichtsverlies >15% ten opzichte van het hoogst gemeten of >10% ten opzichte van het vorige weegpunt over een periode van twee dagen.

**B. Ziekte score voor het HLH model:**

Om vast te stellen of muizen ongerief ondervinden observeren we het gedrag en het gewicht van de muis. Deze observaties resulteren in een ziekte score die de basis zijn voor de humane eindpunten.

0: gezonde muis

1: Onverzorgde vacht en verminderde activiteit, minder dan 10% gewichtsverlies

2: Recht opstaande haren (pilo-erectie), minder actief gedrag, gebogen houding, 10-20% gewichtsverlies.

3 (HEP): Pilo-erectie, sterk verminderd actief gedrag, gebogen houding, en meer dan 20% gewichtsverlies.

Muizen zullen tijdens het experiment ernstig gewichtsverlies doormaken en zeer ziek zijn, dit is een beschreven beeld in het ziekteverloop van HLH. Het gewichtsverlies kan oplopen tot 20% ten opzichte van het startgewicht van de muis en is een goede surrogaat parameter voor andere uitingen van HLH zoals anemie, hypotensie en hepatosplenomegalie. Muizen met méér dan 20% gewichtsverlies ten opzichte van het startgewicht, ziektescore 3, zullen uit de studie gehaald worden, omdat dit als humaan eindpunt is gedefinieerd. Dieren die zo ernstig ziek zijn dat verwacht kan worden dat ze snel (de komende 12 uur) kunnen overlijden maar nog niet meer dan 20% zijn afgevallen, zullen ook gedood worden. Hierdoor kunnen deze dieren ook nog gebruikt worden voor wetenschappelijke analyses.

---

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

A: 2%

B: 50% (In de pilot experimenten proberen wij het diermodel te verfijnen waardoor dit percentage lager zal uitvallen. Daarnaast is het bereiken van een HEP ook een wetenschappelijk eindpunt, deze dieren worden wel in de analyse worden gebruikt en moeten dus niet als 'uitval' gezien worden).

---

**F. Classificatie van ongerief**

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

---

Procedure	Stam	Geslacht	Aantal dieren	Cumulatief ongerief	Handelingen die leiden tot ongerief
Pilot (HLH)	WT/TG	M/V	240	Ernstig	Oorknip (licht), BMT (matig), T- of B cel transfer (matig), inductie HLH (ernstig), bloedafname (licht), doden (licht)
Pilot (Placebo)	WT/TG	M/V	30	Licht	Oorknip (licht), injecties placebo (licht), bloedafname (licht), doden (licht)
Experimenten	WT/TG	M/V	900	Ernstig	Oorknip (licht), BMT (matig), T- of B cel transfer (matig), operatie voor zetten van canulatie/Alzet pompje (matig), inductie HLH (ernstig), interventie injecties (i.p., i.v., s.c.) (matig), bloedafname (licht), doden (licht)
Beenmerg donoren	TG	M/V	52	Licht	Doden (licht)
<b>Totaal</b>			1222	Licht: 82 Matig: 0 Ernstig: 1140	

### G. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging	HLH is een complexe immuun ziekte waarbij het met name mis gaat bij de 'communicatie' tussen de verschillende cellen in het immuunsysteem en de aangedane weefsels. Diermodellen zijn nodig om zowel de interactie tussen de immuuncellen te kunnen bestuderen, alsmede het effect hiervan op de door HLH aangedane weefsels. Parallel aan de studies met muismateriaal worden ook studies met humane cellen gedaan om in een vroeg stadium een relatie van bevindingen in de humane situatie te kunnen leggen. In patiënten materiaal zoals bloed kunnen wij ontstekingswaarden (o.a. cytokine productie, en immuuncel activatie) bepalen, om te onderzoeken of deze overeen komen met ons muismodel.
------------	--

<p>Vermindering</p>	<p>Ons onderzoekslab heeft al zeer veel ervaring met immuun checkpoints, waardoor al veel kennis beschikbaar is over de functie van immuun checkpoints, zoals CD40, in homeostase en in immuun ziekten zoals multiple sclerose, obesitas, en slagaderverkalking (Chatzigeorgiou <i>et al.</i>, 2014; Lameijer <i>et al.</i>, 2018; Kusters <i>et al.</i>, 2018; Aarts <i>et al.</i>, 2019; Reiche <i>et al.</i>, 2019). Hierdoor weten wij dat CD40 belangrijk is in de door HLH aangedane cel processen, wat de kans van slagen van dit project groot maakt. Er zijn al zeer goede <i>in vitro</i> karakterisaties gedaan in cel modellen (cellijnen, primaire muiscellen en humane cellen), waardoor wij in dit project geen extra muizen hoeven te gebruiken voor <i>in vitro</i> experimenten om de rol van CD40, en de daarbij betrokken mediators en signaleringsmoleculen, te onderzoeken. Hierdoor kunnen wij in dit project keuzes maken voor specifieke aanpakken gebaseerd op <i>in vitro</i> studies, en dit leidt tot specifiekere proeven en minder diergebruik.</p> <p>Er wordt ook deels gewerkt met beenmergtransplantatie studies waarbij door het transplanteren van beenmerg uit één enkele muis het immuunsysteem van vijf muizen wordt gerepopuleerd. Dit leidt tot een sterke vermindering van het aantal dieren vergeleken met het aantal dieren dat nodig zou zijn wanneer de juiste genotype verkregen zouden moeten worden door middel van kruisingen.</p> <p>Power berekeningen worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken. Bevindingen uit de literatuur (Albeituni <i>et al.</i>, Blood, 2019) worden meegenomen bij de power berekeningen. We hebben nu op basis van bekende gegevens een poweranalyse gedaan. Voor ieder experiment zal een nieuwe poweranalyse gedaan worden zodat het experiment met het minimum aantal dieren uitgevoerd wordt waarmee nog een betrouwbaar resultaat verkregen kan worden. Door de voorafgaande pilots om het model te optimaliseren, hopen we ook het aantal dieren dat gebruikt gaat worden in de experimenten te verminderen.</p>
<p>Verfijning</p>	<p>Aan de hand van meerdere pilot experimenten proberen wij de proefopzet te verfijnen. Dit doen wij onder andere door de muizen op verschillende tijdstippen te doden na HLH inductie, en op deze manier te kijken of wij op een eerder tijdstip al het effect van een interventie op het HLH ziekteproces kunnen zien. Daarnaast is het bereiken van een HEP óók een wetenschappelijk eindpunt. De dieren die het einde van het experiment niet halen vanwege het bereiken van een HEP zullen gebruikt worden voor post-mortem analyses. Hierdoor worden deze muizen toch gebruikt om meer inzicht te verkrijgen in de pathogenese van deze aandoening.</p> <p>Waar mogelijk zal het aantal handelingen van de muis, met name de injecties, zo laag mogelijk worden gehouden. Er wordt de voorkeur gegeven aan geneesmiddelen die met een minimale frequentie worden gegeven, maar vanwege de farmacologische eigenschappen, bijvoorbeeld een hoge halfwaardetijd of slechte oplosbaarheid, van een geneesmiddel zal er soms vaker geïnjecteerd moeten worden. Wij zullen de dieren niet over een langere periode injecteren dan strikt noodzakelijk. Wanneer wij de dieren meer dan één keer per dag intraveneus moeten injecteren zullen wij een canuleren of een Alzet pomp gebruiken, om het ongerief lager te houden. Hierbij heeft het plaatsen van een Alzet pomp de voorkeur, aangezien deze dieren niet individueel gehuisvest hoeven te worden.</p> <p>Een deel van de muizen zal een genetische modificatie hebben of een interventie krijgen, waardoor het ziektebeeld minder ernstig wordt. Hierdoor zal het uiteindelijke ongerief bij deze muizen ondanks de inductie van HLH lager zijn.</p> <p>Mannelijke muizen worden om vechten te voorkomen in groepjes van drie tot vier muizen gehuisvest en krijgen twee huisjes. Ook zullen de transplantatie dieren indien nodig met hoogenergetisch voer gevoed worden.</p>
<p>Zijn er nadelige milieueffecten te verwachten?</p>	

Nee

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

#### H. Hergebruik

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

Nee, ga verder met vraag I.

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

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

Nee

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

#### I. Herhaling

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

Niet van toepassing

#### J. Plaats waar de dierproef wordt uitgevoerd

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

Nee > Ga verder met vraag K.

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

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

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

Worden de dieren gedood?

Nee > Beschrijf de bestemming van de dieren.

Ja > Geef aan waarom de dieren worden gedood.

Er dienen cellen en/of organen uitgenomen te worden ten einde verder wetenschappelijke analyses. Indien dieren worden gedood, wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van Richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.

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

Nee > Beschrijf de dodingsmethode

Overdosis anesthesie of kooldioxide, gevolgd door cervicale discolatie of hartpunctie.

Ja > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.

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

Naam van het project	Op zoek naar een behandeling voor de acute immuunziekte hemofagocyttaire lymfohistiocytose
NTS-identificatiecode	NTS-NL-224408 v.1
Nationale identificatiecode van de NTS <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Land	Nederland
Taal	nl
Indiening bij EU <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	ja
Duur van het project, uitgedrukt in maanden.	60
Trefwoorden	Secundaire hemofagocyttaire lymfohistiocytose Immuunziekte Immuun checkpoint Macrofagen
Doel(en) van het project	Fundamenteel onderzoek: Immuunstelsel Omzettinggericht en toegepast onderzoek: Verstoringen van het immuunstelsel bij de mens

#### DOELSTELLINGEN EN VERWACHTE VOORDELEN VAN HET PROJECT

<p>Beschrijf de doelstellingen van het project (bijvoorbeeld het aanpakken van bepaalde wetenschappelijke onduidelijkheden, of wetenschappelijke of klinische behoeften).</p>	<p>Secundaire hemofagocyttaire lymfohistiocytose (HLH) is een zeldzame en levensbedreigende aandoening die zowel kinderen als volwassenen treft. Helaas werken de huidige behandelingen niet goed genoeg en komen veel patiënten te overlijden in de eerste dagen van HLH. In dit project wordt fundamenteel en translationeel onderzoek gecombineerd om een nieuwe behandelstrategie voor patiënten met HLH te ontwikkelen.</p> <p>De macrofaag, een specifiek type afweercel, heeft een centrale rol in het ontstaan van HLH. Tijdens secundaire HLH is er sprake van overactieve macrofagen, veroorzaakt door bijvoorbeeld een infectie, auto-immuunziekte of kanker (primaire HLH wordt veroorzaakt door een erfelijke oorzaak). Lichaamseigen bloedcellen worden 'opgegeten' en andere afweercellen worden juist overmatig geactiveerd. Daarnaast worden er teveel schadelijke ontstekingsstoffen geproduceerd. Uiteindelijk ontstaat er een vicieuze cirkel die zich kenmerkt door een levensbedreigende en ongecontroleerde ontstekingsreactie. Patiënten worden hierdoor ernstig ziek en komen vaak te overlijden doordat meerdere organen niet meer functioneren. Het afremmen van de overactieve macrofagen is dan ook een veelbelovende behandelstrategie voor HLH.</p> <p>De activiteit van macrofagen wordt onder normale omstandigheden strikt gereguleerd door eiwitten op het oppervlak van de cel om te veel activiteit te voorkomen. Eén van de belangrijkste eiwitten op de macrofaag is CD40. Dit stimulerende eiwit zorgt ervoor dat de macrofagen meer ontstekingsstoffen produceren en op hun beurt weer andere afweercellen activeren. Eerder onderzoek van onze onderzoeksgroep heeft aangetoond dat het remmen van CD40 in macrofagen een effectieve manier is om activatie van de macrofaag te voorkomen. Op basis van deze bevindingen hebben wij een nieuwe remmer van CD40 in macrofagen ontwikkeld. Dit mogelijke medicijn, genaamd trafinib, voorkomt overactiviteit van macrofagen en vermindert de productie van ontstekingsstoffen. Trafinib heeft een gunstig effect op verschillende experimentele ontstekingsziekten, zoals aderverkalking, multiple sclerose (MS) en ernstige bloedvergiftiging (sepsis). Omdat trafinib een veelbelovende en krachtige remmer van macrofaag activiteit is willen wij in dit project onderzoeken of dit medicijn ook gebruikt kan worden in de behandeling van HLH.</p>
<p>Welke potentiële voordelen kan dit project opleveren? Leg uit hoe de wetenschap vooruit kan</p>	<p>Per jaar krijgen er in Nederland ongeveer 50-100 mensen HLH, waarbij 8-54% komt te overlijden binnen een paar dagen door een gebrek aan een goede behandeling. Daarnaast zijn patiënten in de eerste dagen van HLH vaak te ziek om optimale behandeling van de onderliggende ziekte, vaak</p>

worden geholpen of mensen, dieren of het milieu uiteindelijk voordeel kunnen hebben bij het project. Maak, waar van toepassing, een onderscheid tussen voordelen op korte termijn (binnen de looptijd van het project) en voordelen op lange termijn (die mogelijk pas worden bereikt nadat het project is afgerond).

kanker of een infectie, te krijgen. Aanvullende behandelingen van HLH zijn dringend nodig om de prognose van patiënten met deze zeldzame aandoening te verbeteren. Op de korte termijn willen wij meer inzicht verkrijgen in het effect van het remmen van CD40 op het ziekteverloop van HLH in muizen. Hierbij kijken wij ook wat het effect is van CD40 remming op de (immuun)cel processen die betrokken zijn bij HLH. Op de langere termijn kan deze kennis bijdragen aan de ontwikkeling van een nieuwe behandeling bij HLH, gericht op CD40 remming. Wanneer blijkt dat de CD40-remmer trafinib een mogelijke behandelstrategie is voor HLH in muizen, kan de stap worden gemaakt om trafinib in een klinische studie bij HLH patiënten te onderzoeken.

**VOORSPELDE SCHADE**

<p>In welke procedures worden de dieren gewoonlijk gebruikt (bijvoorbeeld injecties, chirurgische procedures)? Vermeld het aantal en de duur van deze procedures.</p>	<p>Om de muizen als ziektemodel te kunnen gebruiken moeten wij de immuunziekte opwekken, dit gebeurt met meerdere injecties. Verder kunnen de muizen geïnjecteerd worden met bijvoorbeeld een medicijn en er zal ook bloed afgenomen worden. Soms is het nodig om muizen te bestralen zodat ze een beenmergtransplantatie kunnen krijgen, op deze manier kunnen wij de muizen een "nieuw" immuunsysteem geven. Aan het einde van het experiment zullen de muizen gedood worden.</p>																
<p>Wat zijn de verwachte gevolgen/nadelige effecten voor de dieren, bijvoorbeeld pijn, gewichtsverlies, inactiviteit/verminderde mobiliteit, stress, abnormaal gedrag, en wat is de duur van die effecten?</p>	<p>Een gevolg van HLH is dat de muizen zich erg ziek voelen, veel gewicht verliezen, en bloedarmoede ontwikkelen. Ernstig gewichtsverlies is onderdeel van de ziekte en is een gevolg van een verhoogd energie verbruik om de ziekte te bestrijden en de dieren voelen zich ziek waardoor ze minder eten. Daarnaast zullen de dieren stress ondervinden doordat ze meerdere malen geïnjecteerd moeten worden en er ook bloedafnames plaatsvinden. Aan de hand van pilot studies zullen wij proberen de duur van het experiment, en daarmee het ongerief, zo kort mogelijk te laten duren. Het maximum aantal dagen dat de dieren de ziekte doormaken is tien. Er kan een canule geplaatst worden bij de muizen om stress van veelvuldig injecteren te verminderen. Deze dieren worden vervolgens individueel gehuisvest om te voorkomen dat andere muizen aan de canule kunnen zitten.</p>																
<p>Welke soorten en aantallen dieren zullen naar verwachting worden gebruikt? Wat zijn de verwachte ernstgraden en de aantallen dieren in elke ernstcategorie (per soort)?</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Soort:</th> <th rowspan="2">Totaal aantal</th> <th colspan="4">Geraamde aantallen naar ernstgraad</th> </tr> <tr> <th>Terminaal</th> <th>Licht</th> <th>Matig</th> <th>Ernstig</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Muizen (<i>Mus musculus</i>)</td> <td>1222</td> <td>0</td> <td>82</td> <td>0</td> <td>1140</td> </tr> </tbody> </table>	Soort:	Totaal aantal	Geraamde aantallen naar ernstgraad				Terminaal	Licht	Matig	Ernstig	Muizen ( <i>Mus musculus</i> )	1222	0	82	0	1140
Soort:	Totaal aantal			Geraamde aantallen naar ernstgraad													
		Terminaal	Licht	Matig	Ernstig												
Muizen ( <i>Mus musculus</i> )	1222	0	82	0	1140												
<p>Wat gebeurt er met de dieren die aan het einde van de procedure in leven worden gehouden?</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Soort:</th> <th colspan="3">Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren</th> </tr> <tr> <th>Hergebruikt</th> <th>Teruggeplaatst</th> <th>Geadopteerd</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Soort:	Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren			Hergebruikt	Teruggeplaatst	Geadopteerd									
Soort:	Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren																
	Hergebruikt	Teruggeplaatst	Geadopteerd														
<p>Geef de redenen voor het geplande lot van de dieren na de procedure.</p>	<p>Aan het eind van het experiment worden de dieren gedood, om weefsel voor verdere wetenschappelijke analyse te kunnen verkrijgen.</p>																



## TOEPASSING VAN DE DRIE V'S

### 1. Vervanging

Beschrijf welke diervrije alternatieven op dit gebied voorhanden zijn en waarom zij niet voor het project kunnen worden gebruikt.

HLH is een ingewikkelde immuun ziekte waarbij het met name mis gaat bij de 'communicatie' tussen de verschillende cellen in het immuunsysteem. Een diermodel is nodig om zowel de communicatie tussen de immuuncellen te kunnen bestuderen, alsmede het effect hiervan op de organen en weefsels die door HLH worden aangetast.

Tegelijkertijd met deze muizenstudie gaan wij ook studies met humane cellen uitvoeren. Hierdoor kunnen wij in een vroeg stadium al zien of de resultaten die wij krijgen uit de muizenstudie overeen komen met de situatie bij HLH patiënten. In patiëntmateriaal zoals bloed kunnen wij ook ontstekingswaarden (o.a. ontsteking stoffen, en immuuncel activatie) bepalen, zodat deze informatie verder onderzocht kan worden in het muismodel.

### 2. Vermindering

Leg uit hoe de aantallen dieren voor dit project zijn bepaald. Beschrijf de stappen die zijn genomen om het aantal te gebruiken dieren te verminderen en de beginselen die zijn gebruikt bij het opzetten van de studies. Beschrijf, waar van toepassing, de praktijken die gedurende het hele project zullen worden toegepast om het aantal dieren die in overeenstemming met de wetenschappelijke doelstellingen werden gebruikt, tot een minimum te beperken. Deze praktijken kunnen bijvoorbeeld bestaan uit proefprojecten, computermodellen, het delen van weefsel en hergebruik.

Ons onderzoekslab heeft al zeer veel ervaring met CD40, waardoor al veel kennis beschikbaar is over de effecten van CD40 op verschillende celtypen. Hierdoor weten wij dat CD40 een belangrijke rol speelt in macrofaag activatie, de immuuncel die een centrale rol speelt in HLH. Deze eerder opgedane kennis over het effect van CD40 op macrofagen, maar ook op andere celtypen, kunnen wij inzetten in dit project waardoor wij minder dieren nodig hebben.

Door pilot studies uit te voeren om de proefopzet zo veel mogelijk te optimaliseren, hopen wij dat het aantal dieren dat nodig is voor de experimenten te verminderen. Daarnaast streven wij ernaar om zoveel mogelijk metingen te doen in één proefdier. We berekenen met statistische methoden hoeveel muizen er nodig zijn om een betrouwbaar antwoord te krijgen zodat er niet teveel dieren worden gebruikt.

Door gebruik te maken van een beenmergtransplantatie voorkomen we dat er eerst veel muizen met elkaar gefokt moeten worden om een ander immuunsysteem te krijgen.

### 3. Verfijning

Geef voorbeelden van de specifieke maatregelen (bv. verscherpte monitoring, postoperatieve behandeling, pijnbestrijding, training van dieren) die in verband met de procedures moeten worden genomen om de welzijnskosten (schade) voor de dieren tot een minimum te beperken. Beschrijf de mechanismen om gedurende de looptijd van het project nieuwe verfijningstechnieken in gebruik te nemen.

Aan de hand van meerdere pilot experimenten proberen wij de proefopzet te verfijnen. Dit doen wij onder andere door te onderzoeken of wij op een eerder tijdstip al het effect van een behandeling op het HLH ziekteproces kunnen zien. Hierdoor zullen de muizen minder lang ernstig ziek zijn. De dieren die het einde van het experiment niet halen vanwege het bereiken van een humaan eindpunt, zoals te hoog gewichtsverlies en sterk verminderd actief gedrag, zullen wél gebruikt worden om meer inzicht te verkrijgen in het ontstaan van HLH.

Waar mogelijk zal het aantal handelingen van de muis, met name de injecties, zo laag mogelijk worden gehouden. Er wordt de voorkeur gegeven aan geneesmiddelen die minder vaak gegeven hoeven te worden, maar vanwege bepaalde eigenschappen van een medicijn, zoals een snelle afbraak of slechte oplosbaarheid, zal er soms vaker geïnjecteerd moeten worden. Wij zullen de dieren niet over een langere periode injecteren dan strikt noodzakelijk. Wanneer wij de dieren meer dan één keer per dag in een bloedvat moeten injecteren zullen wij een buisje plaatsen op het bloedvat of een pompje gebruiken, zodat de dieren minder last ondervinden van de injecties. Hierbij heeft het plaatsen van een pomp de voorkeur, omdat dieren dan niet alleen geplaatst hoeven te worden.

Een deel van de muizen zal een genetische aanpassing hebben of een behandeling krijgen, waardoor het ziektebeeld minder ernstig wordt. Hierdoor zal het uiteindelijke ongerief bij deze muizen ondanks dat ze HLH hebben, lager zijn.

Mannelijke muizen worden om vechten te voorkomen in groepjes van drie tot vier muizen gehuisvest en krijgen twee huisjes. Ook zullen de beenmergtransplantatie dieren en de dieren die

HLH hebben indien nodig nat gemaakt energierijk voer krijgen, zodat ze op een makkelijkere manier voldoende voedsel binnenkrijgen.

Licht de keuze van de soorten en de bijbehorende levensstadia toe

Muizen hebben de voorkeur binnen dit project omdat onze onderzoeksgroep zeer uitgebreide ervaring heeft met muizen en dit een goed en geaccepteerd model is voor HLH. Wij werken met volwassen muizen vanaf een leeftijd van zes weken, het experiment wordt ingezet wanneer de muizen tussen de zes en 24 weken oud zijn. Uit eerdere studies is gebleken dat het muismodel van HLH veel overlap vertoont met het ziektebeeld dat wordt gezien bij HLH patiënten. De voor HLH kenmerkende overactieve macrofaag produceert vergelijkbare ontstekingsstoffen in mensen en muizen.

**VOOR EEN BEOORDELING ACHTERAF GESELECTEERD PROJECT**

Project geselecteerd voor BA?	ja
Termijn voor BA	28-02-2027
<b>Reden voor de beoordeling achteraf</b>	
Bevat ernstige procedures	ja
Maakt gebruik van niet-menselijke primaten	
Andere reden	
Toelichting van de andere reden voor de beoordeling achteraf	

**AANVULLENDE VELDEN**

Nationaal veld 1 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 2 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 3 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 4 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 5 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Startdatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Einddatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Goedkeuringsdatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 1 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 2 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 3 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Link naar de eerdere versie van de NTS buiten het EC-systeem	



# Advies aan CCD

Datum 29 juli 2022  
Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD202215811

Instelling: 5.1 lid2h  
Onderzoeker: 5.1 lid2e  
Project: De rol van het immuun checkpoint eiwit CD40 in hemofagocyttaire lymfohistiocytose  
Aanvraagnummer: AVD202215811  
Betreft: Nieuwe aanvraag  
Categorieën: Fundamenteel onderzoek  
Translationeel of toegepast onderzoek

## 1 Inzicht in aanvraag en de eventuele knelpunten en risico's

<b>Proces</b>	De volgende vragen zijn gesteld aan de aanvrager.  Vragen over de NTS: Een deel van de dieren zal individueel gehuisvest kunnen worden. Kunt u dit in uw NTS omschrijven onder 'Expected impacts/adverse effects on the animals'?  Kunt u onder 'Explain the choice of species and the related life stages' en in de bijlage dierproeven onder 'B. De dieren - Diersoort' de translationele waarde van het gekozen diermodel beschrijven?  Kunt u onder 'Refinement' in uw NTS de term 'humaan eindpunt' verduidelijken voor het algemene publiek?  Kunt u in uw NTS onder 'Explain the choice of species and the related life stages' en in de bijlage dierproeven onder 'B. De dieren - Diersoort' de translationele waarde van het diermodel specifiek beschrijven?			
<b>Naam proef</b>	<b>Diersoort</b>	<b>Stam</b>	<b>Aantal dieren</b>	<b>Herkomst</b>
<b>3.4.3.1 Muizenmodel voor Hemofagocyttaire Lymfohistiocytose</b>				
	Muizen (Mus musculus)	WT & GGO	1.222	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn

## Huisvesting en verzorging anders dan Bijlage III Richtlijn

### 3.4.3.1 Muizenmodel voor Hemofagocyttaire Lymfohistiocytose

Citaat:

Dieren die gecannuleerd worden, moeten alleen gehuisvest worden om te voorkomen dat de cannules doorgebeten worden door kooigenoten.

## Onverdoofd gebruik terwijl verdoving wel gewenst

### 3.4.3.1 Muizenmodel voor Hemofagocyttaire Lymfohistiocytose

Citaat D:

[...]

Verdere pijnstilling tijdens HLH wordt niet gebruikt aangezien dit onverenigbaar is met de proefopzet. De meeste pijnstilling werkt ontstekingsremmend en zal dus ook de HLH-geassocieerde ontsteking remmen. We kiezen ervoor om geen opiaten als pijnstilling te geven, omdat wij de bijwerkingen van het gebruik van opiaten (obstipatie, misselijkheid en sufheid) niet vinden opwegen tegen de pijn die de dieren ervaren vanwege de HLH.

## Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

### 3.4.3.1 Muizenmodel voor Hemofagocyttaire Lymfohistiocytose

Muizen (*Mus musculus*) Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

<b>Locatie uitvoering experimenten</b>	- Alle proeven vinden plaats in een instelling van een vergunninghouder. - Er zijn geen problemen bekend met de vergunninghouder.
--	--

## 2 DEC advies

<b>DEC-advies</b>	Citaat C4: [...] De DEC heeft veel aanvullende vragen gesteld om een beter beeld te krijgen van deze relatie. Er waren twijfels over de transleerbaarheid van het model maar ook over de haalbaarheid van het uiteindelijke doel. Is het überhaupt wel mogelijk om zo'n ontspoorde immuunrespons nog bij te sturen. De aanvrager heeft dit verhelderd door aan te geven wat de overeenkomsten zijn tussen het beeld in de patiënt en het model. De DEC beoordeelde het model daarom geschikt voor deze (mechanistische) proeven. De aanvrager heeft daarnaast aangegeven dat trafinib in een ander acuut ontstekingsmodel (sepsis) in staat was om de ontstekingsreactie te remmen. Dit ondersteunt de hypothese dat een ontspoorde immuunrespons nog bij te sturen valt. 'Nieuw' aangetrokken immuuncellen kunnen een niet-inflammatoir fenotype houden waardoor uiteindelijk de ontspoorde immuunrespons bijgestuurd kan worden. Uiteindelijk blijft er (natuurlijk) onzekerheid of de hypothesen bevestigd
-------------------	---

zullen worden maar dit is inherent aan onderzoek doen naar een behandeling van een complexe immuunrespons. De DEC was niet unaniem in de beoordeling van deze relatie. Eén DEC lid was van mening dat er teveel onzekerheid was dat dit onderzoek een geneesmiddel kan opleveren, de overige DEC-leden waardeerden de bijdrage van dit onderzoek aan de ontwikkeling van een behandeling veel hoger (Zie verder de ethische afweging).

[...]

Citaat C10:

Er wordt afgeweken van bijlage III als dieren een canule aangelegd krijgen om continu medicijnen toe te kunnen dienen. De dieren worden dan individueel gehuisvest om te voorkomen dat kooigenoten de canule doorknagen. De DEC vindt dat de individuele huisvesting om deze reden voldoende onderbouwd is. Echter omdat de dieren ook erg ziek worden, merkt de DEC op dat, indien mogelijk, het plaatsen van een Alzet pompje onderzocht zou moeten worden, zodat de dieren nog steeds sociaal gehuisvest kunnen worden. Juist bij dieren die zo ernstig ziek worden, kan het individueel huisvesten zorgen voor extra ongerief.

Citaat C11:

Ongeriefinschatting is in overleg met de IvD tot stand gekomen, met gebruikmaking van de Toelichting Codering Ongerief. De dieren worden door de ontsparing van het immuunsysteem ziek. De muizen zullen veel energie gebruiken terwijl ze ook weinig eetlust hebben. De muizen zullen hierdoor snel afvallen. De DEC is van mening dat de dieren ernstig ongerief zullen ondergaan omdat ze zich een aantal dagen (erg) ziek kunnen voelen. De aanvrager geeft aan in een pilot te onderzoeken of eerdere tijdstippen bruikbaar zijn om de vragen te beantwoorden. Dit kan de duur van het ernstige ongerief verkorten. De DEC is van mening dat het induceren van deze cytokinestorm ingeschat moet worden als ernstig, ook als de proef uiteindelijk 'maar' 5 dagen i.p.v. 10 dagen zou duren. De beenmergdonoren worden zonder voorafgaande handelingen gedood. Het ongerief van deze dieren is ingeschat als 'licht' volgens de richtlijn van de NVWA.

Citaat C13:

[...]

De DEC heeft ook gediscussieerd over de relatie van deze HEP met het uitvalspercentage. De aanvragers geven aan dat 50% van de muizen het HEP kan bereiken. Al zullen ze proberen om dit terug te brengen tot 30% in de pilots. Bovendien zijn de muizen die een HEP bereiken nog steeds heel waardevol voor het onderzoek, en zouden niet als 'uitval' beschouwd moeten worden. Deze dieren worden ook geanalyseerd. In deze gevallen

overlappen de wetenschappelijke eindpunten met de HEPs. Desondanks zou de 'uitval' sterk beperkt kunnen worden als het HEP als 25% gewichtsverlies gedefinieerd zou worden. In de grafiek is te zien dat het gemiddelde gewichtsverlies rond de 20% is. De DEC schat in dat het ongerief wel (sterk) beperkt wordt door dieren die meer dan 20% gewicht verliezen uit de proef te halen. Deze dieren stabiliseren niet en lopen meer risico om te sterven tijdens de proef. De aanvrager voorkomt dit door dit HEP te kiezen. De DEC vindt dit gekozen HEP daarom passend. De DEC geeft de voorkeur aan het zoveel mogelijk beperken van het ernstige ongerief voor de individuele muis, ook al heeft dit als consequentie dat er meer dieren gebruikt moeten worden en zodoende ook meer dieren ernstig ongerief zullen ondergaan.

Citaat C16:

Dit model zal ernstig ongerief veroorzaken in de muizen. Gezien de vraagstelling valt dit niet te voorkomen. Binnen dit kader vindt de DEC 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 onderzoekers verschillende pilots zullen uitvoeren om te bepalen of de onderzoeksvragen ook op een eerder tijdstip in het model beantwoord kunnen worden en om te onderzoeken of het bereiken van ziektescore 3 beperkt kan worden;
- 2) de onderzoeksstrategie er op gericht is om eerst op een grove manier te bepalen of CD40 wel betrokken is bij de pathogenese van HLH, met CD40KO muizen, voordat er vervolgonderzoeken gestart worden;
- 3) er een HEP gedefinieerd is op ziekte verschijnselen én niet meer dan 20% gewichtsverlies, zo wordt het ernstige ongerief zoveel mogelijk beperkt;
- 4) er wordt geen pijnstilling gebruikt maar de DEC verwacht dat het meeste ongerief veroorzaakt wordt door het zich ziek voelen en niet zozeer door pijn;
- 5) de dieren hoogenenergetisch voer krijgen.

Ethische afweging van de DEC:

Citaat D:

1.

Rechtvaardigt het beantwoorden van de onderzoeksvraag "Inzicht krijgen in de werking van het immuun checkpoint eiwit CD40, alsook de mediators en signaleringsmoleculen die betrokken zijn bij de CD40 signaleringscascade, in een HLH muismodel en hoe deze het ziekteverloop beïnvloeden", het gebruik van 1222 muizen die licht (6%:82/1222) tot ernstig (94%: 1140/1222) ongerief kunnen ervaren door dit onderzoek?

2.

De belangrijkste belanghebbenden op korte termijn in dit fundamentele en translationele project zijn de proefdieren en de onderzoekers (zie ook het antwoord bij vraag C5).

Op de langere termijn bestaan de belanghebbenden uit patiënten met HLH. De toepassing van deze kennis in patiënten valt buiten het directe onderzoeksdoel van deze studie. Het belang van de patiënten dat een behandeling wordt gevonden is zeer groot maar of dit project daar direct aan bijdraagt is onzeker. Het belang van de bijdragen van het project wordt daarom op dit moment ingeschat op een gering voordeel. De (meerderheid van de) DEC is wel van mening dat dit op langere termijn wel een groot belang kan worden.

De muizen worden direct door dit onderzoek geschaad zoals beschreven onder punt 11 en 12. De andere groep belanghebbenden, namelijk de onderzoekers, zullen door dit onderzoek hun kennis en inzichten vergroten, welke gedeeld zullen worden met het wetenschappelijk veld. Aanvullende belangen van onderzoekers zouden kunnen zijn dat het onderzoek hun carrièremogelijkheden vergroot door publicaties.

Hoewel maximaal 1222 muizen gebruikt zullen worden voor dit onderzoek, waarvan 1140 dieren ernstig ongerief zullen ervaren, acht de meerderheid van de DEC dit gerechtvaardigd door de verwachte nuttige gevolgen van dit onderzoek. Het wetenschappelijk en maatschappelijk belang is in dit project duidelijk geformuleerd en dit projectvoorstel zal hier aan bijdragen. De meerderheid van de DEC waardeert de verwachte resultaten die kunnen leiden tot een betere behandeling van HLH, als de meest zwaarwegende waarde die tegen het gebruik en het ongerief van maximaal 1222 muizen opweegt.

3.

Kan een behandeling gericht op de CD40 signalering de acute immuunziekte "hemofagocytair lymfocytose" remmen in muizen?

Het antwoord op de centrale morele vraag was niet unaniem bij dit project. Voor één DEC lid wegen de verwachte opbrengsten niet op tegen het ernstige ongerief dat de muizen moeten ondergaan. In het beantwoorden van de morele vraag zal uitgegaan worden van het meerderheidsstandpunt maar wordt ook het minderheidsstandpunt verwoord.

De (meerderheid van de) DEC is van mening dat het onderzoeken van de



vraag "Inzicht krijgen in de werking van het immuuncheckpoint eiwit CD40, alsook de mediators en signaleringsmoleculen die betrokken zijn bij de CD40 signaleringscascade, in een HLH muismodel en hoe deze het ziekteverloop beïnvloeden", het gebruik van 1222 muizen en het licht (6%:82/1222) tot ernstige (94%: 1140/1222) ongerief dat ze kunnen ondergaan door dit onderzoek, rechtvaardigt.

Hemofagocytair lymfocytose is een ontsporing van het immuunsysteem, met name van de macrofagen, die acuut op kan treden bij patiënten die behandeld worden met een chemotherapie of als complicatie bij een virusinfectie. Deze aandoening is levensbedreigend. CD40 speelt een belangrijke rol in de communicatie tussen immuuncellen. In dit onderzoek wordt de hypothese getoetst dat het remmen van deze signalering de immuunontsporing en het ziekteverloop kan remmen. In de muizen worden kunstmatig de macrofagen geactiveerd waardoor een cytokinestorm opgewekt wordt, waarna de rol van CD40 nader bestudeerd zal worden. Er wordt onderzocht of een interventie op de CD40 signalering het ziekteverloop kan remmen.

De DEC heeft geworsteld met deze aanvraag zoals te zien is in het aantal vragen dat de DEC gesteld heeft in meerdere vragenrondes. De grootste worsteling was het rechtvaardigen van het ernstige ongerief bij de proefdieren zonder garantie dat de studie (direct) gaat leiden tot een waardevol medicijn voor de HLH-patiënt. Het model dat gebruikt wordt, zal ernstig ongerief veroorzaken bij de muizen. De dieren zullen maximaal 9 dagen erg ziek zijn. De DEC heeft vooral veel gediscussieerd en extra vragen gesteld over de uiteindelijke mogelijke opbrengsten van dit onderzoek. Er was twijfel of het wel mogelijk is om een ontspoorde immuunrespons nog bij te kunnen sturen. Kan een interventie tijdens een reeds ontspoorde immuunrespons nog voorkomen dat mensen overlijden aan HLH? De aanvragers gaven hier een realistisch antwoord op. Zij konden deze vraag nog niet beantwoorden om de simpele reden dat dit nog niet onderzocht is. De aanvragers onderbouwden wel hun hypothese met een eerder uitgevoerde 'proof of concept' proef in een sepsis model waarbij trafinib in staat was de ontwikkeling van sepsis te voorkomen. Ondanks dat dit niet vergelijkbaar is met het toedienen van trafinib tijdens de ontspoorde immuunrespons (i.p.v. gelijktijdig met het induceren van sepsis), geeft het wel aan dat het mogelijk kan voorkomen dat 'nieuwe' immuuncellen die aangetrokken worden, niet verder ontwikkelen tot het hyperinflammatoire fenotype. Het gaat in deze aanvraag vooral om het onderzoeken van de immuunrespons en de daar bijpassende interventies, waaronder trafinib, op het verloop van de ziekte. Het meerderheidstandpunt van de DEC was uiteindelijk dat deze vermeerdering in kennis, gezien de ernst van de ziekte, opweegt tegen

het ernstige ongerief van de dieren. Er is eerst meer kennis nodig over wat de ontspoorde immuunrespons kan afremmen voordat er een behandeling ontwikkeld kan worden voor de HLH-patiënt. Het aantal patiënten die dit per jaar treft, is relatief klein. De meeste DEC-leden vonden dit onderzoek ondanks het relatieve lage aantal patiënten gerechtvaardigd door de ernst en dodelijkheid van deze ziekte. Eén DEC-lid vond het aantal patiënten dat uiteindelijk belang heeft bij de opbrengsten van dit project te klein om het ernstige ongerief van maximaal 1140 muizen te rechtvaardigen. Bovendien vond dit DEC-lid ook de uiteindelijke meerwaarde voor de patiënten die in leven zouden blijven door een uiteindelijk medicijn te onzeker omdat er nu nog geen goede voorspelling gedaan kan worden over de kwaliteit van leven na deze behandeling. De patiënten die het betreft vaak ernstig onderliggend lijden hebben.

De aanvragers hebben door de strategie (pilots t.b.v. vermindering en verfijning) en het definiëren van het HEP zoveel mogelijk geprobeerd het ongerief te beperken. Het ongerief blijft ernstig maar dit komt doordat het een model is voor een ziekte waar mensen maar ook deze muizen levensbedreigend ziek door worden. De DEC miste in het voorstel de onderbouwing dat het voorgestelde model transleerbaar is naar HLH in mensen. De extra literatuurverwijzingen en een heldere beschrijving van de vergelijkbare ziekteprocessen in de mens en het model heeft de DEC overtuigd van de waarde van het model.

Het ongerief in deze proeven wordt veroorzaakt door het opwekken van een cytokine storm waardoor de dieren zich echt ziek zullen voelen. Het experiment duurt maximaal 10 dagen. De aanvrager zal in pilots onderzoeken of de duur zoveel mogelijk beperkt kan worden. Desondanks zullen de muizen deze ontsporing van het immuunsysteem moeten ondergaan en schat de DEC het ongerief als ernstig in, ook bij een kortere duur. De HEP's zijn zo gedefinieerd dat het ernstige ongerief zoveel mogelijk beperkt wordt en voorkomen wordt dat dieren sterven in de proef. De dieren worden vroegtijdig uit de proef gehaald als ze meer dan 20% gewicht verliezen. De DEC heeft besproken of de HEP niet gedefinieerd zou moeten worden als een hoger gewichtsverlies, dit zou het aantal dieren dat nodig is, kunnen beperken. De kans dat muizen dan sterven in de proef neemt dan wel toe. De DEC verkiest uit het oogpunt van verfijning het gewichtsverlies van 20% i.p.v. een hoger percentage (zie C13). Er wordt rekening gehouden met maximaal 50% uitval. 'Uitval' heeft in dit onderzoek echter een andere betekenis dan normaal gesproken. Dieren die eerder uit de proef gehaald worden, zullen wel geanalyseerd worden om de immuunrespons in kaart te brengen. De DEC waardeert dat deze muizen gebruikt worden voor het beantwoorden van de onderzoeksvraag.

De DEC acht het aannemelijk dat de doelstellingen binnen de kaders van het project behaald kunnen worden. De onderzoeksstrategie is logisch en navolgbaar en de uitkomstparameters sluiten logisch en helder aan bij de aangegeven doelstellingen. De DEC heeft hier aanvullende vragen over gesteld om een beter beeld te krijgen (zie antwoord op vraag C4). De aanvrager legt goed uit waarom er voor deze vragen geen proefdiervrije alternatieven kunnen worden gebruikt (zie C14). De DEC is er van overtuigd dat de aanvrager voldoende kennis en kunde heeft om de doelstellingen te behalen. Tevens verwacht de DEC op basis van deze aanvraag dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken door de onderzoeksstrategie en het gebruik van powerberekeningen. Er is een duidelijk go/no go moment beschreven. Eerst zal het model verfijnd worden in de faciliteit en zal onderzocht worden of CD40 een belangrijke rol speelt. Pas als dit het geval is zullen er vervolggexperimenten uitgevoerd worden waarin ook signaleringseiwitten bestudeerd kunnen worden. Deze go/no go voorkomt dat er proeven worden uitgevoerd terwijl CD40 uiteindelijk geen rol blijkt te spelen. Bovendien zal in de pilots indien 30% van de dieren een HEP bereikt op een bepaald tijdstip alle muizen gedood worden voor analyse. Dit voorkomt extra lijden bij de overige dieren. Uit de pilot moet blijken of de vragen ook op een eerder tijdstip beantwoord kunnen worden waardoor het aantal dagen met ernstig ongerief verkort kan worden.

Dit onderzoek maakt geen gebruik van dieren met een speciale herkomst. Ook is er geen speciale wet- en regelgeving van toepassing op dit project.

Gezien het bovenstaande komt de DEC tot het meerderheidstandpunt dat dit project het gebruik van proefdieren rechtvaardigt.

De DEC heeft extern advies ingewonnen bij

- de aanvrager is om aanvullingen gevraagd

De DEC heeft over vier termijnonderbrekingen vragen gesteld aan de aanvrager over de onderbouwing van het ziektemodel, de klinische toepasbaarheid en eigenschappen van trafinib, de onderbouwing voor de sterftepercentages, het toelichten van de strategie, het ontwerp van de pilotstudies en de sterfte bij de dieren voordat een HEP wordt bereikt.

Het DEC advies is Verlenen onder voorwaarden

Het uitgebrachte advies is niet gebaseerd op consensus.

Citaat E2:

Dit DEC advies is niet unaniem tot stand gekomen. We hebben ervoor gekozen om het minderheidsstandpunt van één DEC-lid toch ook te beschrijven in de ethische wegging. Het is deel geweest van de discussie waarbij uiteindelijk ieder DEC leden een eigen persoonlijke afweging heeft gemaakt. Beide standpunten zijn daarom in de ethische wegging beschreven.

Maar volgens het gevraagde voorbeeld:

Het advies is gebaseerd op een meerderheidsstandpunt. Eén DEC-lid kwam tot een negatief advies. Dit lid is 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 dat er sprake is van ernstig ongerief voor een aanzienlijke groep dieren (1140 van de in totaal 1222 dieren). Dat kan alleen gerechtvaardigd zijn als daar grote en vrij zekere baten tegenover staan, maar dat is zijn optiek niet het geval. Het is wel zo dat de trafinib-behandeling levensreddend kan zijn, dus dat zou een significante baat voor patiënten die het betreft zijn. Maar tegelijkertijd betreft het vermoedelijk niet heel veel patiënten: HLH is met 50-100 Nederlandse gevallen per jaar volgens de onderzoekers een 'zeer zeldzame ziekte', waarvan een uiteenlopend percentage daadwerkelijk overlijdt, maar ook een deel het met de huidige behandelingen al overleeft. Daarbij is onduidelijk hoeveel de overlevingskansen (en kwaliteit van leven) dankzij trafinib zouden gaan stijgen. Zoals hij het begrijpt hebben HLH-patiënten vaak ernstig onderliggend lijden en daarom sowieso al geen goede vooruitzichten, en is het ook maar de vraag hoe effectief de behandeling in de praktijk kan worden ingezet, gezien de korte tijd waarin HLH kritiek kan worden en de tijd die nodig is voor het stellen van de juiste diagnose. Om deze redenen schat hij de baten van het onderzoek niet als heel hoog in, en is hij er dus niet van overtuigd dat deze baten zullen opwegen tegen het ernstige ongerief voor 1140 dieren (plus licht ongerief voor 82 dieren). Derhalve geeft hij een negatief advies. Overigens is hij ook niet overtuigd van de opzet met pilots waardoor het daadwerkelijke experiment bekort kan worden maar behoorlijk veel extra dieren nodig zijn (zo'n 25% van de dieren zit in de pilots), en waarvan de data volgens de onderzoekers niet vergeleken kunnen worden met de data uit het daadwerkelijke experiment."

	<p>De volgende dilemma's zijn gesignaleerd door de DEC:  Citaat E3:  Bij het bespreken van deze projectaanvraag kwam het dilemma naar voren of een behandeling voor een kleine patiëntenpopulatie het gebruik van dieren 'waard' is. Zie de ethische weging hoe de DEC-leden hiermee om zijn gegaan.</p>
--	--

**3 Kwaliteit DEC advies**

<b>Kwaliteit DEC-advies</b>	<p>Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het DEC advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld. Bij de beantwoording van de beoordelingsvragen verstrekt u een heldere onderbouwing. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen.</p> <p>In C1 van uw advies verwijst u naar een voorbeeld uit de Handreiking Invulling definitie project. Hierbij verwijst u naar een verouderde nummering. Kunt u bij toekomstige adviezen de meest recente versie aanhouden, die is gepubliceerd op de website van de CCD?</p> <p>De dieren zullen niet in alle gevallen adequate pijnbestrijding ontvangen, waar dit wel gewenst kan zijn. De CCD had de visie van de DEC hierop graag teruggezien onder C9 van uw advies.</p> <p>De CCD waardeert de wijze waarop de DEC helder inzichtelijk heeft gemaakt waarom het advies met een meerderheidsstandpunt tot stand is gekomen, en de goed navolgbare onderbouwing waarom één DEC lid het positieve advies niet deelde.</p>
-----------------------------	--

#### 4 Inhoudelijke beoordeling

<b>Doelstelling</b> Doelstelling	<p>Citaat: Het directe doel van dit project is inzicht krijgen in de werking van het immuun checkpoint eiwit CD40, alsook de mediators en signaleringsmoleculen betrokken zijn bij de CD40 signaleringscascade, in een HLH muismodel en hoe deze het ziekteverloop beïnvloeden. Het uiteindelijke doel is om te onderzoeken of CD40 signalering een aangrijpingspunt is voor een interventie, bijvoorbeeld met trafinib, die gebruikt kan worden voor de ontwikkeling van een behandeling van HLH patiënten.</p> <p>Verschillende subdoelen moeten behaald worden om tot het directe doel te komen, te weten:</p> <ol style="list-style-type: none"><li>1. Via welke processen reguleren het immuun checkpoint CD40 en de daarbij betrokken mediators en signaleringsmoleculen de activatie van verschillende (immuun)celtypen in een HLH ziektemodel en wat is het effect hiervan op het ziekteverloop.</li><li>2. Wat zijn de effecten van interventies (onder andere genetisch, farmacologisch) in deze processen op specifieke (immuun)cel functies die belangrijk zijn bij HLH en hoe beïnvloedt dit het ziekteverloop.</li></ol>
Wetenschappelijk en maatschappelijk belang	<p>Citaat: Maatschappelijk belang Per jaar worden er in Nederland ongeveer 50-100 mensen gediagnostiseerd met HLH, waarbij 8-54% komt te overlijden in de acute fase van HLH. Met de kennis verkregen in dit project willen we nieuwe immunologische mechanismen ontrafelen die bijdragen aan het ontstaan van HLH bij de muis. Wanneer deze kennis in de toekomst geëxtrapoleerd wordt naar de mens kan CD40 therapie een uitkomst bieden in de behandeling van HLH. <a href="#">5.1 lid2h</a></p> <p><a href="#">5.1 lid2h, 5.1 lid2e</a></p> <p>. Wanneer blijkt dat trafinib een mogelijke behandelstrategie is voor HLH in muizen, kan hierdoor sneller de stap worden gemaakt om trafinib in een klinische studie bij HLH patiënten te onderzoeken. Daarnaast blijkt uit eerdere studies dat het muismodel van HLH veel overlap vertoont met het ziektebeeld dat wordt gezien bij HLH patiënten. De voor HLH kenmerkende macrofaag geïnduceerde cytokine storm is vergelijkbaar in mens en muis en wordt gekenmerkt door onder andere een verhoogde productie van de cytokines IFN<math>\gamma</math>, TNF<math>\alpha</math>, en IL-6 (Albeituni et al., Blood, 2019; <a href="#">5.1 lid2h, 5.1 lid2e</a> ). Ook lopen er op dit moment klinische studies naar de effectiviteit van emampalumab (IFN<math>\gamma</math>-blokkerend antilichaam) bij primaire HLH (de erfelijke variant), deze bevindingen zijn gedaan in de muis en zijn in de eerste klinische</p>

	<p>trials ook al effectief gebleken bij HLH patiënten <b>5.1 lid2h</b> . Dit toont aan dat resultaten behaald in de muis geëxtrapoleerd kunnen worden naar de mens, wat een goede indicatie is dat de bevindingen die in dit project worden gedaan van belang zijn voor het patiënten welzijn en daarmee bijdragen aan het maatschappelijke belang van dit project. Ondanks dat emampalumab effectief lijkt te zijn in de behandeling van primaire HLH, is er een maatschappelijk belang om te blijven zoeken naar alternatieve therapieën van HLH. Voor secundaire HLH kan emampalumab namelijk minder effectief zijn, doordat secundaire HLH een andere oorzaak heeft dan primaire HLH. Waar bij primaire HLH erfelijkheid een grote rol speelt, is de onderliggende oorzaak bij secundaire HLH vaak een infectie of kanker. Emampalumab blokkeert de IFN<math>\gamma</math> respons, een belangrijke respons bij virale infecties, waardoor deze therapie niet geschikt is wanneer de secundaire HLH wordt uitgelokt door een virale infectie. Hierdoor is het van belang om specifiek voor secundaire HLH op zoek te gaan naar nieuwe en betere therapeutische strategieën. Daarom willen wij in dit project onderzoeken of CD40 therapie effectief is in secundaire HLH, doordat CD40 therapie specifiek aangrijpt op de door HLH gedysreguleerde macrofagen, maar ondertussen wel de rest van de immuun respons intact laat.</p> <p>Wetenschappelijk belang Wetenschappelijk gezien zal de kennis die we met dit project vergaren bijdragen aan het begrijpen van de rol van het immuun checkpoint CD40 in HLH, en deze kennis is mogelijk ook relevant voor andere immuun gerelateerde ziekten. Door onze onderzoeksgroep uitgevoerde dierproeven hebben wij reeds het belang van CD40, maar ook diverse andere immuun checkpoints, in het ontstaan van hart- en vaatziekten en obesitas geïnduceerde ontstekingen aangetoond (Kusters et al., 2018; Aarts et al., 2018; Aarts et al., 2019; Reiche et al., 2019). Interventies van downstream-mediators van het immuun checkpoint CD40 hebben laten zien dat door het mediëren van immuun checkpoint-gemedieerde-ontstekingsreacties de ernst van atherosclerose en type 2 diabetes afnemen in muizen (Chatzigeorgiou et al., 2014; Lameijer et al., 2018). Met dit project kunnen wij verder bijdragen aan het ontrafelen de rol van CD40 in acute immuun ziekten zoals HLH.</p>
Onderbouwing wetenschappelijk en maatschappelijk belang	Het belang is voldoende uitgewerkt en onderbouwd.

<p><b>Wetenschappelijke kwaliteit</b> Kwaliteit aanvrager/ onderzoeksgroep en onderzoek</p>	<p>Citaat DEC advies C7: De IVD ziet er op toe dat alle personen die betrokken zijn bij dit onderzoek, zowel de onderzoekers als de analisten die de experimenten gaan uitvoeren, als de onderzoekers die het project hebben vormgegeven en hebben opgeschreven, voldoen aan de wettelijke eisen van kennis en deskundigheid. De aanvragers zijn nieuw met dit model maar hebben veel ervaring met onderzoek aan CD40 in andere ziektemodellen. De DEC waardeert dat er pilot experimenten worden gedaan om te bepalen of de uitleesparameters niet eerder verkregen kunnen worden zodat de dieren minder lang (ernstig) ziek hoeven te zijn. De DEC oordeelt op basis hiervan dat de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen voldoende gewaarborgd zijn.  Het Secretariaat heeft geen reden te twifelen aan de kwaliteit van de aanvragers en het onderzoek.</p>
---	--

**3V's**

<p>Vervanging</p>	
	<p><b>3.4.3.1 Muizenmodel voor Hemofagocytaire Lymfocytose :</b> Citaat: HLH is een complexe immuun ziekte waarbij het met name mis gaat bij de 'communicatie' tussen de verschillende cellen in het immuunsysteem en de aangedane weefsels. Diermodellen zijn nodig om zowel de interactie tussen de immuuncellen te kunnen bestuderen, alsmede het effect hiervan op de door HLH aangedane weefsels. Parallel aan de studies met muismateriaal worden ook studies met humane cellen gedaan om in een vroeg stadium een relatie van bevindingen in de humane situatie te kunnen leggen. In patiënten materiaal zoals bloed kunnen wij ontstekingswaarden (o.a. cytokine productie, en immuuncel activatie) bepalen, om te onderzoeken of deze overeen komen met ons muismodel.</p>



Verminderen

**3.4.3.1 Muizenmodel voor Hemofagocytaire Lymfocytose :**

Citaat:

5.1 lid2h

5.1 lid2h, 5.1 lid2e

Hierdoor weten wij dat CD40 belangrijk is in de door HLH aangedane cel processen, wat de kans van slagen van dit project groot maakt. Er zijn al zeer goede in vitro karakterisaties gedaan in cel modellen (cellijnen, primaire muiscellen en humane cellen), waardoor wij in dit project geen extra muizen hoeven te gebruiken voor in vitro experimenten om de rol van CD40, en de daarbij betrokken mediators en signaleringsmoleculen, te onderzoeken. Hierdoor kunnen wij in dit project keuzes maken voor specifieke aanpakken gebaseerd op in vitro studies, en dit leidt tot specifiekere proeven en minder diergebruik.

Er wordt ook deels gewerkt met beenmergtransplantatie studies waarbij door het transplanteren van beenmerg uit één enkele muis het immuunsysteem van vijf muizen wordt gerepopuleerd. Dit leidt tot een sterke vermindering van het aantal dieren vergeleken met het aantal dieren dat nodig zou zijn wanneer de juiste genotype verkregen zouden moeten worden door middel van kruisingen.

Power berekeningen worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken. Bevindingen uit de literatuur (Albeituni et al., Blood, 2019) worden meegenomen bij de power berekeningen. We hebben nu op basis van bekende gegevens een poweranalyse gedaan. Voor ieder experiment zal een nieuwe poweranalyse gedaan worden zodat het experiment met het minimum aantal dieren uitgevoerd wordt waarmee nog een betrouwbaar resultaat verkregen kan worden. Door de voorafgaande pilots om het model te optimaliseren, hopen we ook het aantal dieren dat gebruikt gaat worden in de experimenten te verminderen.

Verfijnen	<p><b>3.4.3.1 Muizenmodel voor Hemofagocytaire Lymfocytose :</b>  Citaat:  Aan de hand van meerdere pilot experimenten proberen wij de proefopzet te verfijnen. Dit doen wij onder andere door de muizen op verschillende tijdstippen te doden na HLH inductie, en op deze manier te kijken of wij op een eerder tijdstip al het effect van een interventie op het HLH ziekteproces kunnen zien. Daarnaast is het bereiken van een HEP óók een wetenschappelijk eindpunt. De dieren die het einde van het experiment niet halen vanwege het bereiken van een HEP zullen gebruikt worden voor post-mortem analyses. Hierdoor worden deze muizen toch gebruikt om meer inzicht te verkrijgen in de pathogenese van deze aandoening.</p> <p>Waar mogelijk zal het aantal handelingen van de muis, met name de injecties, zo laag mogelijk worden gehouden. Er wordt de voorkeur gegeven aan geneesmiddelen die met een minimale frequentie worden gegeven, maar vanwege de farmacologische eigenschappen, bijvoorbeeld een hoge halfwaardetijd of slechte oplosbaarheid, van een geneesmiddel zal er soms vaker geïnjecteerd moeten worden. Wij zullen de dieren niet over een langere periode injecteren dan strikt noodzakelijk. Wanneer wij de dieren meer dan één keer per dag intraveneus moeten injecteren zullen wij een canuleren of een Alzet pomp gebruiken, om het ongerief lager te houden. Hierbij heeft het plaatsen van een Alzet pomp de voorkeur, aangezien deze dieren niet individueel gehuisvest hoeven te worden.</p> <p>Een deel van de muizen zal een genetische modificatie hebben of een interventie krijgen, waardoor het ziektebeeld minder ernstig wordt. Hierdoor zal het uiteindelijke ongerief bij deze muizen ondanks de inductie van HLH lager zijn.</p> <p>Mannelijke muizen worden om vechten te voorkomen in groepjes van drie tot vier muizen gehuisvest en krijgen twee huisjes. Ook zullen de transplantatie dieren indien nodig met hoogenergetisch week gemaakt voer gevoed worden.</p>
<b>Hergebruik</b>	Er is geen sprake van hergebruik van dieren.

Naam proef	Worden de dieren gedood?	Doden volgens richtlijn?
3.4.3.1 Muizenmodel voor Hemofagocyttaire Lymfocytose	Ja	volgens de richtlijn.

Naam proef		
<b>3.4.3.1 Muizenmodel voor Hemofagocyttaire Lymfocytose</b>	HEP: A: 2% B: 50% (In de pilot experimenten proberen wij het diermodel te verfijnen waardoor dit percentage lager zal uitvallen. Daarnaast is het bereiken van een HEP ook een wetenschappelijk eindpunt, deze dieren worden wel in de analyse worden gebruikt en moeten dus niet als 'uitval' gezien worden).	<p>Citaat: In het algemeen geldt: Bij het bereiken van humane eindpunten (d.w.z. verminderd exploratief gedrag in combinatie met tekenen van algemeen onwelzijn – openstaande vacht, abnormale houding, of bij dieren zonder HLH een gewichtsverlies &gt;15% t.o.v. hoogst gemeten of &gt;10% t.o.v. vorige weegpunt over een periode van twee tot drie dagen zal overgegaan worden tot het doden van dat specifieke dier.</p> <p>Verder zijn er nog specifieke humane eindpunten:</p> <p>A. Beenmergtransplantatie: Verminderde activiteit, onverzorgde vacht, houding of enige andere afwijking zoals beschreven in de SOP van de faciliteit evenals gewichtsverlies &gt;15% ten opzichte van het hoogst gemeten of &gt;10% ten opzichte van het vorige weegpunt over een periode van twee dagen.</p> <p>B. Ziekte score voor het HLH model: Om vast te stellen of muizen ongerief ondervinden observeren we het gedrag en het gewicht van de muis. Deze observaties resulteren in een ziekte score die de basis zijn voor de humane eindpunten.</p> <p>0: gezonde muis 1: Onverzorgde vacht en verminderde activiteit, minder dan 10% gewichtsverlies 2:Recht opstaande haren (pilo-erectie), minder actief gedrag, gebogen houding, 10-20% gewichtsverlies.</p> <p>3 (HEP): Pilo-erectie, sterk verminderd actief gedrag, gebogen houding, en meer dan 20% gewichtsverlies.</p>

		Muizen zullen tijdens het experiment ernstig gewichtsverlies doormaken en zeer ziek zijn, dit is een beschreven beeld in het ziekteverloop van HLH. Het gewichtsverlies kan oplopen tot 20% ten opzichte van het startgewicht van de muis en is een goede surrogaat parameter voor andere uitingen van HLH zoals anemie, hypotensie en hepatosplenomegalie. Muizen met méér dan 20% gewichtsverlies ten opzichte van het startgewicht, ziektescore 3, zullen uit de studie gehaald worden, omdat dit als humaan eindpunt is gedefinieerd. Dieren die zo ernstig ziek zijn dat verwacht kan worden dat ze snel (de komende 12 uur) kunnen overlijden maar nog niet meer dan 20% zijn afgevallen, zullen ook gedood worden. Hierdoor kunnen deze dieren ook nog gebruikt worden voor wetenschappelijke analyses.
Muizen ( <i>Mus musculus</i> )	Ongerief: 93,3% Ernstig 6,7% Licht	

## 5 Samenvatting

### 5.2 lid1

De aanvrager geeft aan dat de dieren tijdens het geïnduceerde HLH ziektebeeld geen pijnbestrijding zullen ontvangen, omdat dit zou stroken met de proefopzet. 5.2 lid1

Dieren die gecanuleerd worden, zullen individueel worden gehuisvest om te voorkomen dat kooigenoten aan de canules zullen knagen. 5.2 lid1

Het positieve advies van de DEC is tot stand gekomen op basis van een meerderheidsstandpunt. De DEC geeft in een minderheidsstandpunt weer dat de ethische afweging van één van de DEC leden resulteerde in een negatieve schade/baten analyse. Dit is op basis van de kleine patiëntenpopulatie en het gebruik van relatief veel proefdieren. Daarnaast zijn voor dit DEC lid de effectiviteit van de interventie en de opzet van de pilotexperimenten niet overtuigend. Het meerderheidsstandpunt van de DEC is tot stand gekomen op basis van de toegevoegde waarde van de opgedane kennis van het voorgestelde project. 5.2 lid1

Een groot deel van de dieren ( $\pm 94\%$ ) zal naar verwachting ernstig ongerief ondervinden. Het ernstige ongerief is inherent aan het diermodel. [5.2 lid1](#)

## **6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning**

[5.2 lid1](#)

### *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 februari 2028 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

U dient de uitkomsten van de pilot-onderzoeken, waarbij het ongerief voor het voorgestelde diermodel zal worden onderzocht en ingekaderd, te rapporteren aan de CCD. In deze terugkoppeling dient te worden ingegaan op de mate van ongerief die de dieren ondervinden en of de humane eindpunten zullen worden aangepast in de beschreven vervolggexperimenten van het voorgestelde project.

Na terugkoppeling van de resultaten van de pilot-onderzoeken zal door de CCD op basis van de nieuwe verkregen informatie een schade/baten analyse worden gemaakt om te beoordelen of het vervolgonderzoek binnen het voorgestelde project mag worden uitgevoerd.

De ingangsdatum van de vergunning kan niet voor de verzenddatum van de beschikking zijn en zal indien van toepassing aangepast worden. Dit is ook het geval bij een voorgenomen besluit.

## **7 Concept beschikking voor akkoord CCD**



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

5.1 lid2h

5.1 lid2e

5.1 lid2h



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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD 5.1 lid2h 202215811  
**Bijlagen**  
3

Datum  
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

## CONCEPT

Geachte 5.1 lid2e

Op 28 januari 2022 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "De rol van het immuun checkpoint eiwit CD40 in hemofagocytair lymfocytose" met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202215811. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

### Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed. Uit artikel 10a, eerste lid van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) volgt daarom dat het is toegestaan om uw project uit te voeren binnen de gestelde vergunningsperiode. Deze vergunning wordt afgegeven voor de periode van 22 juli 2022 tot en met 28 februari 2027.

Aan de vergunning hebben wij de volgende voorwaarden 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 u terlijk februari 2028 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

#### Voorwaarde

U dient de uitkomsten van de pilot-onderzoeken, waarbij het ongerief voor het voorgestelde diersmodel zal worden onderzocht en

ingekaderd, te rapporteren aan de CCD. In deze terugkoppeling dient te worden ingegaan op de mate van ongerief die de dieren ondervinden en of de humane eindpunten zullen worden aangepast in de beschreven vervolggexperimenten van het voorgestelde project.

Na terugkoppeling van de resultaten van de pilot-onderzoeken zal door de CCD op basis van de nieuwe verkregen informatie een schade-/baten analyse worden gemaakt om te beoordelen of het vervolgonderzoek binnen het voorgestelde project mag worden uitgevoerd.

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

#### Procedure

##### Advies dierexperimentencommissie

Wij hebben advies gevraagd bij 5.1 lid 2h (hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 8 juni 2022. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

##### Nadere vragen aanvrager

Op 22 juni 2022 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft tijdig antwoord gegeven. Het verzoek om aanvullingen had betrekking op het benoemen van de individuele huisvesting en tekstuele onduidelijkheden in de NTS en het beschrijven van de translationele waarde van het diersmodel in zowel de NTS als de bijlage dierproeven. Uw reactie is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

#### Overwegingen

Wij kunnen ons niet geheel vinden in de inhoud van het advies van de DEC. In aanvulling op het DEC-advies stelt de CCD voorwaarden. De voorwaarden staan in de vergunning beschreven en zijn hieronder toegelicht. Ten aanzien van de overige onderdelen, nemen wij het advies van de DEC over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. U dient de resultaten van de pilot-experimenten terug te koppelen aan de CCD.

##### 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. Deze beoordeling zal u terlijk in februari 2028 plaatsvinden. Meer informatie over de eisen die gesteld worden bij de beoordeling achteraf vindt u in de bijlage 'Weergave wet- en regelgeving'.

#### Datum:

Aanvraagnummer:  
AVD 5.1 lid 2h 202215811

**Met opmerkingen 5.1 lid 1:** Je hebt alleen het tweede deel van de voorwaarde opgenomen (zie hieronder: Na terugkoppeling etc..). Het eerste deel mist nog. Daarom heb ik het oude stukje tekst toegevoegd. Klopt dit nog?

**Met opmerkingen 5.1 lid 2R1:** Aangepast

**Met opmerkingen 5.1 lid 3:** Ik zou dit stukje tekst hier verwijderen, dit is een deel van de voorwaarde, wat je hieronder al beschrijft

**Met opmerkingen 5.1 lid 4R3:** Aangepast.

Datum:  
Aanvraagnummer:  
AVD~~3.1.1~~202215811

#### Voorwaarde

De DEC is van oordeel dat de duur van ernstig ongerief bij de dieren verkort kan worden als uit de pilot-experimenten blijkt dat de duur van de geïnduceerde cytokinestorm verkort kan worden. Daarnaast ziet de DEC ruimte voor het toescherpen van de humane eindpunten in de voorgestelde studie, waarbij uit het pilot-experiment kan blijken dat minder dieren een humaan eindpunt zullen bereiken. De CCD ziet de resultaten van de pilot-experimenten om deze redenen terug en verzoekt ~~de aanvrager~~ u om de uitkomsten van de pilot-onderzoeken, waarbij het ongerief en de humane eindpunten voor het voorgestelde diermodel zullen worden onderzocht en ingekaderd, te rapporteren aan de CCD. In deze terugkoppeling dient te worden ingegaan op de mate van ongerief die de dieren ondervinden en of de humane eindpunten zullen worden aangepast in de beschreven vervolggexperimenten van het voorgestelde project op basis van de voorgestelde pilot-experimenten.

#### 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.

**Met opmerkingen 5.1.1(5):** Bedoel je aanscherpen? Of is toescherpen een bepaalde uitdrukking in de wetenschap?

**Met opmerkingen 5.1.1(6R5):** Aangepast

**Met opmerkingen 5.1.1(7):** Bedoel je het volgende: De CCD wil om deze redenen de resultaten van de pilot-experimenten inzien

**Met opmerkingen 5.1.1(8R7):** Aangepast.



**Meer informatie**

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

Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:

Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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

**Datum:****Aanvraagnummer:**AVD **S.1 lid 2b** 202215811



# CONCEPT

## Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam:

Adres:

Postcode en plaats:

Deelnemersnummer:

5.1 lid2h

deze projectvergunning voor het tijdvak 22 juli 2022 tot en met 28 februari 2027, voor het project "De rol van het immuun checkpoint eiwit CD40 in hemofagocytaire lymfocytose" met aanvraagnummer AVC\_1 lid2h 202215811, na advies 5.1 lid2h. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is 5.1 lid2e. Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 28 januari 2022
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 7 juni 2022;
  - b Bijlagen dierproeven
    - 3.4.3.1 Muizenmodel voor Hemofagocytaire Lymfocytose, zoals ontvangen op 29 juni 2022;
  - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 29 juni 2022;
  - d Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 8 juni 2022
  - e De aanvullingen op uw aanvraag, zoals ontvangen op 29 juni 2022.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief
<b>3.4.3.1 Muizenmodel voor Hemofagocytaire Lymfocytose</b>			
	Muizen (Mus musculus) / WT & GGO	1.222	93,3% Ernstig 6,7% Licht

### 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 u terlijk februari 2028 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

#### Voorwaarde

U dient de uitkomsten van de pilot-onderzoeken, waarbij het ongerief voor het voorgestelde diertype zal worden onderzocht en ingekaderd, te rapporteren aan de CCD. In deze terugkoppeling dient te worden ingegaan op de mate van ongerief die de dieren ondervinden en of de humane eindpunten zullen worden aangepast in de beschreven vervolgonderzoeken van het voorgestelde project

Na terugkoppeling van de resultaten van de pilot-onderzoeken zal door de CCD op basis van de nieuwe verkregen informatie een schade/baten analyse worden gemaakt om te beoordelen of het vervolgonderzoek binnen het voorgestelde project mag worden uitgevoerd.

heeft opmaaktoegepast: Lettertype:NietCursief

heeft opmaaktoegepast: Lettertype:9 pt, NietCursief

Met opmaak: StandaardRechts: 0 cm, AfstandVoor: 5 pt, Regelaafstand:enkel

**Aanvraagnummer:** AVD<sup>s.1 lid2</sup>202215811

**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:**  
AVD [8:11d2h](#) 202215811

## 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:**  
AVD<sup>5.1 lid 2</sup> 202215811

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.

##### 10a2 derde lid

Wanneer op grond van artikel 10a1, eerste en derde lid, is besloten dat het project achteraf wordt beoordeeld, beoordeelt de centrale commissie dierproeven na advies van de dierexperimentencommissie die eerder advies heeft gegeven over het projectvoorstel, aan de hand van de door de gebruiker ingediende documentatie die de centrale commissie dierproeven heeft aangegeven, de volgende aspecten:

- a. of de doelstellingen van het project werden bereikt;
- b. de schade die de dieren hebben ondervonden, met inbegrip van de gebruikte aantallen en soorten proefdieren en de ernst van de dierproeven; en
- c. eventuele elementen die kunnen bijdragen tot het verder in praktijk brengen van artikel 10.



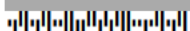
Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

5.1 lid2h

5.1 lid2e

5.1 lid2h



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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVC 5.1 lid2h 202215811  
**Bijlagen**  
3

Datum  
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

## CONCEPT

Geachte 5.1 lid2e ,

Op 28 januari 2022 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "De rol van het immuun checkpoint eiwit CD40 in hemofagocytair lymfocytose " met aanvraagnummer AVC 5.1 lid2h 202215811. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

### Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed. Uit artikel 10a, eerste lid van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) volgt daarom dat het is toegestaan om uw project uit te voeren binnen de gestelde vergunningsperiode. Deze vergunning wordt afgegeven voor de periode van 4 juli 2022 tot en met 28 februari 2027.

Aan de vergunning hebben wij de volgende voorwaarden 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 u terlijk februari 2028 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

De aanvrager dient de uitkomsten van de pilot-onderzoeken, waarbij het ongerief voor het voorgestelde diermodel zal worden onderzocht en

**Met opmerkingen 5.1 lid(1):** Deze voorwaarde komt nu uit het niets, is het mogelijk om hier nog een kopje voorwaarde boven te plaatsen?

ingekaderd, te rapporteren aan de CCD. In deze terugkoppeling zal worden dient te worden ingegaan op de mate van ongerief die de dieren ondervinden en in welke mate humane eindpunten zullen worden toegepast in de beschreven vervolgoexperimenten van het voorgestelde project.

Datum:  
Aanvraagnummer:  
AVD 3.1 lid 2h 202215811

Na terugkoppeling van de resultaten van de pilot-onderzoeken zal door de CCD op basis van de nieuwe verkregen informatie een schade/baten analyse worden gemaakt om te beoordelen of het vervolgonderzoek binnen het voorgestelde project mag worden uitgevoerd.

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

#### Procedure

##### Advies dierexperimentencommissie

Wij hebben advies gevraagd bij 5.1 lid 2h (hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 8 juni 2022. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

##### Nadere vragen aanvrager

Op 22 juni 2022 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft tijdig antwoord gegeven. Het verzoek om aanvullingen had betrekking op het benoemen van de individuele huisvesting en tekstuele onduidelijkheden in de NTS en het beschrijven van de translat onele waarde van het diemodel in zowel de NTS als de bijlage dierproeven. 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. Deze beoordeling zal uiterlijk februari 2028 plaatsvinden. Meer informatie over de eisen die gesteld worden bij de beoordeling achteraf vindt u in de bijlage 'Weergave wet- en regelgeving'.

##### Voorwaarden

Na terugkoppeling van de resultaten van de pilot-onderzoeken zal door de CCD op basis van de nieuwe verkregen informatie een nieuwe schade/baten analyse worden opgesteld gemaakt om te beoordelen of die zal worden toegepast in de ethische afweging voor het vervolgonderzoek binnen het voorgestelde project mag worden uitgevoerd.

**Met opmerkingen 5.11(2):** Wat bedoel je hier precies mee? Op welke wijze? Wat voor informatie wil je teruggekoppeld hebben?

**Met opmaak:** Inspringing: Links: 0 cm

**Met opmerkingen 5.11(3):** Hebben zij ook een aanvullende voorwaarde geadviseerd?

**Met opmerkingen TD(4):** Volgens mij staan die eisen er nu niet in

Deze staan in

10a2 derde lid

Wanneer op grond van artikel 10a1 eerste en derde lid is besloten dat het project achteraf wordt beoordeeld, beoordeelt de centrale commissie dierproeven na advies van de dierexperimentencommissie die eerder advies heeft gegeven over het projectvoorstel, aan de hand van de door de gebruiker ingediende documentatie die de centrale commissie dierproeven heeft aangegeven, de volgende aspecten:  
a. of de doelstellingen van het project werden bereikt;  
b. de schade die de dieren hebben ondervonden, met inbegrip van de gebruikte aantallen en soorten proefdieren en de ernst van de dierproeven; en  
c. eventuele elementen die kunnen bijdragen tot het verder in praktijk brengen van artikel 10.

Je kunt dit erbij zetten onder weergave wet- en regelgeving

**Met opmerkingen 5.11(5):** In dit stukje onder motivering leggen we uit waarom we de voorwaarde opleggen. Dat lees ik hier nog niet.

Wat ik wel lees, is informatie wat wij met de terugkoppeling gaan doen. Hier zeggen we in feite dat zij pas door mogen gaan met het vervolgonderzoek als wij de info opnieuw hebben beoordeeld, dit maakt deel uit van de voorwaarde daarom heb ik het omhoog geschoven.

Kun je hier nog motiveren waarom we de voorwaarden opleggen?

**Bezwaar**

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen.

Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 93118, 2509 AC Den Haag.

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

Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. Nadat u een bezwaarschrift heeft ingediend kunt u een voorlopige voorziening vragen bij de voorzieningenrechter van de rechtbank in de vestigingsplaats van de vergunninghouder. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisende situatie.

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

**Meer informatie**

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

Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:

Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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

**Datum:**

**Aanvraagnummer:**  
AVCS:1 **tdc** 202215811





# CONCEPT

## Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam:

Adres:

Postcode en plaats:

Deelnemersnummer:

5.1 lid2h

deze projectvergunning voor het tijdvak 4 juli 2022 tot en met 28 februari 2027, voor het project "De rol van het immuun checkpoint eiwit CD40 in hemofagocytaire lymfocytose " met aanvraagnummer AVC [5.1 lid2h](#) 202215811, na advies van [5.1 lid2h](#). De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [5.1 lid2e](#). Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 28 januari 2022
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 7 juni 2022;
  - b Bijlagen dierproeven
    - 3.4.3.1 Muizenmodel voor Hemofagocytaire Lymfocytose, zoals ontvangen op 29 juni 2022;
  - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 29 juni 2022;
  - d Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 8 juni 2022
  - e De aanvullingen op uw aanvraag, zoals ontvangen op 29 juni 2022.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief
<b>3.4.3.1 Muizenmodel voor Hemofagocytaire Lymfocytose</b>			
	Muizen (Mus musculus) / WT & GGO	1.222	93,3% Ernstig 6,7% Licht

### 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 februari 2028 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

De aanvrager dient de uitkomsten van de pilot-onderzoeken, waarbij het ongerief voor het voorgestelde diersmodel zal worden onderzocht en ingekaderd, te rapporteren aan de CCD. In deze terugkoppeling ~~zal~~ **dient te** worden ingegaan op de mate van ongerief die de dieren ondervinden en **in welke mate** humane eindpunten zullen worden toegepast in de beschreven vervolgoexperimenten van het voorgestelde project.

heeft opmaaktegepast: Markeren

**Aanvraagnummer:** AVD<sup>s.1 lid2</sup>202215811

**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:**  
AVD [8:11329](#) 202215811

## 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:**  
AVD<sup>g.11d2h</sup> 202215811

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 terzake 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.



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

5.1 lid2h

5.1 lid2e

5.1 lid2h



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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD<sup>5.1 lid2h</sup> 02215811  
**Bijlagen**  
3

Datum  
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

## CONCEPT

Geachte <sup>5.1 lid2e</sup> ,

Op 28 januari 2022 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "De rol van het immuun checkpoint eiwit CD40 in hemofagocytair lymfocytose " met aanvraagnummer AVD<sup>5.1 lid2e</sup> 202215811. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

### Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed. Uit artikel 10a, eerste lid van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) volgt daarom dat het is toegestaan om uw project uit te voeren binnen de gestelde vergunningsperiode. Deze vergunning wordt afgegeven voor de periode van 4 juli 2022 tot en met 28 februari 2027.

Aan de vergunning hebben wij de volgende voorwaarden 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 u terlijk februari 2028 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

De aanvrager dient de uitkomsten van de pilot-onderzoeken, waarbij het ongerief voor het voorgestelde diermodel zal worden onderzocht en

ingekaderd, te rapporteren aan de CCD. In deze terugkoppeling dient te worden ingegaan op de mate van ongerief die de dieren ondervinden en in welke mate humane eindpunten zullen worden toegepast in de beschreven vervolgonderzoek van het voorgestelde project.

**Datum:**  
**Aanvraagnummer:**  
AVD3.1 lid2h 202215811

Na terugkoppeling van de resultaten van de pilot-onderzoeken zal door de CCD op basis van de nieuwe verkregen informatie een schade/baten analyse worden gemaakt om te beoordelen of het vervolgonderzoek binnen het voorgestelde project mag worden uitgevoerd.

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

#### Procedure

##### Advies dierexperimentencommissie

Wij hebben advies gevraagd bij [5.1 lid2h](#) (hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 8 juni 2022. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

##### Nadere vragen aanvrager

Op 22 juni 2022 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft tijdig antwoord gegeven. Het verzoek om aanvullingen had betrekking op het benoemen van de individuele huisvesting en tekstuele onduidelijkheden in de NTS en het beschrijven van de translationele waarde van het diemodel in zowel de NTS als de bijlage dierproeven. 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. Deze beoordeling zal uiterlijk februari 2028 plaatsvinden. Meer informatie over de eisen die gesteld worden bij de beoordeling achteraf vindt u in de bijlage 'Weergave wet- en regelgeving'.

##### Voorwaarden

Na terugkoppeling van de resultaten van de pilot-onderzoeken zal door de CCD op basis van de nieuwe verkregen informatie een schade/baten analyse worden gemaakt om te beoordelen of het vervolgonderzoek binnen het voorgestelde project mag worden uitgevoerd.

**Met opmerkingen [5.1 lid\(1\)](#):** Volgens mij staan die eisen er nu niet in

Deze staan in

##### 10a2 derde lid

Wanneer op grond van [artikel 10a1 eerste en derde lid](#) is besloten dat het project achteraf wordt beoordeeld, beoordeelt de centrale commissie dierproeven na advies van de dierexperimentencommissie die eerder advies heeft gegeven over het projectvoorstel, aan de hand van de door de gebruiker ingediende documentatie die de centrale commissie dierproeven heeft aangegeven, de volgende aspecten:  
a. of de doelstellingen van het project werden bereikt;  
b. de schade die de dieren hebben ondervonden, met inbegrip van de gebruikte aantallen en soorten proefdieren en de ernst van de dierproeven; en  
c. eventuele elementen die kunnen bijdragen tot het verder in praktijk brengen van [artikel 10](#).

Je kunt dit erbij zetten onder weergave wet- en regelgeving

**Met opmerkingen [5.1 lid\(2R1\)](#):** Het is geen afwijzing, dus wetten en regelgeving worden niet genoemd, volgens mij. Wel in de beschikking opgenomen.

**Met opmerkingen [5.1 lid\(3\)](#):** In dit stukje onder motivering leggen we uit waarom we de voorwaarde opleggen. Dat lees ik hier nog niet.

Wat ik wel lees, is informatie wat wij met de terugkoppeling gaan doen. Hier zeggen we in feite dat zij pas door mogen gaan met het vervolgonderzoek als wij de info opnieuw hebben beoordeeld, dit maakt deel uit van de voorwaarde daarom heb ik het omhoog geschoven.

Kun je hier nog motiveren waarom we de voorwaarden opleggen?

**Bezwaar**

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen.

Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 93118, 2509 AC Den Haag.

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

Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. Nadat u een bezwaarschrift heeft ingediend kunt u een voorlopige voorziening vragen bij de voorzieningenrechter van de rechtbank in de vestigingsplaats van de vergunninghouder. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisende situatie.

Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op

<http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de vergunninghouder valt.

**Meer informatie**

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

Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:

Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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

**Datum:**

**Aanvraagnummer:**  
AVCS.1.1020 202215811



## CONCEPT

### Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam:

Adres:

Postcode en plaats:

Deelnemersnummer:

5.1 lid2h

deze projectvergunning voor het tijdvak 4 juli 2022 tot en met 28 februari 2027, voor het project "De rol van het immuun checkpoint eiwit CD40 in hemofagocyttaire lymfocytose" met aanvraagnummer AVC 5.1 lid2h 202215811, na advies van 5.1 lid2h. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is 5.1 lid2e. Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 28 januari 2022
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 7 juni 2022;
  - b Bijlagen dierproeven
    - 3.4.3.1 Muizenmodel voor Hemofagocyttaire Lymfocytose, zoals ontvangen op 29 juni 2022;
  - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 29 juni 2022;
  - d Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 8 juni 2022
  - e De aanvullingen op uw aanvraag, zoals ontvangen op 29 juni 2022.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief
<b>3.4.3.1 Muizenmodel voor Hemofagocyttaire Lymfocytose</b>			
	Muizen (Mus musculus) / WT & GGO	1.222	93,3% Ernstig 6,7% Licht

#### 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 februari 2028 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

De aanvrager dient de uitkomsten van de pilot-onderzoeken, waarbij het ongerief voor het voorgestelde diersmodel zal worden onderzocht en ingekaderd, te rapporteren aan de CCD. In deze terugkoppeling zal dient te worden ingegaan op de mate van ongerief die de dieren ondervinden en in welke mate humane eindpunten zullen worden toegepast in de beschreven vervolgoexperimenten van het voorgestelde project.

heeft opmaaktegepast: Markeren



**Aanvraagnummer:** AVD<sup>s.1 lid2</sup>202215811

**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:**  
AVD [8:11d21](#) 202215811

## 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:**  
AVD<sup>g.11d2h</sup> 202215811

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.

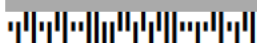
#### **Beoordeling achteraf**

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.



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

5.1 lid2h  
5.1 lid2e  
5.1 lid2h



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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD 5.1 lid2h 202215811  
**Bijlagen**  
3

Datum 1 augustus 2022

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 5.1 lid2e ,

Op 28 januari 2022 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "De rol van het immuun checkpoint eiwit CD40 in hemofagocyttaire lymfocytose " met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202215811. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

### **Beslissing**

Wij keuren uw aanvraag goed. Uit artikel 10a, eerste lid van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) volgt daarom dat het is toegestaan om uw project uit te voeren binnen de gestelde vergunningsperiode. Deze vergunning wordt afgegeven voor de periode van 1 augustus 2022 tot en met 28 februari 2027.

Aan de vergunning hebben wij de volgende voorwaarden 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 februari 2028 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

### *Aanvullende voorwaarde*

U dient de uitkomsten van de pilot-onderzoeken, waarbij het ongerief voor het voorgestelde diermodel zal worden onderzocht en ingekaderd, te rapporteren aan de CCD. In deze terugkoppeling dient te worden ingegaan op de mate van

ongerief die de dieren ondervinden en of de humane eindpunten zullen worden aangepast in de beschreven vervolgonderzoek van het voorgestelde project.

**Datum:**  
1 augustus 2022  
**Aanvraagnummer:**  
AVD 5.1 lid2h 202215811

Na terugkoppeling van de resultaten van de pilot-onderzoeken zal door de CCD op basis van de nieuwe verkregen informatie een schade/baten analyse worden gemaakt om te beoordelen of het vervolgonderzoek binnen het voorgestelde project mag worden uitgevoerd.

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

## **Procedure**

### *Advies dierexperimentencommissie*

Wij hebben advies gevraagd bij 5.1 lid2h (hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 8 juni 2022. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

### *Nadere vragen aanvrager*

Op 22 juni 2022 en 13 juli 2022 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft tijdig antwoord gegeven. Het verzoek om aanvullingen had betrekking op het benoemen van de individuele huisvesting en tekstuele onduidelijkheden in de NTS en het beschrijven van de translationele waarde van het diermodel in zowel de NTS als de bijlage dierproeven. Uw reactie is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

## **Overwegingen**

Wij kunnen ons niet geheel vinden in de inhoud van het advies van de DEC. In aanvulling op het DEC-advies stelt de CCD voorwaarden. De voorwaarden staan in de vergunning beschreven en zijn hieronder toegelicht. Ten aanzien van de overige onderdelen, nemen wij het advies van de DEC over, 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. Deze beoordeling zal uiterlijk februari 2028 plaatsvinden. Meer informatie over de eisen die gesteld worden bij de beoordeling achteraf vindt u in de bijlage 'Weergave wet- en regelgeving'.

**Datum:**  
1 augustus 2022  
**Aanvraagnummer:**  
AVC **5.1 lid2h** 202215811

#### *Aanvullende voorwaarde*

De DEC is van oordeel dat de duur van ernstig ongerief bij de dieren verkort kan worden als uit de pilot-experimenten blijkt dat de duur van de geïnduceerde cytokinestorm verkort kan worden. Daarnaast ziet de DEC ruimte voor het aanscherpen van de humane eindpunten in de voorgestelde studie, waarbij uit het pilot-experiment kan blijken dat minder dieren een humaan eindpunt zullen bereiken. De CCD wil om deze redenen de resultaten van de pilot-experimenten inzien en verzoekt de aanvrager om de uitkomsten van de pilot-onderzoeken, waarbij het ongerief en de humane eindpunten voor het voorgestelde diermodel zullen worden onderzocht en ingekaderd, te rapporteren aan de CCD. In deze terugkoppeling dient te worden ingegaan op de mate van ongerief die de dieren ondervinden en of de humane eindpunten zullen worden aangepast in de beschreven vervolggexperimenten van het voorgestelde project op basis van de voorgestelde pilot-experimenten.

#### **Bezwaar**

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen. Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 93118, 2509 AC Den Haag.

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

Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. Nadat u een bezwaarschrift heeft ingediend kunt u een voorlopige voorziening vragen bij de voorzieningenrechter van de rechtbank in de vestigingsplaats van de vergunninghouder. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisende situatie.

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

**Meer informatie**

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

**Datum:**

1 augustus 2022

**Aanvraagnummer:**AVD **5.1 lid2h** 202215811

Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:

i.o.

**5.1 lid2h**

drs. F. Braunstahl  
Algemeen Secretaris

**Bijlagen:**

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



# Projectvergunning

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

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam:

Adres:

Postcode en plaats:

Deelnemersnummer:

5.1 lid2h

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 augustus 2022 tot en met 28 februari 2027, voor het project "De rol van het immuun checkpoint eiwit CD40 in hemofagocytaire lymfocytose " met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202215811, na advies van 5.1 lid2h . De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is 5.1 lid2e Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 28 januari 2022
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 7 juni 2022;
  - b Bijlagen dierproeven
    - 3.4.3.1 Muizenmodel voor Hemofagocytaire Lymfocytose , zoals ontvangen op 29 juni 2022;
  - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 29 juni 2022;
  - d Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 8 juni 2022
  - e De aanvullingen op uw aanvraag, zoals ontvangen op 29 juni 2022, 28 juli 2022.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief
<b>3.4.3.1 Muizenmodel voor Hemofagocytaire Lymfocytose</b>			
	Muizen (Mus musculus) / WT & GGO	1.222	93,3% Ernstig 6,7% Licht

### 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 februari 2028 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

#### Aanvullende voorwaarde

U dient de uitkomsten van de pilot-onderzoeken, waarbij het ongerief voor het voorgestelde diersmodel zal worden onderzocht en ingekaderd, te rapporteren aan de CCD. In deze terugkoppeling dient te worden ingegaan op de mate van ongerief die de dieren ondervinden en of de humane eindpunten zullen worden aangepast in de beschreven vervolggexperimenten van het voorgestelde project.

Na terugkoppeling van de resultaten van de pilot-onderzoeken zal door de CCD op basis van de nieuwe



**Aanvraagnummer:** AVD<sup>5.1 lid2h</sup> 202215811

verkregen informatie een schade/baten analyse worden gemaakt om te beoordelen of het vervolgonderzoek binnen het voorgestelde project mag worden uitgevoerd.

### **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:**

AVD<sup>5.1 lid2n</sup> 202215811

## 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:**AVD **5.1 lid 2f** 202215811

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.

**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.

## 10a2 derde lid

Wanneer op grond van artikel 10a1, eerste en derde lid, is besloten dat het project achteraf wordt beoordeeld, beoordeelt de centrale commissie dierproeven na advies van de dierexperimentencommissie die eerder advies heeft gegeven over het projectvoorstel, aan de hand van de door de gebruiker ingediende documentatie die de centrale commissie dierproeven heeft aangegeven, de volgende aspecten:

- of de doelstellingen van het project werden bereikt;
- de schade die de dieren hebben ondervonden, met inbegrip van de gebruikte aantallen en soorten proefdieren en de ernst van de dierproeven; en
- eventuele elementen die kunnen bijdragen tot het verder in praktijk brengen van artikel 10.

---

**Van:** info@zbo-ccd.nl  
**Verzonden:** maandag 22 augustus 2022 13:53  
**Aan:** 5.1 lid2h  
**Onderwerp:** Terugkoppeling over projectvergunningsaanvraag AVD 5.1 lid2h 202215811

Geachte 5.1 lid2h,

Op 28-01-2022 hebben wij een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het gaat om het project 'De rol van het immuun checkpoint eiwit CD40 in hemofagocytair lymfocytose' met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202215811.

De CCD heeft de aanvrager aanvullende vragen gesteld. De aanvullingen hadden betrekking op het benoemen van de individuele huisvesting en tekstuele onduidelijkheden in de NTS en het beschrijven van de translationele waarde van het diermodel in zowel de NTS als de bijlage dierproeven.

De CCD heeft besloten de vergunning toe te wijzen. De aanvrager en verantwoordelijk onderzoeker zijn hierover ingelicht. De beschikking is verstuurd op 1-8-2022.

De vergunning wordt verleend onder de volgende voorwaarden:

Na afloop van het project zal er een beoordeling plaatsvinden, zoals bedoeld in artikel 10a1 lid 1 sub d en artikel 10a1 lid 3 van de wet. De reden van deze beoordeling achteraf is dat in dit project dieren ernstig ongerief ondergaan.

U dient de uitkomsten van de pilot-onderzoeken, waarbij het ongerief voor het voorgestelde diermodel zal worden onderzocht en ingekaderd, te rapporteren aan de CCD. In deze terugkoppeling dient te worden ingegaan op de mate van ongerief die de dieren ondervinden en of de humane eindpunten zullen worden aangepast in de beschreven vervollexperimenten van het voorgestelde project.

Na terugkoppeling van de resultaten van de pilot-onderzoeken zal door de CCD op basis van de nieuwe verkregen informatie een schade/baten analyse worden gemaakt om te beoordelen of het vervolgonderzoek binnen het voorgestelde project mag worden uitgevoerd.

Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het DEC advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld. Bij de beantwoording van de beoordelvragen verstrekt u een heldere onderbouwing. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen.

In C1 van uw advies verwijst u naar een voorbeeld uit de Handreiking Invulling definitie project. Hierbij verwijst u naar een verouderde nummering. Kunt u bij toekomstige adviezen de meest recente versie aanhouden, die is gepubliceerd op de website van de CCD?

De dieren zullen niet in alle gevallen adequate pijnbestrijding ontvangen, waar dit wel gewenst kan zijn. De CCD had de visie van de DEC hierop graag teruggezien onder C9 van uw advies.

De CCD waardeert de wijze waarop de DEC helder inzichtelijk heeft gemaakt waarom het advies met een meerderheidsstandpunt tot stand is gekomen, en de goed navolgbare onderbouwing waarom één DEC lid het positieve advies niet deelde.

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

Met vriendelijke groet,  
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

5.1 lid2e

[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

.....  
T: 0800 789 0789

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