

Inventaris Wob-verzoek W23-03		wordt verstrekt				weigeringsgronden				
nr.	document NTS 20209584	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. 19-03-2020				x		x		x	
2	Aanvraag projectvergunning, d.d. 19-03-2020				x		x		x	
3	Projectvoorstel bij aanvraag				x	x	x		x	
4	Bijlage dierproeven 1 bij aanvraag				x	x	x		x	
5	Bijlage dierproeven 2 bij aanvraag				x	x	x		x	
6	NTS bij de aanvraag			x						
7	E-mail aan DEC om advies aanvraag projectvergunning, d.d. 22-08-2022				x				x	
8	DEC-advies, d.d. 27-05-2021				x	x	x		x	
9	Projectvoorstel na DEC advies				x	x	x		x	
10	Bijlage 1 dierproeven na DEC advies				x	x	x		x	
11	Bijlage 2 dierproeven na DEC advies				x	x	x		x	
12	NTS na DEC advies			x						
13	Adviesnota aan CCD, d.d. 03-06-2021 met opmerkingen				x	x	x		x	x
14	Adviesnota aan CCD, d.d. 09-06-2021				x	x	x		x	x
15	E-mail CCD aan vergunninghouder over aanvraag, d.d. 09-06-2021				x		x		x	
16	Reactie na vragen CCD				x	x	x		x	
17	Projectvoorstel na CCD vragen				x	x	x		x	
18	Bijlage 1 dierproeven na CCD vragen				x	x	x		x	
19	Bijlage 2 dierproeven na CCD vragen				x	x	x		x	
20	NTS na CCD vragen en definitieve versie			x						
21	Adviesnota aan CCD, d.d. 29-06-2021				x	x	x		x	x
22	E-mail tussen CCD en DEC over aanvraag, d.d. 29-6-2021				x		x		x	
23	Reactie DEC op vraag CCD, d.d. 14-7-2021				x	x	x		x	
24	Aanvullende AdviesNota CCD 20-08-2021			x						
25	Beschikking, d.d. 26-8-2021				x		x		x	
26	E-mail CCD aan DEC over aanvraag projectvergunning, d.d. 24-08-2021				x		x		x	

9584



31 MRT 2020

Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 5.1 lid2h
		<input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie 5.1 lid2h
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde 5.1 lid2e
		KvK-nummer 5.1 lid2h
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	Straat en huisnummer 5.1 lid2h
		Postbus 5.1 lid2h
		Postcode en plaats 5.1 lid2h
		IBAN 5.1 lid2h
		Tenaamstelling van het rekeningnummer 5.1 lid2e
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters 5.1 lid2e <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie 5.1 lid2e
		Afdeling 5.1 lid2h
		Telefoonnummer 5.1 lid2e
		E-mailadres 5.1 lid2e
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie
		Afdeling
		Telefoonnummer
		E-mailadres

1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.	(Titel) Naam en voorletters	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
	Functie	
	Afdeling	
	Telefoonnummer	
	E-mailadres	5.1 lid2h
1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?	<input type="checkbox"/> Ja > Stuur dan het Ingevulde formulier Melding Machtiging mee met deze aanvraag	
	<input checked="" type="checkbox"/> Nee	

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?	Startdatum	27 - 4 - 2020
	Einddatum	26 - 4 - 2025
3.2 Wat is de titel van het project?	Mous models of cutaneous lymphomas; from pathogenesis to therapeutic intervention	
3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Muismodellen voor huidlymfomen; van ontstaan naar therapie	
3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?	Naam DEC	
	Postadres	5.1 lid2h
	E-mailadres	

4 Betaalgegevens

31 MRT 2020

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1662 Lege
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
 Via een eenmalige incasso
 Na ontvangst van de factuur
- Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*

5 Checklist bijlagen

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

6 Ondertekening

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

Centrale Commissie
 Dierproeven
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag

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

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

Naam	5.1 lid2e
Functie	Gemandateerd vergunninghouder
Plaats	5.1 lid2h
Datum	19-3-20
Handtekening	5.1 lid2e



Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 5.1 lid2h <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie 5.1 lid2h Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde 5.1 lid2e KvK-nummer 5.1 lid2h
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	Straat en huisnummer 5.1 lid2h Postbus 5.1 lid2h Postcode en plaats 5.1 lid2h IBAN 5.1 lid2h Tenaamstelling van het rekeningnummer 5.1 lid2h
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters 5.1 lid2e <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. Functie 5.1 lid2e Afdeling 5.1 lid2h Telefoonnummer 5.1 lid2e E-mailadres 5.1 lid2e
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. Functie Afdeling Telefoonnummer E-mailadres

- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.
- | | | |
|-----------------------------|-----------|--|
| (Titel) Naam en voorletters | | <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
| Functie | | |
| Afdeling | | |
| Telefoonnummer | | |
| E-mailadres | 5.1 lid2h | |
- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?
- Ja > Stuur dan het ingevulde formulier *Melding Machtiging* mee met deze aanvraag
- Nee

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- | | |
|------------|---------------|
| Startdatum | 27 - 4 - 2020 |
| Einddatum | 26 - 4 - 2025 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Mous modellen of cutaneous lymphomas; from pathogenesis to therapeutic intervention
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Muismodellen voor huidlymfomen; Van ontstaan naar therapie
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|-----------|
| Naam DEC | 5.1 lid2h |
| Postadres | 5.1 lid2h |
| E-mailadres | 5.1 lid2h |

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1662 Lege
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.
- Via een eenmalige incasso
 Na ontvangst van de factuur

5 Checklist bijlagen

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

6 Ondertekening

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

Centrale Commissie
 Dierproeven
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag

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

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

Naam	5.1 lid2e
Functie	Gemandateerd vergunninghouder
Plaats	5.1 lid2h
Datum	19-3-20
Handtekening	5.1 lid2e



Form Project proposal

- This form should be used to write the project proposal for animal procedures.
- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed.
- For more information on the project proposal, see our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 5.1 lid2h
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. 5.1 lid2h
- 1.3 Provide the title of the project. Mouse models of cutaneous lymphomas; from pathogenesis to therapeutic intervention

2 Categories

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

3 General description of the project

3.1 Background

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

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

Cutaneous lymphomas are cancers of lymphocytes that primarily involve the skin. Each year about 160 new cases are diagnosed in the Netherlands. Once it was recognized that primary cutaneous lymphomas, i.e. malignant lymphomas presenting in the skin without concurrent extracutaneous disease, have a

completely different clinical behavior and prognosis than histologically similar systemic lymphomas involving the skin secondarily, different types of treatment were initiated. In the last two decades several new types of primary cutaneous T-cell lymphomas (CTCL) and primary cutaneous B-cell lymphomas (CBCL) in connection with appropriate aggressiveness in therapy were described. Correct diagnosis and prognosis are of utmost importance for adequate treatment, i.e. aggressive treatment where needed and avoiding overtreatment of relatively benign lesions needlessly burdening the patient (very different from systemic lymphomas). Clinical studies and formalizing diagnostic criteria [Willemze et al., 2019] by the European Organisation of Research and Treatment of Cancer (EORTC) contributed greatly. We are now pursuing further refinement by objective molecular criteria.

Cutaneous lymphomas can either be derived of T-lymphocytes (T-cell), B-lymphocytes (B-cell) or plasmacytoid dendritic cells. Cutaneous T-cell lymphoma (CTCL) is the most common type of cutaneous lymphoma, and typically in early stages presents with red, scaly patches or plaques on the skin (Fig. 1).

5.1 lid1c

Fig 1. Different stages of tumor development in cutaneous T-cell lymphoma. On top clinical representation, below cartoons schematically describing the change in malignant vs non-malignant cells during progression (Adapted from (Krejsgaard et al, 2017)).

CTCL often mimics eczema, psoriasis, or another chronic dermatitis (Fig. 2), causing substantial delays in proper diagnosis and adequate treatment, sometimes by years or even decades when the tumor may still suddenly progress to a fatal stage.

5.1 lid1c

5.1 lid1c

Of the CTCL patients under treatment a minority develops advanced disease, with tumor formation, ulceration and spreading into lymph nodes, blood, and internal organs. Cutaneous B-cell lymphomas (CBCL) make up about 20-25% of all cutaneous lymphomas, and are cancers that develop from skin-residing B-cells. Systemic or nodal lymphomas can secondarily involve the skin, and when a skin biopsy shows a lymphoma it is very important to make sure that it truly originates from the skin and not from a systemic lymphoma that has spread to the skin. Blastic plasmacytoid dendritic cells neoplasm (BPDCN, formerly known as Blastic NK/T cell lymphoma) is a clinically aggressive hematologic malignancy that most commonly manifests as cutaneous lesions with or without bone marrow involvement and leukemic dissemination. 5.1 lid2h, 5.1 lid2e

Detailed genomic analyses (using next generation sequencing) of skin biopsies and/or blood (in case of leukemic CTCL variants) from large cohorts of well-defined CTCL, CBCL and BPDCN patients revealed several candidate genes possibly involved in genesis of these tumors and/or potential targets for therapy

5.1 lid2h, 5.1 lid2e

For CTCL, these studies showed activation of several oncogenic pathways, most prominently and consistently involving JAK/STAT signaling. However, the precise genetic alterations driving these oncogenic pathways, the genetic 'drivers', remained obscure. 5.1 lid2h, 5.1 lid1c

As primary cutaneous lymphoma cells are extremely difficult to culture in vitro, most likely because a proper micro-environment is lacking, we have to resort to mouse models to study the impact of these deleted genes. 5.1 lid1c

An inflamed skin with malignant cells intermixed is typical of a cutaneous lymphoma. It is suspected that chronic inflammation, e.g. from allergies, precedes and gives rise to the malignant cell clone which then takes the upper hand as the tumor progresses (Fig. 1) (Lindahl et al. (2019); Fanok et al., 2017). Importantly, inflammation may not only combat the tumor but may actually promote its development. In the proposed mouse models we will experimentally explore the possible pathogenic mechanism by which inflammation enhances the development of cutaneous lymphomas.

In sum, in this project we aim to elaborate on the genetic findings and create in vivo mouse models permitting the necessary next steps in dissecting the precise role(s) of these genes in the genesis of cutaneous lymphoma entities and the development of valid experimental models for (targeted) therapy. In this perspective mouse models can be instrumental in establishing that recurring genetic alterations in the genomes of cutaneous lymphomas and chronic inflammation are indeed tumor drivers and that targeting these alterations may actually cause regression of the tumor (a potential treatment).

5.1 lid2e, 5.1 lid2h

5.1 lid2e, 5.1 lid2h

5.1 lid2e, 5.1 lid2h

5.1 lid2e, 5.1 lid2h

5.1 lid2e, 5.1 lid2h

5.1 lid2e, 5.1 lid2h

5.1 lid2e, 5.1 lid2h

3.2 Purpose

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

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

The overall aim of the project is to understand the function of crucial (early) tumor drivers of cutaneous lymphoma subtypes.

This knowledge may lead to targeted therapies that can efficiently cure patients or prevent progression to malignant stages. To enable an extensive experimental approach to optimize such interventions we aim to develop credible mouse models representing cutaneous lymphoma entities. Here, this overarching aim is broken down into sub-goals which can be addressed by mouse experiments:

5.1 lid1c

5.1 lid1c

5.1 lid2e, 5.1 lid2h

3.3 Relevance

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

The scientific relevance lies in determining the main signal pathways that prove to cause cutaneous lymphoma in the mouse models and establish clear parallels with what is observed in patients. Moreover, successful experimental intervention by a targeted drug to silence a specific pathway adds to prove the pivotal role of this signaling pathway. [5.1 lid1c](#)

In relation to clinical practice and derived social relevance, well-demarcated molecular diagnosis is important for proper prognosis and for properly matched therapies. Such diagnosis is currently attained

by systematic clinical and immune-histological analyses. This project aims to establish more reliable refined diagnostic and prognostic molecular markers that will better identify patients at risk of a detrimental disease course. Accordingly, such markers will also guide development of novel therapeutic approaches that will further improve treatment of these patients. [5.1 lid2h](#)

3.4 Research strategy

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

The structure of the project is shown in the flow diagram below (Fig. 3), where the different mouse-experimental protocols are dealt with in the stated numbered appendices and refer back to sub-goals in section 3.2:

appendix 1 corresponds with sub-goal b) and starts with GEM (Genetically Engineered Mouse) strains to

5.1 lid1c

5.1 lid1c

Fig. 3. Flowchart to outline the structure of the project. See text for explanation.

There are two arms in the project: [5.1 lid1c](#)

5.1 lid1c

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

This project encompasses three main parts, following sub-goals stated under section 3.2, where the first is covered by a separate generic CCD-permit:

5.1 lid1c

For both the transgenic and the PDX models, tumor development will be scored macroscopically, by number of focal lesions and extent by measuring tumor diameters (and height if pronounced enough) as well as proper classification based on histopathological analysis of biopsies. In addition blood samples will be screened for leukemic dissemination. After the experiments internal organs of sacrificed animals will be analyzed for metastasis.

References

Horii T, Morita S, Kimura S, Terawaki N, Shibutani M & Hatada I. Efficient generation of conditional knockout mice via sequential introduction of lox sites. *Scientific Reports* volume 7, Article number: 7891 (2017)

Miura H, Quadros RM, Gurumurthy CB & Ohtsuka M. Easi-CRISPR for creating knock-in and conditional knockout mouse models using long ssDNA donors. *Nature Protocols* volume 13, pages 195–215 (2018)

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

The components of the program all serve the aim to validate (early) drivers and markers **5.1 lid1c**

[Redacted content]

5.1 lid1c

5.1 lid1c, 5.1 lid2h

- 2) Experiments with xenotransplants of human cutaneous lymphomas into immune-compromised mice (PDX) will serve as a model for efficient short term evaluation of therapeutic efficacy of a (novel) drug on progressed human cutaneous lymphomas; possible even for testing on individual basis on clinical demand – i.e. very much precision medicine. Patient derived xenografts followed by targeted treatment. We will start with CTCL (Sezary or mycosis fungoides) cells and biopsies isolated from patients. In case mice display a CTCL phenotype targeted treatment will be initiated.

Go/no go decisions:

Lead in to Appendix1, sub-goal a:

Generation of novel GEM > Check alteration in genome (PCR) – Y/N? continue/stop
We will test to a max of 7 Driver/suppressor genes

Appendix 1/sub-goal b:

> check alteration in target cells (ex vivo > in vivo by PCR and FACS) –Y/N? continue/stop >
Check phenotype (inflammation, persistent and aggravated, followed by oncogenic transformation)* – Y/N? continue/stop>

Appendix 1/sub-goal d:

> select potential drug(s)> available Y/N? continue/stop > test selected available drug(s) in mouse model

* GEMMs: After confirmation of the functionality of the constructs we will optimize dose and time schedules, if needed. Only the most promising genes, yielding true skin lymphoma entities (as judged from genetic and immunohistochemical analyses), will receive a go and then be tested in vivo for treatment modalities (sub-goal d). Through this tiered procedure we aim to use the mice as efficiently as possible and to reduce the number of mice. Most treatment strategies have already been optimized for humans. As a result, the dosage, timing and administration routes of the treatment strategies can be calculated/adapted for mice.

References:

Knittel G, Liedgens P, Korovkina D, Seeger JM, Al-Baldawi Y, Al-Maarri M, Fritz C, Vlantis K, Bezhanova S, Scheel AH, Wolz OO, Reimann M, Möller P, López C, Schlesner M, Lohneis P, Weber AN, Trümper L; German International Cancer Genome Consortium Molecular Mechanisms in Malignant Lymphoma by Sequencing Project Consortium, Staudt LM, Ortman M, Pasparakis M, Siebert R, Schmitt CA, Klatt AR, Wunderlich FT, Schäfer SC, Persigehl T, Montesinos-Rongen M, Odenthal M, Büttner R, Frenzel LP, Kashkar H, Reinhardt HC. B-cell-specific conditional expression of Myd88p.L252P leads to the development of diffuse large B-cell lymphoma in mice. *Blood*. 2016 Jun 2;127(22):2732-41.

Fanok MH, Sun A, Fogli LK, Narendran V, Eckstein M, Kannan K, Dolgalev I, Lazaris C, Heguy A, Laird ME, Sun drud MS, Liu C, Kutok J, Lacruz RS, Latkowski JA, Aifantis I, Ødum N, Hymes KB, Goel S, Koralov SB. Role of Dysregulated Cytokine Signaling and Bacterial Triggers in the Pathogenesis of Cutaneous T-Cell Lymphoma. *J Invest Dermatol*. 2018 May;138(5):1116-1125.

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

Serial number	Type of animal procedure
1	Testing of GEMMs: Induction, progression and targeted treatment of skin lymphomas
2	Patient derived xenografts followed by targeted treatment
3	
4	
5	
6	

7	
8	
9	
10	



Appendix Description animal procedures

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

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.

5.1 lid2h

1.2 Provide the name of the licenced establishment.

5.1 lid2h

1.3 List the serial number and type of animal procedure.

Serial number

Type of animal procedure

1

Testing of GEMMs: Induction, progression and targeted treatment of skin lymphomas

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

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

5.1 lid1c

5.1 lid1c

5.1 lid1c

5.1 lid1c

Go/no go: Go – with similarities to the human disease (macroscopically, cancer genomics) proceed to test treatment modalities, No go: if no similarities are observed.

5.1 lid1c

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

5.1 lid1c

5.1 lid1c

5.1 lid1c

5.1 lid1c

Bioluminescence imaging

When in particular experiments the growth of tumors (and their possible metastases) can be measured by means of bioluminescence imaging (BLI; e.g. tumor cells from adoptive transfer expressing luciferase) this will be done 1-2 times a week. The advantage of BLI is that tumor growth and metastases can both be identified and quantified in intact animals. Very low amounts of cells can be detected due to the sensitivity of BLI. To this end, the mice are measured after injection of luciferin (via intraperitoneal, subcutaneous or intravenous injection, maximum volume 200 µl) under inhalation anesthesia (see also van der Horst et al., 2018).

Treatment modalities (final stage, application of transgenic mouse models):

We will start with the most common and clinically relevant (first line) treatments for each specific lymphoma entity being [5.1 lid1c](#)

Treatment of the tumor by one or more of the following treatment strategies (maximum 20 injections over 7 – 10 weeks in total per mouse):

1. Cancer-specific therapies

5.1 lid 1 c

Administer immune-modulating substances such as cytokines (such as GM-CSF, IL-2, TGFb pathway antagonists, anti-fibrotics) or Toll-like receptor ligands
-Via intraperitoneal or intravenous injection (maximum 8 times, maximum 200 microliters per injection)
-Via intratumoral injection (maximum 3 times, maximum 50 microliters per injection)

End of the experiment:

After reaching the experimental end point or a treatment duration determined in advance for each experiment, the animals will be killed by standard method according to Annex IV EU Directive 2010/63 with minimal discomfort.

Sample for analysis:

- blood collection via tail vein (volume and frequency according to guidelines Diehl et al., 2001) or under terminal anesthesia (orbital puncture or heart puncture).
-euthanasia by means of an authorized method according to Annex IV EU directive 2010/63 followed by removal of tumor and tissues for analysis in the laboratory.

Bioluminescence imaging

As described above.~

5.1 lid2e, 5.1 lid2h

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

We will make a distinction between experiments with different outcome parameters.

Tumor induction: We are primarily interested in two main end points upon 5.1 lid1c
[Redacted]
[Redacted]
[Redacted]
[Redacted]

Unfortunately, there is no precedent to guide us on this animal model for 5.1 lid1c [Redacted]. Hence, we will first need to perform pilot experiments with modest numbers of animals, i.e. n = 5 per group. Next, we can decide on proper mouse numbers and endpoints (e.g. scoring the time laps or number of skin applications required to get to the intended endpoint). If required we can scale up the

experiment according to a proper power analysis of the acquired pilot data. In broad outline, we aim to attain both a statistically and biologically significant endpoint, i.e. also with an evident and potentially clinically relevant difference between control and test groups.

We aim to have differences of at least 2 SD (standard deviations) between group means (either or not logarithmically transformed to have proper normal distributions in the endpoints). With a required significance of $p < 0.05$ and a power of at least 0.8 we will calculate group size with the standard formula (i.e. $n = 2((Z_{\alpha/2} - Z_{\beta})/2)^2$, with $Z_{\alpha/2} = 1.96$ and $Z_{\beta} = -0.84$). We will use two-tailed Student's t-test to determine if two sets of normally distributed data are significantly different from each other (or one-way ANOVA in comparing multiple groups). Log-rank test will be performed for survival and time to progression curves. For all studies, $P < 0.05$ will be considered significant.

Tumor progression analysis: Evolution and progression of tumors will be studied by analysis of tumors generated under standardized conditions based on previous experiments. We aim to analyze in depth (by genetics, expression profiles, morphology etc.) representative samples of 7 early stage, 7 moderate and 7 late stage tumors for each transgenic mouse model.

Tumor treatment: A distinction is made between experiments with the outcome parameter (1) analysis of parameters via sampling, whereby the means between groups is compared by t-test, ANOVA or non-parametric test and (2) effectiveness by means of Kaplan-Meier survival analysis (% vs time).

For each experiment and outcome parameter, the minimum number of animals needed to achieve a statistically meaningful result between the main test groups will be calculated. The necessary information about the spread and the expected treatment effect is extrapolated from a pilot experiment or previous comparable experiments or from literature. An average experiment will contain 3-6 different groups (eg untreated, treatment A, treatment B, treatment C, treatment A + B + C). An experiment with as outcome parameter (1) analysis of parameters via sampling will contain 3-7 animals per group, assuming a relative effect of at least 150% to be demonstrated, a spread of 10-50% depending on the chosen tumor model, a unreliability threshold of 5% and a power of 80%. An experiment with outcome parameter (2) effectiveness will contain 6-11 mice per group, depending on the expected hazard ratio (between 0.20 and 0.30), with an alpha of 0.05 and a power of 80%. Power calculations for individual experiments will be based on latest information from literature or own experiments on variation and discussed with IvD and bio-statistician.

Fanok MH, Sun A, Fogli LK, Narendran V, Eckstein M, Kannan K, Dolgalev I, Lazaris C, Heguy A, Laird ME, Sundrud MS, Liu C, Kutok J, Lacruz RS, Latkowski JA, Aifantis I, Ødum N, Hymes KB, Goel S, Koralov SB. Role of Dysregulated Cytokine Signaling and Bacterial Triggers in the Pathogenesis of Cutaneous T-Cell Lymphoma. *J Invest Dermatol.* 2018 May;138(5):1116-1125.

B. The animals

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

Mice will be used originating from own breeding facility or obtained from a reputable supplier or institute. The mice will have an age of 6 - 20 weeks at the start of the experiment; preferably age-matched within 4 weeks for each experiment, and but no more than ~~±~~ 10 weeks age differences. Both males and females can be used initially, but depending on the type of tumors and the rate at which they will develop, a preference for either male or female might emerge.

We aim to target approximately 10 genes of interest in generating transgenic models (5.1 lid1c

First of all, we want to test whether anticipated tumors can indeed be induced and if so, analyse different stages of progression. In the final stage we want to test about typically 4 different treatment strategies per model.

Initially, an average (first pilot) experiment will contain 3-5 mice per gene of interest.

A (pilot) experiment will contain 5 groups (see figure above in section A) with a maximum of 7 animals per group, ie a maximum of 35 animals per experiment. With 10-GEMMs we arrive at 350 mice. In repeating experiments (on average 2 times for each model) for optimization, possible expansion of group

size (on average n =12) and closer study of tumor progression with further sampling, we get an additional 1200 mice.

For the final stage, an average experiment for each model will contain 6 groups (5 treatment options + control) with a maximum of 12 animals per group, ie a maximum of 72 animals per experiment. We envisage 3 modes of delivery (topical – mild discomfort - , injection, cell transfer/antibody – moderate discomfort). We will have 10 tumor models representing different skin lymphoma. Maximum animals required for this is 72 x 10 x 3 = 2160 animals. This brings us to a total of 3710 mice.

Although some of the treatment regimens to raise the tumors (5.1 lid2h) may be mild in discomfort, whereas generating and having outgrowing tumors treated will most likely cause moderate discomfort. This leads us to conclude that all mice subjected to the protocols discussed in this Appendix will sustain mild to moderate discomfort.

	group size	# of groups	# of models	'repeat' x	Sub total	discomfort
Initially, pilot	7	5	10	0	350	mild
Follow-up	12	5	10	1	1200	mild
Treatment	12	6	10	2*	2160	moderate
Total # mice					3710	

*different treatments

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement: Primary cutaneous lymphoma cells are extremely difficult to culture in vitro, most likely because a proper environment is lacking. We are currently developing techniques 5.1 lid1c

The effects are expected to be different in an intact body due to, among other things, the interaction with the tumor environment and stroma, induction of a systemic immune response and the spread in vivo. The effectiveness of certain (combination) therapies that depend on a systemic immune response should be tested in an intact organism and cannot be replaced.

Reduction: To reduce the number of animals, we will test and optimise combinations of treatments using the few available cell lines. Although these cell lines can give a good indication of interesting combinations, unfortunately not all questions can be answered with these models. We deploy a step-wise approach in the project on different levels to minimize the number of mice. Candidate genes and resulting constructs are first tested in vitro. Moreover, for each model we will start with optimization of dose and time. Only the most promising genes, best representing the skin lymphoma entities, will then be tested in vivo for treatment modalities (final stage). Through these steps we aim to use the mice as efficiently as possible and to reduce the number of mice. Deploying standard therapies in the GEMMs for reference, also provides a reference for minimal required effect levels – i.e. new therapies should prove superior - and corresponding group sizes. Using statistical calculations, the number of animals in these experiments will be kept to a minimum.

Refinement: ~~Since~~ The first signs of cutaneous lymphoma development can be seen in the skin at an early stage of tumor development. Thus, the experimental endpoint of the majority of experiments is well ahead of achieving the maximum cumulative tumor burden of 1000mm³ mentioned in the code of practice animal tests in cancer research, which greatly reduces the level of discomfort. Moreover, the blood of these animals will be screened for systemic dissemination.

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

The experiments will be carried out by experienced, well-trained and qualified personnel. The animals are accurately monitored and reported in welfare diary. Pain relief methods are applied where and when necessary. In case intra-tumoral injections are used for treatment, this will be done under anesthesia, according to the applicable Standard Operating Procedures (SOPs).

In order to prevent adverse effects on the pathogen status of the lab, all reagents and cells that go into the mouse are screened. All biological material is disposed of via regulated procedures.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Anesthesia is used during intra-tumor injections and in case bioluminescence imaging will be used to track metastases, according to the applicable Standard Operating Procedures (SOPs).

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Itch

Explain why these effects may emerge.

Skin inflammation might cause itch

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

Every effort is made to prevent complications, including through the deployment of experienced staff and working with standard protocols. In addition, the mice are closely monitored during the first 4-6 hours and again 24 hours after anesthesia. Should a complication arise, the animal is immediately taken out of the experiment / killed.

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

Human endpoints:

General: We adhere to the human endpoints as described in the "code of practice animal experiments in cancer research" (20% weight loss, apathy, moribund and, typical for our type of experiments, severe scratching/wounding or overly agitated upon touching treated skin). In the rare event (< 1%) that one of the human endpoints is reached, e.g. because of an 'explosive' tumor growth/dissemination, the animal will be immediately taken out of the experiment and killed in accordance with Annex IV of the 2010/63 / EU directive. It will also be critically examined (based on the available information from all laboratory animals within the experiment) whether the entire experiment should ~~not~~ be stopped or not.

The human endpoints differ per model.

The following human endpoints apply to developing and early (sub)cutaneous tumors:

- achieve maximum cumulative tumor size measured in 3 dimensions of 1000 mm³, or in 2 dimensions occupying 300 mm² of skin area.
- severe skin irritation
- achieving a body condition score of 2 or lower (according to Ullman-Culleré and Foltz, 1999)

For the advanced, late stage models and treatment thereof the following human end points also apply:

- Combination of several factors including the total tumor burden measured with bioluminescence (maximum intensity reached), the course of the mouse weight and the well-being / behavior and the locomotion of the mice, the body condition score (according to Ullman-Culleré and Foltz, 1999).
- The limit is in any case at: The animal loses more than 15% of the body weight in a relatively short time (1-2 days) or the body weight has decreased by more than 20% compared to the own weight at the start of the test, or a body condition score of 2 or lower.

Ullman-Culleré MH, Foltz CJ. Body condition scoring: a rapid and accurate method for assessing health status in mice. Lab Anim Sci. 1999 Jun;49(3):319-23.

Indicate the likely incidence.

5 resp 10%

K. Classification of severity of procedures

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

mild (max. 1550 animals) in raising the tumors, 4 and moderate in carrying and treating tumors (max. 2160 animals); see table in section B

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

In order not to cause the tumor burden to become too large and for the removal of organs or samples, it is essential to kill the animals.

After reaching the experimental end point, or treatment duration determined in advance for each experiment, the animals are killed via the usual euthanasia method according to Annex IV EU Directive 2010/63 with minimal discomfort.

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

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

Yes



Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.

5.1 lid2h

1.2 Provide the name of the licenced establishment.

5.1 lid2h

1.3 List the serial number and type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
2	Patient Derived Xenograft (PDX) models

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

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

5.1 lid1c

- Analysis of immune and treatment parameters: Molecular, cell biological, immunohistochemical and chemical determinations on the blood, tumor and tissue samples obtained.

Michael A. Brehm, Nathalie Jouvét, Dale L. Greiner, and Leonard D. Shultz
Humanized Mice for the Study of Infectious Diseases. *Curr Opin Immunol.* 2013 Aug; 25(4): 428–435.

5.1 lid2e, 5.1 lid2h

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

Tumor inoculation

1. Orthotopic inoculation (cells or biopsies)

This will be achieved via subcutaneous injection of isolated human tumor cells or (sub)cutaneous implantation of a tumor biopsy / spheroid / organoid by means of a small incision, under full inhalation anesthesia, after which the wound is sutured. Peri-operative analgesia is used.

-Optional, injection of cells or implantation of second tumor in another flank

-Regularly, at least once a week, if there is reason to do so, a maximum of three times a week, the tumor burden will be determined by caliper measurement. The cumulative tumor burden never exceeds 1000 mm³. If the tumor cells express luciferase, the tumor burden is also determined by means of bioluminescence imaging.

2. Intravenous/intrahepatic inoculation

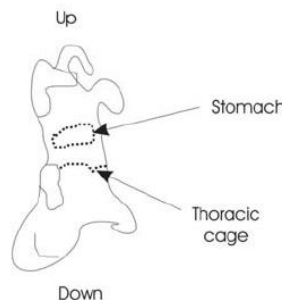
Intravenous/intrahepatic inoculation is a translational disease model that is comparable to the clinical situation of leukemic variants of CTCL. This disease model provides, among other things, spontaneous metastasis to lymph nodes, which is a clinical sign of progression.

Tumor cells will be injected via the intrahepatic route (Pearson et al., 2008; 5.1 lid2e, 5.1 lid2h) or intravenously under full inhalation anaesthesia.

A)



B)



Intrahepatic inoculation of human lymphocytes cells in newborn mice. (A) The newborn animals are maintained upside down between two fingers. Using an insulin syringe, the cell mixture is injected in the liver (dark red), between the stomach (white), and the thoracic cage. (B) Schematic positions of the stomach and thoracic cage are indicated.

Bioluminescence imaging

During the experiments the growth of tumors expressing luciferase (and their possible metastases) is measured 1-2 times a week by means of the bioluminescence imaging (BLI) technique (max 26 weeks). The advantage of BLI is that tumor growth and metastases can both be identified and quantified in intact animals. Very low amounts of cells can be detected due to the sensitivity of BLI. To this end, the mice are measured after injection of luciferin (via intraperitoneal, subcutaneous or intravenous injection, maximum volume 200 µl) under isoflurane inhalation anesthesia (see also van der Horst et al., 2018).

Addition of human immune cells (if applicable)

- Intravenous injection of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in animals aged 8-16 weeks or
- Intravenous injection of tumor-specific T cells in animals aged 8-16 weeks or

- Intravenous injection of hematopoietic stem cells into mice 3 weeks old, 4 hours after irradiation with 140 cGy (Wang, M. et al. 2018).

Treatment of the tumor by one or more of the following treatment strategies (maximum 20 injections in total per mouse):

1. Cancer-specific therapies

Administration of chemotherapy (i.e. via the following routes:

- Via subcutaneous injection (maximum 3 times, maximum 200 microliters per injection)
- Via intraperitoneal injection (maximum 3 times, maximum 200 microliters per injection)
- Via intravenous injection (maximum 3 times, maximum 200 microliters per injection)

Topical application (e.g. Valchlor, small molecule inhibitors, cucurbitacins).

- under anesthesia with injectable anesthetic, when applying cream or mild anesthesia (full inhalation with isoflurane) when organic solvents (in which the medication is formulated) is used. Injection anesthetic is used because cream must be withdrawn for several hours and may not be licked. The mice are kept warm on heat mats during this period (2 to 3 hours). Max of 3 times/week over a period of max 26 weeks. [5.1 lid1c](#)

5.1 lid1c

5.1 lid 1 c

Sample for analysis:

- blood collection via tail vein puncture (volume and frequency according to guidelines Diehl et al., 2001) or under terminal anesthesia (orbital puncture or heart puncture).
- euthanasia by means of an authorized euthanasia method according to Annex IV EU directive 2010/63 followed by removal of tumor and tissues for analysis in the laboratory.

Diehl KH, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal JM, van de Vorstenbosch C; A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *J Appl Toxicol.* 2001 Jan-Feb;21(1):15-23.

Pearson T, Greiner DL, and Shultz LD. Creation of "Humanized" Mice to Study Human Immunity. In *Current protocols in Immunology* ;Chapter 15:Unit 15.21 (2008)

van der Horst G, van der Mark M, Cheung H, van der Pluijm G. Transplantable Animal Studies and Whole-Body Optical Imaging in Prostate Carcinoma. *Methods Mol Biol.* 2018;1786:81-102.

Wang M, Yao LC, Cheng M, Cai D, Martinek J, Pan CX, Shi W, Ma AH, De Vere White RW, Airhart S, Liu ET, Banchereau J, Brehm MA,, Greiner DL, Shultz LD, Palucka K, Keck JG. Humanized mice in studying efficacy and mechanisms of PD-1-targeted cancer immunotherapy. *FASEB J.* 2018 Mar;32(3):1537-1549.

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

A distinction is made between experiments with the result parameter

(1) analysis of parameters via sampling, in which the averages between groups are compared by means of a t-test, ANOVA or non-parametric test and (2) effectiveness by means of Kaplan-Meier survival analysis. For each experiment and outcome parameter, the minimum number of animals will be calculated that is needed to achieve a statistically meaningful result between the most important test groups. For this, use is made of sample size calculation software (PS Power and Sample Size Calculations Dupont and Plummer Vanderbilt University) and, if necessary, advice is requested from statisticians. The required information about distribution and the expected treatment effect is extrapolated from a possible pilot experiment or previous comparable experiments or from the literature.

A typical experiment with the result parameter (1) analysis of parameters via sampling will contain 4-8 animals per group, assuming a demonstrable relative effect of at least 150%, a spread of 20-60%, an unreliability threshold (alpha) of 5% and a power of 80%. An experiment with the outcome parameter (2) effectiveness will contain 8-15 mice per group, depending on the expected hazard ratio, with an alpha of 0.05 and a power of 80%. Power calculations for individual experiments will be based on latest information from literature or own experiments on variation and discussed with IvD and bio-statistician .

B. The animals

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

Animal species:

Since we work with human cells/biopsies in a mouse, we need to use immunodeficiency mice, such as Balb-C nu / nu mice or NSG mice.

Origin of the animals:

The mice come from a registered breeding company or from our own breeding.

Stages of life:

Depending on the experiment, mice will be 8 to 20 weeks old at the start of the experiment.

Estimated numbers:

An average experiment will contain 4 different groups. For example in phase 1, monotherapy, the following groups: mock, dose 1, dose 2, dose 3. For example in phase 2, combination therapy, the following groups: untreated, treatment A, treatment B, treatment A + B). Previous research has shown that this type of deep test has more variance than animal type 1 or 2.

For experiments with outcome parameter 1 / phase 1: 4-8 mice per group.

For experiments with outcome parameter 2 / phase 2: 8-15 mice per group.

In phase 1 we want to test 4 different tumor models, with max 5 different therapies (e.g. existing chemotherapy, 5.1 lid1c). We assume $4 \times 5 = 20$ experiments. For an average experiment we need a maximum of $4 \times 8 = 32$ mice. Maximum number of mice required for phase 1: $20 \times 32 = 640$ mice.

In phase 2 we expect to use 4 tumor models, with 3 combinations per tumor model (selected on results obtained in phase 1). We assume $4 \times 3 = 12$ experiments. For an average experiment we need a maximum of $4 \times 12 = 48$ mice. Maximum number of animals for phase 2: $15 \times 48 = 720$ animals

We estimate the maximum number of animals required for the next 5 years at 1360 animals.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement: Primary cutaneous lymphoma cells are extremely difficult to culture in vitro, most likely because a proper environment is lacking. 5.1 lid2h, 5.1 lid1c

However, the mouse model may still be preferred to test systemic therapies and/or on systemic adverse side effects.

To reduce the number of animals, we will test and optimise combinations of treatments using the few available cell lines. Although these cell lines can give a good indication of interesting combinations, unfortunately not all questions can be answered with these models. The effects are expected to be different in an intact organism due to, among other things, the accessibility of the tumors, the spread in vivo, the interaction with the tumor environment and stroma, induction of a systemic immune response.

Reduction: A phasing has been applied to the project. New candidate treatments are first tested in vitro on tumor cell lines. Only the best are then tested in vivo, starting with dose and injection route optimization (phase 1). Only the most promising treatment on the optimal dose will then be tested in the combination experiments (phase 2). Through step-wise approach, we aim to use the mice as efficiently as possible and to reduce the number of mice. The minimum number of animals per experiment will be determined with the help of statistical calculations.

Refinement: By using tumor cells that stably express bioluminescence reporters, tumor growth can be very accurately monitored by means of BLI in a non-invasive manner. In this way, any metastases can be identified and monitored in time

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

Pain relief will be applied peri-operatively . Anesthesia is used during bioluminescence imaging and intra-tumor injections, according to the applicable Standard Operating Procedures (SOPs). The experiments will be conducted by experienced, well-trained and authorized personnel. The animals are carefully monitored to identify any complications.

To prevent adverse environmental effects, all reagents and cells that go into the mouse are screened. All biological material is disposed of via regulated procedures.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Pain relief will be applied peri-operatively to relieve pain. Anesthesia is used during bioluminescence imaging and intra-tumor injections, according to the applicable Standard Operating Procedures (SOPs).

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

The animals may experience stress and / or irritation from problems from the wounds. The stitches (in case of transplanted human biopsies) can be clawed open or gnawed open, which can cause pain or complications, such as the opening of the wound and infection.

Explain why these effects may emerge.

Stress can be caused by the actions (injections of tumor cells, luciferin, injections of drug candidates, blood collection) and disorientation after waking up the anesthesia. Irritation can be caused by the stitches (if applicable).

Stress, itching and natural behavior can cause the stitches to be scratched or nipped and infected.

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

Every effort is made to prevent complications, including through the deployment of experienced staff and working with standard protocols. In addition, the mice are closely monitored during the first 4-6 hours and again 24 hours after surgery. Should a complication arise, the animal is immediately taken out of the experiment / killed.

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

Human endpoints:

General: We adhere to the human endpoints as described in the "code of practice animal experiments in cancer research". In the unlikely event that one of the human endpoints is reached, the animal will be immediately taken out of the experiment and killed in accordance with Annex IV of the 2010/63 / EU directive.

The human endpoints differ per model.

The following human endpoints apply to subcutaneous tumors:

- achieve maximum cumulative tumor size measured in 3 dimensions of 1000 mm³.
- severe skin irritation or if the tumor breaks through the skin.
- achieving a body condition score of 2 or lower (according to Ullman-Culleré and Foltz, 1999)
- Signs of pain (scale 2) using the Grimace Scale for mice. (Coding of facial expressions or pain in the laboratory mouse, Langford et al. 2010)

For the orthotopic models the following human end points apply:

- Combination of several factors including the total tumor burden measured with bioluminescence (maximum intensity reached), the size of the tumor, the location of the tumor (s), the amount of tumors, the course of the mouse weight and the well-being / behavior and the locomotion of the mice, the body condition score (according to Ullman-Culleré and Foltz, 1999).
- The limit is in any case at: The animal loses more than 15% of the body weight in a relatively short time (1-2 days) or the body weight has decreased by more than 20% compared to the own weight at the start of the test , or a body condition score of 2 or lower.

Indicate the likely incidence.

5%

K. Classification of severity of procedures

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

	Species	Number of animals	category (cumulative)	Discomfort (sum of procedures)
Subcutaneous models, tumor inoculation via injection	mouse	340	100% mild	Tumor inoculation and measurement Injections

				Blood collection Kill the mouse
Intrahepatic/int ravenous injection, (sub)cutaneous models with biopsies	mouse	1020	100% moderate	Tumor inoculation /transplantation/r emoval via surgery; Treatment under inhaled or injected anesthesia; Several times imaging under inhaled anesthesia
		1360	25% mild, 75% moderate	

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

In order not to cause the tumor burden to become too large and for the removal of organs or samples, it is essential to kill the animals.

After reaching the experimental end point, or treatment duration determined in advance for each experiment, the animals are killed via the usual euthanasia method according to Annex IV EU Directive 2010/63 with minimal discomfort.

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

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

Yes



Format

Niet-technische samenvatting

- Dit format gebruikt u om uw niet-technische samenvatting te schrijven
- Meer informatie over de niet-technische samenvatting vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1 Titel van het project	Muismodellen voor huidlymfomen; van ontstaan naar therapie
1.2 Looptijd van het project	5 jaar
1.3 Trefwoorden (maximaal 5)	Kanker; witte bloedcellen; huidlymfoom; ontwikkeling; therapie

2 Categorie van het project

2.1 In welke categorie valt het project.	<input checked="" type="checkbox"/> Fundamenteel onderzoek
	<input checked="" type="checkbox"/> Translationeel of toegepast onderzoek
	<input type="checkbox"/> Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
<i>U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.</i>	<input type="checkbox"/> Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid
	<input type="checkbox"/> Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
	<input type="checkbox"/> Hoger onderwijs of opleiding
	<input type="checkbox"/> Forensisch onderzoek
	<input type="checkbox"/> Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

3 Projectbeschrijving

3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)	<p>Huidlymfomen zijn vormen van witte bloedcel kankers die in de huid ontstaan. Voor verschillende typen huidlymfomen hebben we recent kandidaat-genen gevonden die waarschijnlijk betrokken zijn bij het ontstaan van deze ziektes. In dit project willen we specifiek de functie van deze genen analyseren. Dit wordt in de witte bloedcellen, lymfocyten, waaruit de kanker ontstaat.</p> <p>Uiteindelijk wordt bepaald welke veranderingen gebruikt kunnen worden om lymfomen in een vroeg stadium te onderscheiden van goedaardige</p>
---	---

	<p>huidziekten en een prognose van de mate van kwaadaardigheid te geven. Onze analyses zullen tevens duidelijk maken of er veranderingen zijn die nieuwe therapeutische mogelijkheden bieden die vervolgens in de ontwikkelde modellen getest kunnen worden.</p>	
3.2	<p>Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?</p>	<p>Dit project zal een beter inzicht geven in de mechanismen betrokken bij het ontstaan en progressie van cutane lymfomen. Tevens zal er meer duidelijkheid komen over de werkingsmechanismen en effectiviteit van huidige behandelmethoden en mogelijkheden tot nieuwe interventies.</p>
3.3	<p>Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?</p>	<p>Muis, 5070</p>
3.4	<p>Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?</p>	<p>Bij een deel van de dieren wordt huiduitslag (een eczeem achtige reactie) opgewekt die kan leiden tot een jeuk op die plaats. Dit is vervelend voor het dier en kan tot krabben leiden.</p>
3.5	<p>Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?</p>	<p>licht (1890 dieren) en matig (3180 dieren) ongerief</p>
3.6	<p>Wat is de bestemming van de dieren na afloop?</p>	<p>Geofferd en daarna worden organen uitgenomen</p>

4 Drie V's

4.1	<p>Vervanging Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.</p>	<p>Gebruik van dieren is om verschillende redenen noodzakelijk.</p> <p>1. Het is nagenoeg onmogelijk om huidlymfocellen buiten het menselijk lichaam te kweken. Dit komt omdat een goede omgeving (huid) ontbreekt. We ontwikkelen momenteel technieken waarbij menselijke witte bloedcellen samen met nagemaakte menselijke huid worden gekweekt. Als dit lukt, zullen we de resultaten van patiënten cellen in PDX-modellen kunnen vergelijken met patiënten-cellen die in vitro huidmodellen worden gekweekt om te bepalen in hoeverre deze kweek-modellen muizenexperimenten kunnen vervangen (voor systemische effecten blijven muismodellen belangrijk).</p> <p>2. In experimenten waarin we behandelingen gaan testen zullen de effecten in een intact organisme anders zijn dan in een proefdiervrij alternatief. Dit komt onder andere vanwege de toegankelijkheid van de tumoren (een medicijn moet door de huid kunnen gaan), de verspreiding van tumorcellen</p>
-----	--	--

in een lichaam, het samenspel tussen tumorcellen en de tumoromgeving en (wellicht meest belangrijke) een functionerend afweersysteem.

4.2 **Vermindering**

Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.

Om het aantal dieren te verminderen, zullen we combinaties van behandelingen eerst testen en optimaliseren met behulp van de weinige beschikbare cellijnen.

Eerst worden genen van interesse proefdiervrij getest. Bovendien zullen we voor elk gen en behandeling beginnen met optimalisering van dosis en tijd. Alleen de meest veelbelovende genen, die belangrijk lijken voor de huidlymfomen, worden vervolgens getest voor behandelingen. Op basis van ervaring bij de mens kan ook een goede schatting worden gemaakt van een minimaal vereist behandelingseffect en de spreiding daarin op basis waarvan het minimale nodige aantal muizen per experimentele groep te berekenen valt om een effect betrouwbaar aan te tonen. Zo wordt met behulp van statistische berekeningen voorafgaand aan het experiment wordt het aantal dieren verder tot een minimum beperkt.

4.3 **Verfijning**

Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diermodel(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.

Verfijning: Aangezien de eerste tekenen van lymfoomontwikkeling in de huid in een vroeg stadium kunnen worden gezien, ligt het experimentele eindpunt van de meeste experimenten ver voor het bereiken van de maximale cumulatieve tumorbelasting van 1000 mm³.

Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.

De experimenten worden uitgevoerd door ervaren, goed opgeleid en gekwalificeerd personeel. De dieren worden nauwkeurig gevolgd en daarover wordt gerapporteerd in het welzijnsdagboek. Pijnstillende methoden worden waar nodig toegepast.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen

Van: info@zbo-ccd.nl
Verzonden: vrijdag 20 maart 2020 14:23
Aan: 5.1 lid2h
Onderwerp: Verzoek om advies over projectvergunningsaanvraag AVD 5.1 lid2h 20209584
Bijlagen: 01_Huidlymphoom_aanvraag_projectvergunning_20200317.pdf; 05_Huidlymphoom_NTS_20200317.docx; 03_Huidlymphoom_appendix_1_20200317.docx; 04_Huidlymphoom_appendix_2_20200317.docx; 02_Huidlymphoom_project_proposal_20200317.docx

Geachte leden van 5.1 lid2h

De Centrale Commissie Dierproeven (hierna: CCD) verzoekt u in het kader van vergunningverlening (of wijziging van een vergunning) advies te geven over het project met als titel: "Maus models of cutaneous lymphomas: from pathogenesis to therapeutic intervention" en aanvraagnummer: AVD 5.1 lid2h 20209584.

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 20-03-2020, 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 adviesterminen 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 20-03-2020 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

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

T: 0900 2800028
E: info@zbo-ccd.nl

DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: AVD^{5.1 lid2h} 20209584
2. Titel van het project: **Mouse models of cutaneous lymphomas; from pathogenesis to therapeutic intervention.**
3. Titel van de NTS: Muismodellen voor huidlymfomen: ontwikkeling, karakterisering en mogelijkheden voor behandeling.
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
 - wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: ^{5.1 lid2h}
 - telefoonnummer contactpersoon: ^{5.1 lid2e}
 - e-mailadres contactpersoon: ^{5.1 lid2h}
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: 20-03-2020
 - aanvraag compleet: 20-03-2020
 - in vergadering besproken: 26-03-2020, 12-11-2020 & 06-05-2021
 - anderszins behandeld:
 - termijnonderbreking(en) van: 09-04-2020 t/m 28-10-2020 & 24-11-2020 t/m 26-04-2021
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 28-10-2020 & 26-04-2021
 - advies aan CCD: 27-05-2021
7. De voorzitter van de IvD heeft aangegeven dat de aanvrager de aanvraag met de IvD heeft afgestemd en dat deze de instemming heeft van de IvD.
8. Eventueel horen van aanvrager
N.v.t.
9. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum: 09-04-2020
 - Strekking van de gestelde vragen:
De DEC heeft bij de aanvrager aanvullende informatie ingewonnen over,
 - De proposal: de subdoelen, de meerwaarde is van muismodel 1 (de geïnduceerde lymfoma's in GEMM's) t.o.v. muismodel 2 (PDX modellen), in welk stadium het *in vitro* onderzoek zich momenteel bevindt en de go/no-go momenten.
 - Appendix 1: welk dier welke handelingen ondergaat, het cumulatieve ongerief voor de verschillende experimenten, welke criteria er worden gehanteerd bij de go/no-go momenten, de toepassing van DNFB voor het induceren en veroorzaken van een contact dermatitis, de (individuele) huisvesting na topicale applicatie en de humane eindpunten.
 - Appendix 2: de reinoculatie/retransplantatie van tumor cellen, de statistische onderbouwing van de voorgestelde aantallen, het gebruik van pups, welk dier

welke handelingen ondergaat, het (cumulatieve) ongerief van de interventies, de mogelijkheid om handelingen te combineren, het gebruikte adjuvans, het toepassen van de grimace scale, hoe bioluminescentie wordt toegepast bij de xenografts om vervolgens de groei van deze tumoren te kunnen monitoren, de (individuele) huisvesting na topicale applicatie en de humane eindpunten.

- de NTS: is te onduidelijk en bevat (te) veel jargon. Mede daardoor is deze niet goed leesbaar voor de leek en dient aangepast te worden.
- Naar aanleiding van de vragen zijn het projectvoorstel, de bijlages en de NTS door de aanvrager aangepast.
- Datum: 24-11-2020
- De aangepaste projectaanvraag is op belangrijke onderdelen daadwerkelijk verbeterd, maar de aanvraag verschaft, ook na de aanpassingen, nog steeds niet voldoende duidelijkheid over de uit te voeren dierexperimenten. Alle DEC leden concluderen dat het projectvoorstel in deze uitvoering niet navolgbaar is omdat essentiële informatie over alle voorgestelde interventies bij de proefdieren ontbreekt.
- Naar aanleiding van de vervolgvragen zijn het projectvoorstel, de bijlages en de NTS opnieuw door de aanvrager aangepast. Er zitten echter naar inziens van de DEC nog wel onduidelijkheden in.

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

N.v.t.

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunning plichtig (dierproeven in de zin der wet)
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om over deze projectaanvraag te adviseren. De benodigde expertise op dit wetenschappelijke terrein is aanwezig binnen de DEC.
4. Geen van de DEC leden is betrokken bij het betreffende project.

C. Beoordeling (inhoud)

1. Deze vergunningaanvraag voor dierexperimenteel onderzoek met muizen, heeft als direct doel, het vergaren van kennis over de vroege pathogenese van primaire huidlymfomen. Het uiteindelijke doel van het totale onderzoeksvoorstel is het vinden van 'aangrijpingspunten' voor nieuwe behandelstrategieën voor patiënten met deze primaire huidlymfomen. Voor het pathogenese onderzoek worden genetisch gemodificeerde muizen gebruikt waarin bepaalde genetische veranderingen kunnen leiden tot activatie van oncogene *pathways* in lymfocyten. Er zijn een aantal mogelijke genetische drivers geïdentificeerd maar er bestaat nog geen volledige duidelijkheid over hun rol in de vroege pathogenese van primaire huidlymfomen. Naast de genetische veranderingen is zeer waarschijnlijk ook een milde huidontsteking predisponerend (of noodzakelijk) voor het ontstaan van deze primaire huid tumoren. De te onderzoeken hypothese omtrent de pathogenese van deze primaire huidlymfomen is dat genetisch veranderde lymfocyten in de subcutis door milde ontstekingsreacties worden gestimuleerd tot (versnelde) celdeling waardoor een huidtumor ontstaat. Voor het toetsen van deze hypothese wordt een genetisch veranderd muismodel ontwikkeld waarbij contactdermatitis op de geschoren flanken wordt geïnduceerd en onderhouden. Mogelijk levert dit pathogenese onderzoek aanknopingspunten op voor een nieuwe effectieve en veilige therapie. Nieuwe

behandelingsmogelijkheden kunnen vervolgens ook worden getest in een tweede muismodel, een immuun gecompromitteerde muis. Humane tumorcellen, *cutaneous T-cell lymphoma cells (CTCL cells)*, worden als xenotransplantaat getransplanteerd naar deze muis zonder actief immuunsysteem. In de ontvanger muis zullen de humane tumorcellen gaan delen en een nieuwe tumor vormen. Het lukt overigens nog niet om de humane tumorcellen in een in vitro opstelling te laten delen. Het eerste muismodel, waarin de vorming van lymfomen in de huid wordt geïnduceerd leent zich vooral voor het bestuderen van de vroege fase van de tumorvorming en voor onderzoek naar mogelijke behandelingen in deze beginfase. Het tweede model, waarin tumorcellen uit humane huidlymfomen worden ingebracht, zal worden gebruikt om juist de latere fasen in de tumorontwikkeling nader te onderzoeken en om nieuwe behandelingen te testen. Voor het dierexperimentele onderzoek worden in totaal 4164 muizen gebruikt waarvan er 962 licht ongerief zullen ondervinden en 3202 dieren zullen matig ongerief ondervinden. De proefdieren zullen verschillende interventies ondergaan zoals: genetische modificatie, applicatie van een Oxazolone suspensie op de geschoren huid, anesthesie, anti-tumor behandelingen en aan het einde van de proef worden de muizen gedood. Ten aanzien van de haalbaarheid is het belangrijk te weten dat de betrokken

5.1 lid2h

Dat impliceert dat er veel kennis is van deze huidtumoren daarnaast heeft de onderzoeker ruime ervaring met dit type onderzoek. Verder is er voldoende budget en voldoende personele capaciteit. De DEC leden hebben de indiener twee maal vragen gesteld en kritische opmerkingen gemaakt over het onderzoeksvoorstel. De aanvrager heeft naar aanleiding hiervan de documenten wel flink aangepast maar volgens de DEC leden staan er ook in deze derde versie nog zaken die onduidelijk zijn of beter verwoord hadden moeten worden. De DEC heeft besloten om ondanks genoemde tekortkomingen wel een ethische afweging te maken omdat er wel voldoende duidelijkheid verkregen is over: 1. De gevolgen voor en de belasting van de proefdieren, 2. De mogelijke opbrengst volgens de aanvragers en 3. De haalbaarheid van het onderzoeksvoorstel. Daarmee voldoet het voorstel volgens de DEC aan de definitie van een project, het vertoont overeenkomst met voorbeeld 1 uit de handleiding. Daarnaast heeft de DEC besloten om in het DEC advies naast de uitkomst van de ethische afweging ook de gesignaleerde onduidelijkheden te vermelden; deze zijn vermeld bij E-3.

2. Voor zover de DEC kan beoordelen is er geen sprake van tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën zijn in overeenstemming met het hoofddoel.

Belangen en waarden

4. Het primaire onderzoeksdoel is het vergaren van kennis over de vroege pathogenese van primaire huidlymfomen. Het uiteindelijke doel van het totale onderzoeksvoorstel is het vinden van 'aangrijpingspunten' voor nieuwe behandelstrategieën voor patiënten met primaire huidlymfomen. DEC leden vinden dat er een duidelijke relatie bestaat tussen het directe en het uiteindelijke doel; het fundamentele onderzoek naar de pathogenese van primaire huidlymfomen biedt wellicht translationeel perspectief als er aangrijpingspunten worden gevonden voor nieuwe therapieën. Daarmee ligt het uiteindelijke doel in het verlengde van het primaire doel. DEC leden vinden het directe doel van het voorgestelde onderzoek relevant en gerechtvaardigd binnen de context van het onderzoek van primaire huidlymfomen; er ontbreekt nog essentiële informatie over de pathogenese die mogelijk gebruikt kan worden om nieuwe behandelopties te vinden.
5. De belangrijkste belanghebbenden in dit project dat primair gericht is op het verkrijgen van meer kennis over de (vroege) pathogenese van primaire huidlymfomen zijn de

proefdieren, de onderzoekers, patiënten met DN en de samenleving.

Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: De integriteit en de fysieke stabiliteit van de dieren zal door de genetische modificatie, de toediening van Oxazolone op de huid en de overige interventies worden aangetast. Daarbij zullen de dieren als gevolg van alle interventies ongerief door stress en pijn ondervinden. Tevens worden de dieren in het kader van het experiment gedood.

Waarden die voor de onderzoekers bevorderd worden: De onderzoekers zullen nieuwe wetenschappelijke kennis vergaren over de (vroege) pathogenese van primaire huidlymfomen. De carrière mogelijkheden van de wetenschappers kunnen verbeteren door nieuwe publicaties.

Waarden die voor patiënten met huidlymfomen bevorderd kunnen worden: Het beschreven onderzoek kan mogelijk, in de toekomst, leiden tot nieuwe effectieve en veilige behandelmethoden waardoor de prognose voor patiënten aanmerkelijk kan verbeteren.

Waarden die voor de samenleving bevorderd worden: De voorgestelde experimenten kunnen wellicht een bijdrage gaan leveren aan het terugdringen van de incidentie van huidlymfomen – nu in Nederland ca. 160 nieuwe gevallen per jaar - en het verminderen van de ziektelast als gevolg van deze bijzondere huidtumoren.

6. Voor zover de DEC kan beoordelen is er geen sprake van substantiële milieueffecten.

Proefopzet en haalbaarheid

7. 5.1 lid2h

Naar inziens van de DEC beschikt de betrokken onderzoeksgroep ook over voldoende kennis van proefdieren en over ervaring met dierexperimenteel onderzoek om te kunnen voldoen aan de 3V-beginselen en om zoveel mogelijk te voorkomen dat mens, dier en milieu negatieve effecten ondervinden als gevolg van de voorgestelde dierproeven. Daarbij is de proefdierfaciliteit van de vergunninghouder goed uitgerust en zijn de biotechnici bekwaam in het verzorgen van muizen en het monitoren van gezondheidsproblemen.

8. De DEC is van mening dat de experimentele opzet, de voorgestelde strategie om twee muismodellen te gaan gebruiken en de uitkomstparameters logisch en helder gekozen zijn en goed aansluiten bij de aangegeven doelstellingen. Tevens is de DEC ervan overtuigd dat de voorgestelde onderzoeksopzet zal kunnen leiden tot het opwekken van huidlymfomen bij de genetisch veranderde dieren en dat de analyse van dit proces waardevolle informatie kan opleveren in de zoektocht naar nieuwe behandelmethoden.

Welzijn dieren

9. Alle dieren worden gefokt bij een fokbedrijf dat gecertificeerd en geregistreerd is voor het fokken van dieren die in dierproeven gebruikt kunnen worden. Er is geen sprake van een afwijkende huisvestingslocatie, hergebruik, bedreigde diersoorten, niet-menselijke primaten, zwerfdieren en/of dieren uit het wild. Het is niet nodig om analgesie toe te passen. De toegepaste methodes voor anesthesie en euthanasie zijn conform de Richtlijn.
10. De huisvesting van de dieren is conform bijlage III van de richtlijn. Het proefdiercentrum van de vergunninghouder beschikt over uitstekende faciliteiten en uitsluitend bevoegd en competent personeel zal zorg dragen voor de verzorging van de dieren en de uitvoering van de dierproeven.

11. De DEC leden vinden dat de aanvrager zoveel als redelijkerwijs mogelijk is, heeft gedaan aan verfijning. Het cumulatief ongerief is voor ca. 75 % van de muizen gemaximeerd op matig en voor de overige 25% van de dieren geclassificeerd als licht ongerief. Door de toepassing van duidelijke humane eindpunten kan onnodig ongerief worden voorkomen. De proefdieren zullen verschillende interventies ondergaan zoals: genetische modificatie, applicatie van een Oxazolone suspensie op de geschoren huid, anesthesie, anti-tumor behandelingen en aan het einde van de proef worden de muizen gedood. De inschatting van het niveau van cumulatief ongerief door de aanvrager, maximaal matig, komt overeen met de ongeriefkwalificatie door de DEC leden.
12. Door genetische modificatie, het aanbrengen van een irriterende emulsie, het afnemen van bloed en het implanteren van humane tumorcellen wordt de lichamelijke integriteit van de dieren nadrukkelijk aangetast. De muizen zullen door alle interventies ongerief gaan ervaren door stress en pijn. Al deze handelingen en ingrepen hebben direct effect en invloed op het welzijn en de integriteit van de dieren.
13. Naar mening van de DEC zijn de humane eindpunten voldoende duidelijk bepaald. Er zijn klinische observaties, zoals afwijkend gedrag, afwijkingen in de locomotie, duidelijke afname van lichaamsgewicht en de body condition score (volgens Ullman-Culleré and Foltz, 1999) die het HEP markeren. De opgegeven incidentie van het bereiken van een humaan eindpunt is relatief laag, <5% en < 10%. Deze inschatting wordt door het ontbreken van ervaring met deze proefopzet niet onderbouwd maar de DEC leden zien geen reden om te twifelen aan de genoemde percentages.

3V's

14. De aanvrager geeft duidelijk aan dat primaire huidlymfocyt cellen (nog) niet in vitro te kweken zijn. Daar wordt wel aan gewerkt maar men verwacht hiervoor nog enige jaren nodig te hebben. Daarbij is voor het bestuderen van de pathogenese van deze huidtumoren het induceren van een lichte huidontsteking essentieel, dit is niet mogelijk in een in vitro opstelling en deze interacties tussen verschillende typen cellen kunnen alleen in intacte dieren worden bestudeerd.
15. In het project wordt tegemoet gekomen aan "het verminderen van proefdieren beginsel" doordat *waar mogelijk* relevante zaken eerst in vitro worden bepaald voordat de in vivo proef wordt uitgevoerd. Daarnaast wordt de benodigde groepsgrootte vooraf statistisch zo nauwkeurig mogelijk bepaald. Het totaal aantal benodigde muizen is 4164. DEC leden vinden de berekening en inschatting van het aantal benodigde proefdieren helder en navolgbaar.
16. In de uitvoering van de dierexperimenten is er aandacht voor verfijning. De ontwikkeling van huidlymfomen is goed zichtbaar en herkenbaar. De omvang van de huidtumoren zal daardoor beperkt kunnen blijven waardoor de maximale tumoromvang (2000 mm³) van het HEP niet bereikt zal worden. De dieren waarbij de primaire huidlymfomen gaan uitzaaien naar andere orgaansystemen worden met bloedonderzoek opgespoord. De DEC is ervan overtuigd dat de dieren goed worden geobserveerd en dat onnodig lijden zal worden voorkomen.
17. Het betreft hier geen wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. De onderzoeker geeft in de eerste appendix aan dat "*Both males and females can be used initially, but depending on the type of tumors and the rate at which they will develop, a preference for either male or female might emerge*". In de tweede appendix wordt voor het gebruik van de NSG muizen geen sekse vermeld. De DEC gaat ervan uit dat voor het gehele onderzoek mannetjes en vrouwtjes muizen in gelijke aantallen worden gebruikt en constateert dat er geen duidelijk onderbouwing wordt geleverd waarom het gebruik van alleen mannen of alleen vrouwen gerechtvaardigd is.
19. De dieren worden in het kader van het project gedood, waarna relevant weefsel wordt uitgenomen voor analyse. Het doden van de dieren gebeurt volgens een voor de diersoort passende dodingsmethode die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU.
20. Er worden voor dit projectvoorstel geen niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren gebruikt.

NTS

21. De niet-technische samenvatting is een compacte weergave van het project. De NTS bevat nog wel slordigheden ("de oorknip duurt kort pijn") en tegenstrijdigheden. (Bij vermindering staat: "er worden alleen modellen gebruikt op basis van genetische afwijkingen die in de meeste huidlymfom patiënten worden terug gevonden". Dit klopt niet aangezien ze ook een model voor zeer zeldzame agressieve tumoren willen gebruiken). Tenslotte is de NTS, voor de doelgroep, niet overal begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

1. Rechtvaardigt het onderzoek, naar de vroege pathogenese van primaire huidlymfomen en naar nieuwe behandelmethoden van deze huidtumoren, de inzet van 4164 muizen gegeven het feit dat ca. 75% van deze dieren cumulatief matig en 25% cumulatief licht ongerief zullen ondervinden ?
2. Het voorgestelde onderzoeksproject met 4164 proefdieren is bedoeld om nieuwe kennis te vergaren omtrent een bijzondere vorm van huidkanker bij mensen, primaire huidlymfomen. De incidentie is laag te noemen, 160 nieuwe gevallen per jaar in Nederland, maar het ziektebeeld is veelal ernstig mede omdat de diagnose pas laat wordt gesteld waardoor de patiënten geen tijdige adequate behandeling krijgen. Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: het proefdieronderzoek is, in absolute zin, nadelig voor de muizen als gevolg van het te verwachten cumulatieve matige ongerief en de schending en aantasting van de fysieke en gedragsmatige integriteit van het dier. Daarnaast worden de dieren in het kader van het experiment gedood. Waarden die voor onderzoekers bevorderd kunnen worden: een mogelijk voordeel door het vergaren van meer inzicht in de pathogenese en oncogene pathways van primaire huidlymfomen. Nieuwe wetenschappelijke kennis kan resulteren in publicaties die de carrière mogelijkheden van de wetenschappers kunnen bevorderen. Waarden die voor patiënten met primaire huidlymfomen bevorderd kunnen worden: een mogelijk groot voordeel omdat de prognose voor patiënten met primaire huidlymfomen kan verbeteren als in een vroeg stadium een effectieve behandeling kan worden ingezet. Waarden die voor de samenleving bevorderd kunnen worden: een mogelijk groot voordeel omdat het voorgestelde onderzoek een behandelingsstrategie kan gaan opleveren waarmee de incidentie en de ernst van primaire huidlymfomen kan worden verminderd. Dit zal leiden tot een vermindering van de ziektelast, afname van de directe kosten in de gezondheidszorg en tot een afname van de indirecte kosten door

vermindering van ziekteverzuim en arbeidsongeschiktheid.

De ethische afweging door DEC leden levert geen consensus op, zes DEC leden zijn van mening dat de belangen van de patiënten (en hun naasten), de samenleving en de onderzoekers zwaarder wegen dan de belangen van de proefdieren. Daarentegen vindt één DEC lid dat de mogelijke opbrengst van het onderzoek niet opweegt tegen het te verwachten ongerief bij de muizen. De zes DEC leden vinden het verkrijgen van meer inzicht in de pathogenese van primaire huidlymfomen van groot maatschappelijk en wetenschappelijk belang; het gebruik van proefdieren is hierbij onvermijdelijk. Deze zes DEC leden geven een positief advies en het zevende DEC lid geeft een negatief advies.

3. Zes DEC leden zijn overtuigd van het belang van de doelstellingen van dit project. Naar inziens van deze DEC leden beschrijft de aanvraag belangrijk onderzoek, dat zowel maatschappelijk als ook wetenschappelijk zeer relevant is. Deze DEC leden zijn van mening dat:
- de waarden die voor de patiënten, de samenleving en de onderzoekers bevorderd kunnen worden zwaarder wegen dan de waarden die voor de proefdieren in het geding zijn
 - de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstelling en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project
 - dat de onderzoeksgroep voldoende kennis en ervaring heeft om met de gekozen onderzoeksstrategie en met de voorgestelde dierproeven de doelstelling te behalen en dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om het ongerief van de dieren te beperken.
 - de doelstelling niet zonder het gebruik van proefdieren behaald kan worden en acht het gebruik van proefdieren en het daarmee samenhangende ongerief bij de dieren ethisch gerechtvaardigd.

De motivatie van het negatieve advies van het zevende DEC lid:

Bij aanvraag AVD9584 kom ik tot een **negatief** advies, d.w.z. het advies om de voorgenomen dierproeven niet toe te staan. Mijn overwegingen hierbij zijn als volgt:

- In de projectaanvraag komt naar voren dat men zeldzame vormen van cutane lymfomen wil onderzoeken, maar het blijft onduidelijk *hoe* zeldzaam deze cutane lymfomen precies zijn. In antwoord op onze vragen is wel genoemd dat één van de vier varianten die men wil onderzoeken gemiddeld eenmaal per vier jaar in de Nederlandse kliniek wordt gezien. Voor het onderzoek naar deze (en iedere andere onderzochte) variant wil men wel 1041 muizen opofferen. Ik vraag me ernstig af of het ongerief (dat weliswaar op maximaal 'matig' is ingeschat) voor deze muizen opweegt tegen het beperkte aantal patiënten met deze variant van de aandoening. Natuurlijk zijn er wereldwijd beduidend meer patiënten met dit type cutane lymfoom dan alleen in Nederland, maar daartegenover staat ook (zoals altijd) een kans dat het proefdieronderzoek überhaupt geen klinisch relevante toepassingen oplevert. De in onze DEC besproken suggestie dat ieder van deze vier varianten onderzocht moet worden om een totaalbeeld van de aandoening te krijgen, of dat onderzoek naar de meer zeldzame varianten wetenschappelijk of klinisch belangrijke resultaten voor andere varianten gaat opleveren, vind ik erg speculatief. Alles bij elkaar ben ik er niet van overtuigd dat het voorgenomen proefdieronderzoek naar de meest zeldzame varianten van deze aandoening gerechtvaardigd is. (Zeker in samenhang met het volgende punt.)
- De onderzoekers maken duidelijk dat ze ook aan proefdiervrije alternatieven voor dit onderzoek werken. In antwoord op onze vraag in welk stadium het *in vitro* onderzoek zich bevindt en wanneer het *in vivo* onderzoek zou kunnen vervangen, hebben de onderzoekers geantwoord dat ze niet verwachten binnen 2 jaar de *in vitro* modellen ontwikkeld en gevalideerd te hebben. Zeker voor zover het erg

zeldzame aandoeningen betreft, zou je wat mij betreft gewoon 2 jaar moeten wachten tot deze modellen wel ontwikkeld en gevalideerd zijn. Maar het wordt ook niet erg duidelijk in hoeverre deze *in vitro* alternatieven echte alternatieven zullen zijn. De onderzoekers schrijven hierover in het project proposal: "Even if successful, effects are expected to be different in an intact body due to; among other things, the interaction with the tumor environment and stroma, induction of a systemic immune response and the spread in vivo. Therefore, to gain understanding of the pathogenesis of the novo tumors we need the intact animal to simulate the (inflammatory) conditions under which the cutaneous lymphomas appear to arise. Recreating these conditions in vitro (ex vivo) is not (yet) possible." Hierin wordt niet duidelijk gemaakt welke delen van het voorgestelde onderzoek wel met *in vitro* modellen vervangen zou kunnen worden, en wat dit betekent voor het benodigde aantal muizen. Als het punt is dat helemaal niets van het voorgestelde onderzoek door *in vitro* onderzoek vervangen zou kunnen worden, dan is mij onduidelijk waarom de ontwikkeling van deze *in vitro* modellen überhaupt door de onderzoekers genoemd wordt. (Het werd al in het project proposal genoemd voordat we er als DEC een vraag over stelden.)

Kortom, ik ben er niet van overtuigd dat het proefdieronderzoek naar alle vier de varianten van cutane lymfomen gerechtvaardigd is, gelet op de zeldzaamheid van sommige van deze varianten en gelet op de ontwikkeling van dierproefvrije alternatieven. Misschien hadden de onderzoekers mij kunnen overtuigen als ze gericht op deze punten waren ingegaan. Aangezien we als DEC echter besloten hebben niet voor een derde maal onze vragen aan de onderzoekers voor te leggen, hanteer ik het 'nee, tenzij' principe door een negatief advies af te geven.

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 V Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten: **duidelijkheid geven over de zaken die zijn opgesomd bij E3**
- De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
 - De vaststelling dat het project niet vergunning plichtig is om de volgende redenen:...
 - De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...
 - De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...

2. Het uitgebrachte advies is niet gebaseerd op consensus.

3. Er is tijdens de derde beoordeling en bespreking van dit projectvoorstel in de DEC vergadering geconstateerd dat ook de derde versie van de aanvraag nog steeds slordigheden en onduidelijkheden bevat die nog niet gecorrigeerd zijn. Niettemin heeft de DEC besloten om wel een ethische afweging te maken. Zaken die niet duidelijk en/of verwarrend zijn:

- a. In het projectvoorstel staat: "Most treatment strategies have already been optimized for humans". Deze opmerking in een onderzoeksvoorstel naar nieuwe behandelingen scheidt verwarring.
- b. Het is onduidelijk hoe zeldzaam de varianten zijn die nu onderzocht worden.

- c. Onderzoeksgroep is bezig met het ontwikkeling van *in vitro* modellen, maar het wordt niet duidelijk welke dierexperimenten hierdoor mogelijk over een paar jaar vervangen zouden kunnen worden.
- d. In tabel 1 van appendix 1 klopt het subtotaal niet qua verdeling tussen mild en matig ongerief (790 mild en 1654 matig ipv 860 mild en 1584 matig).
- e. Bij treatment modalities staat (dit betreft onderzoek met GM muizen): ^{5.1 lid1c}
5.1 lid1c

Wat als dat niet bevestigd wordt? Wordt er dan nog ergens anders naar gekeken?
- f. In appendix 2 staat dat tumorcellen worden gelabeld met luciferase om vervolgens een FACS meting te doen uit te voeren. Dit is niet logisch. De DEC gaat er van uit dat dit per ongeluk is blijven staan nadat de bioluminescentie metingen uit de appendix zijn verwijderd.
- g. Bij de primary outcome (dit betreft onderzoek met de PDX modellen) staat dat de onderzoekers immuunparameters gaan testen. Aangezien er gebruikt wordt gemaakt van NSG muizen lijkt dit, volgens de DEC, geen relevante primaire uitleesparameter.
- h. Her gebruik van anesthesie bij een operatie is geen refinement, maar een standaard onderdeel van de ingreep.
- i. Het is onduidelijk waar de 500 benodigde dieren voor de ontwikkeling van het PDX tumor model op gebaseerd is.



Form Project proposal

- This form should be used to write the project proposal for animal procedures.
- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed.
- For more information on the project proposal, see our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 5.1 lid2h
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. 5.1 lid2h
- 1.3 Provide the title of the project. Mouse models of cutaneous lymphomas; from pathogenesis to therapeutic intervention

2 Categories

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

3 General description of the project

3.1 Background

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

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

Cutaneous lymphomas are cancers of lymphocytes that primarily involve the skin. Each year about 160 new cases are diagnosed in the Netherlands. Once it was recognized that primary cutaneous lymphomas, (malignant lymphomas presenting in the skin without concurrent extracutaneous disease) have a

completely different clinical behavior and prognosis than histologically similar systemic lymphomas involving the skin only secondarily, different types of treatment were initiated. In the last two decades several new types of primary cutaneous T-cell lymphomas (CTCL) and primary cutaneous B-cell lymphomas (CBCL) were described in connection with appropriate aggressiveness in therapy. Correct diagnosis and prognosis are of utmost importance for adequate treatment, i.e. aggressive treatment where needed and avoiding overtreatment of relatively benign lesions needlessly burdening the patient (very different from systemic lymphomas). Clinical studies and formalizing diagnostic criteria [Willemze et al., 2019] by the European Organisation of Research and Treatment of Cancer (EORTC) contributed greatly. We are now pursuing further refinement by objective molecular criteria. Cutaneous T-cell lymphoma (CTCL) is the most common type of cutaneous lymphoma, and typically in early stages presents with red, scaly patches or plaques on the skin (Fig. 1).

5.1 lid1c

5.1 lid1c

CTCL often mimics eczema, psoriasis, or another chronic dermatitis (Fig. 2), causing substantial delays in proper diagnosis and adequate treatment, sometimes by years or even decades when the tumor may still suddenly progress to a fatal stage.

5.1 lid 1 c

5.1 lid 1 c, 5.1 lid 2 h

5.1 lid1c, 5.1 lid2h

5.1 lid1c

5.1 lid1c

5.1 lid1c, 5.1 lid2h

5.1 lid2e, 5.1 lid2h

5.1 lid2e, 5.1 lid2h

Gallardo M, Lee HJ, Zhang X, Bueso-Ramos C, Pagoon LR, McArthur M, Multani A, Nazha A, Manshour T, Parker-Thornburg J, Rapado I, Quintas-Cardama A, Komblau SM, Martinez-Lopez J, Post SM. hnRNP K Is a Haploinsufficient Tumor Suppressor that Regulates Proliferation and Differentiation Programs in Hematologic Malignancies. *Cancer Cell*. 2015 Oct 12;28(4):486-499.

5.1 lid2e, 5.1 lid2h

5.1 lid2e, 5.1 lid2h

Pecorino L. In: *Molecular Biology of Cancer*, 3rd ed. Oxford Univ, Press, 2012.

5.1 lid2e, 5.1 lid2h

3.2 Purpose

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

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

The primary aim of the project is to understand the function of crucial (early) tumor drivers of cutaneous lymphoma.

Eventually, this knowledge may lead to targeted therapies that can efficiently cure patients or prevent progression to malignant stages. To enable an extensive experimental approach to optimize such interventions we aim to develop credible mouse models representing cutaneous T-cell lymphoma.

Here, this overarching aim is broken down into sub-goals which can be addressed by mouse experiments. **First of all:**

5.1 lid1c

5.1 lid1c, 5.1 lid2e

5.1 lid2e, 5.1 lid2h

3.3 Relevance

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

The scientific relevance lies in determining the main signaling pathways that prove to cause cutaneous lymphoma in the mouse models and establish clear parallels with what is observed in patients. 5.1 lid1e

In relation to clinical practice and derived social relevance, well-demarcated molecular diagnosis is important for proper prognosis and for properly matched therapies, especially in early stages to avert further detrimental development. Such diagnosis is currently attained by systematic clinical and immunohistological analyses. This project aims to establish more objective and reliable refined diagnostic and prognostic molecular markers that will better identify patients at risk of a detrimental disease course. Accordingly, such markers will also guide development of novel therapeutic approaches that will further improve treatment of these patients. 5.1 lid2h

3.4 Research strategy

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

The structure of the project is shown in the flow diagram below (Fig. 4), where the different mouse-experimental protocols are dealt with in the stated numbered appendices and refer back to sub-goals in section 3.2:

5.1 lid1c

5.1 lid1c

Fig. 4. Flowchart to outline the structure of the project. See text for explanation.

There are two arms in the project: 5.1 lid1c

5.1 lid1c

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

This project encompasses three main parts, following sub-goals stated under section 3.2

5.1 lid1c

De novo tumors in GEMM: Experiments will be performed on cross-bred transgenic mice together with appropriate control mice. In these experiments the mice will be subjected to protracted topical

5.1 lid1c

[Redacted content]

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

5.1 lid1c

5.1 lid1c

Overall coherence of the program lies in the fact that all components (see fig 5 above) serve to validate (early) drivers and markers of skin lymphomas as well as testing targeted therapy in proper mouse models.

5.1 lid 1 c

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

Serial number	Type of animal procedure
1	Testing of GEMMs: 5.1 lid1c
2	Patient derived xenografts transplant models
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Appendix Description animal procedures

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

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.

5.1 lid2h

1.2 Provide the name of the licenced establishment.

5.1 lid2h

1.3 List the serial number and type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
1	Testing of GEMMs: Induction, progression and targeted treatment of skin lymphomas

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

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

5.1 lid1c

5.1 lid1c

5.1 lid1c

5.1 lid1c

5.1 lid1 c

5.1 lid2e, 5.1 lid2h

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

5.1 lid1 c

5.1 lid1 c

5.1 lid 1 c

5.1 lid1c

End of the experiment:

After reaching the experimental end point by successful treatment or by pre-set treatment duration determined in advance for each experiment, the animals will be killed by standard method according to Annex IV EU Directive 2010/63 with minimal discomfort.

Sample for analysis:

- blood collection via tail vein (volume and frequency according to guidelines Diehl et al., 2001) or under terminal anesthesia (orbital puncture or heart puncture).
- euthanasia by means of an authorized method according to Annex IV EU directive 2010/63 followed by removal of tumor and tissues for analysis in the laboratory.

5.1 lid1c

5.1 lid2e, 5.1 lid2h

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

We will make a distinction between experiments with different outcome parameters.

Tumor induction: We are primarily interested in two main end points upon 5.1 lid1c

Unfortunately, there is no precedent to guide us on this animal model for 5.1 lid1c

Hence, we will first need to perform pilot experiments with modest numbers of animals, i.e. $n = 5$ per group. Next, we can decide on proper mouse numbers and endpoints (e.g. scoring the time laps or number of skin applications required to get to the intended endpoint). If required we can scale up the experiment according to a proper power analysis of the acquired pilot data. In broad outline, we aim to attain both a statistically and biologically significant endpoint, i.e. also with an evident and potentially clinically relevant difference between control and test groups.

For tumor latencies, sizes and number per mouse (real numbers), we aim to have differences of at least 2 SD (standard deviations) between group means (either or not logarithmically transformed to have proper normal distributions in the endpoints). With a required significance of $p < 0.05$ and a power of at least 0.8 we will calculate group size with the standard formula (i.e. $n = 2((Z_{\alpha/2} - Z_b)/2)^2$, with $Z_{\alpha/2} = 1.96$ and $Z_b = -0.84$). We will use two-tailed Student's t-test to determine if two sets of normally distributed data are significantly different from each other (or one-way ANOVA in comparing multiple groups). Log-rank test will be performed for survival and time to progression curves. For all studies, $P < 0.05$ will be considered significant.

Tumor progression analysis: Evolution and progression of tumors will be studied by analysis of tumors generated under standardized conditions based on previous experiments. We aim to analyze in depth (by next generation sequencing, expression profiles, morphology etc.) representative samples of 7 early stage, 7 moderate and 7 late stage tumors for each transgenic mouse model. Data will be analyzed with appropriate software packages to establish significance in differences in expression.

Tumor treatment: A distinction is made between experiments with the outcome parameter (1) analysis of parameters via sampling, whereby the means between groups is compared by t-test, ANOVA or non-parametric test and (2) effectiveness by means of Kaplan-Meier survival analysis (% vs time). For each experiment and outcome parameter, the minimum number of animals needed to achieve a statistically meaningful result between the main test groups will be calculated using appropriate software (e.g. Stata, MedCalc, or CCRB, ClinCalc on line or other for survival statistics). The necessary information about the spread and the expected treatment effect is extrapolated from a pilot experiment or previous comparable experiments or from literature. An average experiment will contain 3-6 different groups (eg untreated, treatment A, treatment B, treatment C, treatment A + B + C). An experiment with (1) an analysis of parameters via sampling will contain 4-7 animals per group, assuming an effect size of at least 150 - 200% (difference/sd) to be demonstrated, a significance threshold of 5% and a power of 80%. An experiment with (2) outcome parameter effectiveness will contain 6-11 mice per group, depending on the expected hazard ratio (between 0.20 and 0.30), with an alpha of 0.05 and a power of 80%. Power calculations for individual experiments will be based on latest information from literature or own experiments on variation and discussed with IvD and bio-statistician.

5.1 lid2e, 5.1 lid2h

B. The animals

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

Mice will be used originating from own breeding facility or obtained from a reputable supplier or institute. The mice will have an age of 6 - 20 weeks at the start of the experiment; preferably age-matched within 4 weeks for each experiment, but no more than 10 weeks age differences. Both males and females can be used initially, but depending on the type of tumors and the rate at which they will develop, a preference for either male or female might emerge.

We aim to target approximately 4 genes of interest in generating transgenic models (5.1 lid2h) and test effectiveness of experimental protocols. First of all, we want to test whether anticipated tumors can indeed be induced and if so, analyse different stages of progression. In the final stage we want to test typically 4 different treatment strategies per model.

A (pilot) experiment for induction of tumors will encompass 5 groups (see figure above in section A) with a maximum of 7 animals per group, ie a maximum of 35 animals per experiment. With 4-GEMMs we arrive at 140 mice. In repeating experiments (on average 2 times for each model) for optimization, possible expansion of group size (anticipated average of $n = 12$) and closer study of tumor progression with further sampling, we get an additional 1440 mice (see table 1). The inflammatory challenge only poses mild discomfort, but its repeat (and repeated drawing blood) could accumulate to moderate discomfort in part of the animals due to itching and incidental wounding by scratching (we expect to keep this well below 50%).

For the final stage of the project with various curative treatments, a typical experiment for each model will contain a maximum of 6 groups (5 treatment options + control) with a maximum of 12 animals per group, ie a maximum of 72 animals per experiment. We envisage 3 modes of delivery (topical - mild discomfort - , injection,- moderate discomfort or drinking water, no discomfort). We will have 4 tumor

models representing different skin lymphoma models. Maximum animals required for this is $72 \times 4 \times 3 = 864$ animals. This brings us to a total of 2444 mice.

Although some of the treatment regimens to raise the tumors (5.1 lid2h) impose mild to moderate discomfort, the treatment of the tumors will most likely cause moderate discomfort. This leads us to conclude that all mice subjected to the protocols discussed in this Appendix will sustain mild to moderate discomfort.

Table 1

	group size	# of groups	# of models	'repeat' x	Sub total	discomfort
Initially, pilot	7	5	4	0	140	50% mild 50% moderate
Follow-up	12x3 [#]	5	4	1	1440	50% mild 50% moderate
Treatment	12	6	4	2*	864	moderate
Subtotals					860 1584	mild moderate
Total # mice					2444	

*different treatments (routes) #expanded group size for sampling of approximately 3 tumor stages (early, moderate and late)

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement: 5.1 lid1c

Even if successful, effects are expected to be different in an intact body due to; among other things, the interaction with the tumor environment and stroma, induction of a systemic immune response and the spread in vivo. Therefore, to gain understanding of the pathogenesis of the novo tumors we need the intact animal to simulate the (inflammatory) conditions under which the cutaneous lymphomas appear to arise. Recreating these conditions in vitro (ex vivo) is not (yet) possible.

The effectiveness of certain (combination) therapies that depend on a systemic immune response should be tested in an intact organism and cannot be replaced.

Reduction: To reduce the number of animals, we have tested and will test and optimise combinations of treatments using appropriate cell lines from the few cutaneous lymphoma cell lines available. Although these cell lines can give a good indication of interesting combinations, unfortunately not all questions can be answered with these models. We deploy a step-wise approach in the project on different levels to minimize the number of mice. Candidate genes and resulting constructs are first tested in vitro.

Moreover, for each model we will start with optimization of dose and time. Only the most promising gene(s), best representing the skin lymphoma entities, will then be tested in vivo for treatment modalities (final stage). Through these steps we aim to use the mice as efficiently as possible and to reduce the number of mice. Deploying standard therapies in the GEMMs for reference, also provides a reference for minimal required effect levels – i.e. new therapies should prove superior - and corresponding group sizes. Using appropriate statistical power calculations, the number of animals in these experiments will be kept to a minimum.

Refinement: The first signs of cutaneous lymphoma development can be seen in the skin at an early stage of tumor development. Thus, the experimental endpoint of the majority of experiments will be 1000mm³ which is well ahead of achieving the maximum cumulative tumor burden of 2000mm³ mentioned in the code of practice animal tests in cancer research. This greatly reduces the level of discomfort. Moreover, the blood of these animals will be screened for systemic dissemination.

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

The experiments will be carried out by experienced, well-trained and qualified personnel. The animals will be accurately monitored and reported. Pain relief methods are applied where and when necessary. In case intra-tumoral injections are used for treatment, this will be done under anaesthesia, according to the applicable Standard Operating Procedures (SOPs).

In order to prevent adverse effects on the pathogen status of the lab, all reagents and cells that go into the mouse will be screened. All biological material is disposed of via regulated procedures.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Anesthesia is used during intra-tumor injections according to the applicable Standard Operating Procedures (SOPs).

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Genotyping requires ear clipping at a young age. Shaving of the skin in advance of inducing skin inflammation causes stress. The skin inflammation itself can cause itch, however when this is noted (e.g. by excessive scratching, treatment of the mice will be put on hold and subsequently toned down. Injections and drawing of blood cause pain and stress. When mice awaken after sedation (necessary for some experiments to avoid licking of topically applied medication) they experience stress.)

Explain why these effects may emerge.

Skin inflammation might cause itch. Excessive scratching is to be avoided by (temporarily) lowering or discontinuing the inflammatory challenge, thus keeping the discomfort to a minimum and - important to this long term experiment - in order to not have scratch wounds (which can cause aspecific tumor promotion).

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

Every effort is made to prevent complications, including through the deployment of experienced staff and working with standard protocols. In addition, the mice are closely monitored during the first 4-6 hours and again 24 hours after anesthesia. Should a complication arise, the animal is immediately taken out of the experiment / killed.

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

Human endpoints:

General: We adhere to the human endpoints as described in the "code of practice animal experiments in cancer research" (20% weight loss, apathy, moribund and, typical risk of ~~for~~ our type of experiments, severe scratching/wounding or overly agitated upon touching treated skin). During the experiments we will consult our local animal welfare panel (IvD) when complications arise. In the rare event (we aim to keep it well below 5%) that one of the human endpoints is reached, e.g. because of an 'explosive' tumor growth/dissemination, the animal will be immediately taken out of the experiment and killed in accordance with Annex IV of the 2010/63 / EU directive. It will also be critically examined (based on the available information from all laboratory animals within the experiment) whether a certain experiment in progress should be stopped in its entirety or not.

The human endpoints differ per model.

The following human endpoints apply to developing and early (sub)cutaneous tumors:

- achieve maximum cumulative tumor size measured in 3 dimensions of 1000 mm³, or in 2 dimensions occupying 300 mm² of skin area.
- severe skin irritation/scratching
- achieving a body condition score of 2 or lower (according to Ullman-Culleré and Foltz, 1999)

For the advanced, late stage models and treatment thereof the following human end points also apply:

- Combination of several factors including the total tumor burden, the course in mouse weight and well-being / behavior and locomotion of the mice, the body condition score (according to Ullman-Culleré and Foltz, 1999).
- The limit is in any case at: The animal loses more than 15% of the body weight in a relatively short time (1-2 days) or the body weight has decreased by more than 20% compared to the own weight at the start of the test , or a body condition score of 2 or lower.

Ullman-Culleré MH, Foltz CJ. Body condition scoring: a rapid and accurate method for assessing health status in mice. Lab Anim Sci. 1999 Jun;49(3):319-23.

Indicate the likely incidence.

<5 and <10% resp, in induction experiments and experimental treatment (more advanced tumors); these are percentages we want to stay well below of and we think are achievable – but with these novel experiments we have no data yet.

K. Classification of severity of procedures

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

Pilot experiments will show at what rate tumors will develop and the necessary number of oxazolone treatments. A (pilot) experiment for induction of tumors will encompass 5 groups with a maximum of 7 animals per group, ie a maximum of 35 animals per experiment. With 4-GEMMs we arrive at 140 mice. In repeating experiments (on average 2 times for each model) for optimization, possible expansion of group size (anticipated average of n = 12) and closer study of tumor progression with further sampling, we get an additional 1440 mice (see table below). The inflammatory challenge only poses mild discomfort, but its repeat (and repeated drawing blood) could accumulate to moderate discomfort in part of the animals due to itching and incidental wounding by scratching (we expect to keep this well below 50%).

For the final stage of the project with various curative treatments, a typical experiment for each model will contain a maximum of 6 groups (5 treatment options + control) with a maximum of 12 animals per group, ie a maximum of 72 animals per experiment. We envisage 3 modes of delivery (topical – mild discomfort - , injection, – moderate discomfort or drinking water, no discomfort). We will have max 4 tumor models representing different skin lymphoma. Maximum animals required for this is 72 x 4 x 3 = 864 animals. This brings us to a total of 2444 mice.

Although some of the treatment regimens to raise the tumors (5.1 lid2h) impose mild to moderate discomfort, the treatment of the tumors will most likely cause moderate discomfort.

	group size	# of groups	# of models	'repeat' x	Sub total	discomfort
Initially, pilot	7	5	4	0	140	50% mild 50% moderate
Follow-up	12x3#	5	4	1	1440	50% mild 50% moderate
Treatment	12	6	4	2*	864	moderate
Subtotals					860 1584	mild moderate
Total # mice					2444	

*different treatments (routes)

#expanded group size for sampling and analysis of approximately 3 tumor stages (early, moderate and late)

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

In order not to cause the tumor burden to become too large and for the removal of organs or samples, it is essential to kill the animals.

After reaching the experimental end point, or treatment duration determined in advance for each experiment, the animals are killed via the usual euthanasia method according to Annex IV EU Directive 2010/63 with minimal discomfort.

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

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

Yes



Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.

5.1 lid2h

1.2 Provide the name of the licenced establishment.

5.1 lid2h

1.3 List the serial number and type of animal procedure.

Serial number

Type of animal procedure

2

Patient Derived Xenograft (PDX) models

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

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

5.1 lid1c

end, molecular, cell biological, immunohistochemical and chemical determinations on the blood, tumor and tissue samples will be obtained.

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

Tumor inoculation

5.1 lid1c

5.1 lid1c

Diehl KH, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal JM, van de Vorstenbosch C; A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *J Appl Toxicol.* 2001 Jan-Feb;21(1):15-23.

Pearson T, Greiner DL, and Shultz LD. Creation of "Humanized" Mice to Study Human Immunity. In *Current protocols in Immunology* ;Chapter 15:Unit 15.21 (2008).

Recio MC, Prieto M, Bonucelli M, Orsi C, Mániez S, Giner RM, Cerda-Nicolas M and Ríos J.-L. Anti-inflammatory activity of two cucurbitacins isolated from *Cayaponia tayuya* roots. *Planta medica.* 2004; 70, 414-420

5.1 lid1c

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

A distinction is made between experiments by the different outcomes (1) analysis of variables via sampling, in which the averages between groups are compared by means of a t-test, ANOVA or non-parametric test and (2) effectiveness by means of Kaplan-Meier survival analysis. For each experiment and outcome variable, the minimum number of animals will be calculated that is needed to achieve a statistically meaningful result between the most important test groups. For this, use is made of sample size calculation software (PS Power and Sample Size Calculations Dupont and Plummer Vanderbilt University) and, if necessary, advice is requested from statisticians. The required information about distribution and the expected treatment effect is extrapolated from a possible pilot experiment or previous comparable experiments or from the literature.

A typical experiment with (1) analysis of variables via sampling will contain 4-7 animals per group, assuming a demonstrable effect size of at least 150 – 200 %, (difference in mean/sd), an unreliability threshold (alpha) of 5% and a power of 80%. An experiment with the outcome variable (2) % tumor clearance ('survival of tumor') will contain 6 - 11 mice per group, depending on the expected hazard ratio (e.g., 0.2 – 0.3), with an alpha of 0.05 and a power of 80%. Power calculations for individual experiments will be based on latest information from literature or own experiments on variation and discussed with IvD and bio-statistician .

B. The animals

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

Animal species:

Since we work with human cells/biopsies in a mouse, we need to use immunodeficient mice, preferentially NSG mice (deficient in T, B and NK cells).

Origin of the animals:

The mice acquired from a registered breeding company or – if available - from our own breeding.

Stages of life:

Mice will be 8 to 20 weeks old at the start of the experiment (preferentially within a 4-week range for each experiment).

Estimated numbers:

Development of PDX tumor models: Approx..500

Treatment:

An average experiment to test treatment will contain 4 different groups.

For example in phase 1, monotherapy, the following groups: mock, dose 1, dose 2, dose 3.

For example in phase 2, combination therapy, the following groups: untreated, treatment A, treatment B, treatment A + B).

For experiments with outcome type 1 (variables) / phase 1: 4 – 7 mice per group.

For experiments with outcome type 2 (survival)/ phase 2: 6 - 11 mice per group.

In phase 1 we want to test 4 different tumor models, with max 5 different therapies (e.g. existing chemotherapy, small molecule inhibitors (cucurbitacin, JAK-STAT inhibitor). We assume $4 \times 5 = 20$ experiments. For an average experiment we need a maximum of $4 \times 7 = 28$ mice. Maximum number of mice required for phase 1: $20 \times 28 = 560$ mice.

In phase 2 we expect to use 4 tumor models, with 3 combinations per tumor model (selected on results obtained in phase 1). We assume $4 \times 3 = 12$ experiments. For an average experiment we need a maximum of $4 \times 11 = 44$ mice. Maximum number of animals for phase 2: $15 \times 44 = 660$ animals

We estimate the maximum number of animals required for the next 4 years at 1720 animals

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement: Primary cutaneous lymphoma cells are extremely difficult to culture in vitro, most likely because a proper environment is lacking. 5.1 lid2h

Results from patient cells in PDX models may then be compared with patient cells co-cultured with in vitro skin models. However, the mouse model will still be preferred to test systemic therapies and/or on systemic adverse side effects.

To reduce the number of animals, we will test and optimise combinations of treatments using the few available cell lines. Although these cell lines can give a good indication of interesting combinations, unfortunately not all questions can be answered with these models. The effects are expected to be different in an intact organism due to, among other things, the accessibility of the tumors, the spread in vivo, the interaction with the tumor environment and stroma, induction of a systemic immune response.

Reduction: A phasing has been applied to the project. New candidate treatments are first tested in vitro on tumor cell lines. Only the best are then tested in vivo, starting with dose and injection route optimization (phase 1). Only the most promising treatment on the optimal dose will then be tested in the combination experiments (phase 2). Through step-wise approach, we aim to use the mice as efficiently as possible and to reduce the number of mice. The minimum number of animals per experiment will be determined with the help of statistical calculations.

Refinement: The first signs of cutaneous lymphoma development can be seen in the skin at an early stage of tumor development. Thus, the experimental endpoint of the majority of experiments will be 1000mm³ which is well ahead of achieving the maximum cumulative tumor burden of 2000mm³ mentioned in the code of practice animal tests in cancer research. This greatly reduces the level of discomfort. Moreover, the blood of these animals will be screened for systemic dissemination.

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

Pain relief will be applied peri-operatively according to the applicable Standard Operating Procedures (SOPs). The experiments will be conducted by experienced, well-trained and authorized personnel. The animals are carefully monitored to identify any complications.

To prevent adverse environmental effects, all reagents and cells that go into the mouse are screened. All biological material is disposed of via regulated procedures.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

Entirely novel experiments – no prior examples to be guided by.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Pain relief will be applied peri-operatively to relieve pain. Anesthesia is used during intra-tumor injections, according to the applicable Standard Operating Procedures (SOPs).

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

The animals may experience stress and / or irritation from problems from the wounds. The stitches (in case of transplanted human biopsies) can be clawed open or gnawed open, which can cause pain or complications, such as the opening of the wound and infection.

Explain why these effects may emerge.

Stress can be caused by the actions (injections of tumor cells, luciferin, injections of drug candidates, blood collection) and disorientation after waking up the anesthesia. Irritation can be caused by the stitches (if applicable).

Stress, itching and natural behavior can cause the stitches to be scratched or nipped and infected.

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

Every effort is made to prevent complications, including through the deployment of experienced staff and working with standard protocols. In addition, the mice are closely monitored during the first 4-6 hours and again 24 hours after surgery. Should a complication arise, the animal is immediately taken out of the experiment / killed.

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

Human endpoints:

General: We adhere to the humane endpoints as described in the "code of practice animal experiments in cancer research". In the unlikely event that one of the humane endpoints is reached, the animal will be

immediately taken out of the experiment and killed in accordance with Annex IV of the 2010/63 / EU directive.

The human endpoints differ per model.

The following human endpoints apply to subcutaneous tumors:

- achieve maximum cumulative tumor size measured in 3 dimensions of 1000 mm³.
- severe skin irritation or if the tumor breaks through the skin.
- achieving a body condition score of 2 or lower (according to Ullman-Culleré and Foltz, 1999)

For the orthotopic models the following human end points apply:

- Combination of several factors including the total tumor burden measured with bioluminescence (maximum intensity reached), the size of the tumor, the location of the tumor (s), the amount of tumors, the course of the mouse weight and the well-being / behavior and the locomotion of the mice, the body condition score (according to Ullman-Culleré and Foltz, 1999).
- The limit is in any case at: The animal loses more than 15% of the body weight in a relatively short time (1-2 days) or the body weight has decreased by more than 20% compared to the own weight at the start of the test , or a body condition score of 2 or lower.

Indicate the likely incidence.

5%

K. Classification of severity of procedures

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

	Species	Number of animals	category (cumulative)	Discomfort (sum of procedures)
Pilots on tumor inoculation & tumor cells passaging thru successive host mice	mouse	150	100% mild	Only inoculation of cells and subsequent observation
Pilots on tumor cutaneous implants	mouse	50	100% moderate	Implant thru surgery under anesthesia and subsequent analgesia
Subcutaneous models, tumor inoculation via injection	mouse	300	100% mild/moderate	Tumor inoculation by injection and measurement Blood collection (each mild but moderate in accumulation)
(sub)cutaneous models with biopsies or tumor inoculation via injection	mouse	1220	100% moderate	Tumor inoculation /transplantation via surgery; Treatment under inhaled or injected anesthesia; Blood collection
Total		1720	10% mild, 90% moderate	

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

In order not to cause the tumor burden to become too large and for the removal of organs or samples, it is essential to kill the animals at the appropriate time (either preventing excessive discomfort or planned beforehand).

After reaching the experimental end point, or treatment duration determined in advance for each experiment, the animals are killed via the usual euthanasia method according to Annex IV EU Directive 2010/63 with minimal discomfort.

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

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

Yes

Naam van het project	Muismodellen voor huidlymfomen: ontwikkeling, karakterisering en mogelijkheden voor behandeling
NTS-identificatiecode	NTS-NL-296327 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.	48
Trefwoorden	huidlymfoom autochtoon muismodel PDX muismodel
Doel(en) van het project	Fundamenteel onderzoek: Oncologie

DOELSTELLINGEN EN VERWACHTE VOORDELEN VAN HET PROJECT

Beschrijf de doelstellingen van het project (bijvoorbeeld het aanpakken van bepaalde wetenschappelijke onduidelijkheden, of wetenschappelijke of klinische behoeften).	<p>Huidlymfomen zijn opvallende, direct zichtbare, vormen van witte bloedcel kankers, die ontstaan in de huid. We hebben door genetische analyse van deze lymfomen uit patiënten aanwijzingen gevonden (mutaties) die de ontwikkeling tot een kanker kunnen verklaren. Nu willen we gebruik maken van (transgene) diermodellen om het gevolg van deze genetische afwijkingen in witte bloedcellen in de huid nauwkeurig vast te stellen. Daarnaast willen we gebruik gaan maken van transplantatie modellen waarbij menselijke huidlymfoomcellen in geschikte muizenmodellen gebracht worden.</p> <p>In beide modellen zullen we testen of nieuwe medicijnen werkzaam zijn.</p>
Welke potentiële voordelen kan dit project opleveren? Leg uit hoe de wetenschap vooruit kan worden geholpen of mensen, dieren of het milieu uiteindelijk voordeel kunnen hebben bij het project. Maak, waar van toepassing, een onderscheid tussen voordelen op korte termijn (binnen de looptijd van het project) en voordelen op lange termijn (die mogelijk pas worden bereikt nadat het project is afgerond).	<p>Wetenschappelijk Er worden muismodellen gemaakt waarin de muizen huidlymfomen krijgen die erg lijken op die van de mens. Hiermee kunnen we meer inzicht krijgen in lymfoomontwikkeling.</p> <p>Maatschappelijk Behandelmogelijkheden voor huidlymfomen zijn zeer beperkt en hebben vaak ernstige bijwerkingen die de kwaliteit van leven aantasten. Dit project zal hopelijk bijdragen aan het vinden van methoden die bij behandeling van huidlymfomen effectief (en bij voorkeur al in een vroeg stadium van de ziekte) ingezet kunnen worden.</p>

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>De transgene muizen krijgen op jonge leeftijd een oorknip voor genotypering, ze worden behandeld met een stofje op de huid voor het opwekken van een (eczeem-achtige) huidontsteking en met een stof die zorgt voor een eenmalige genetische verandering in immuun cellen in de huid.</p> <p>In andere muizen worden huidlymfoomcellen getransplanteerd. In deze transplantatiemodellen worden tumorcellen van patiënten ingebracht in de huid d.m.v. eenmalige injectie of via een chirurgische ingreep (eenmalig).</p> <p>Muizen krijgen vervolgens medicijnen toegediend: op de huid, in de huid via injectie of via het drinkwater.</p> <p>Ook zal er bij muizen bloed worden afgenomen voor het meten van bloedwaarden.</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>De oorknip duurt kort pijn, het scheren voorafgaand aan opwekken van een huidontsteking geeft kort stress. De huidontsteking kan gepaard gaan met jeuk, als dit geconstateerd wordt (bijv. door krabgedrag) wordt de handeling onmiddellijk gestaakt en pas weer voortgezet als jeuk is verdwenen. Injecties en bloedafname geven kort pijn en stress. Sommige dieren worden verdoofd (bijv. bij behandeling om aflikken te voorkomen, injecties, implanteren van tumormateriaal) het wakker worden geeft stress. In een uitzonderlijk geval kunnen tumoren uitzaaien zonder dat het opgemerkt wordt in het bloedbeeld; dit gaat gepaard met gewichtsverlies. Bij gewichtsverlies van > 20% wordt het dier gedood. De meeste handelingen en het ontstaan van tumoren geven licht ongerief, maar meerdere combinaties en/of herhalingen worden als matig beoordeeld. De mate van ongerief in dit project is als volgt verdeeld: Licht: 25% Matig: 75%</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>4014</td> <td>0</td> <td>860</td> <td>3154</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>	Soort:	Totaal aantal	Geraamde aantallen naar ernstgraad				Terminaal	Licht	Matig	Ernstig	Muizen (<i>Mus musculus</i>)	4014	0	860	3154	0
Soort:	Totaal aantal			Geraamde aantallen naar ernstgraad													
		Terminaal	Licht	Matig	Ernstig												
Muizen (<i>Mus musculus</i>)	4014	0	860	3154	0												
<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>Alle dieren worden na afloop van het experiment gedood. Er worden weefsels uitgenomen voor analyse in het laboratorium.</p>																

TOEPASSING VAN DE DRIE V'S

<p>1. Vervanging Beschrijf welke diervrije alternatieven op dit gebied voorhanden zijn en waarom zij niet voor het project kunnen worden gebruikt.</p>	<p>Combinaties van behandelingen worden geoptimaliseerd met behulp van cellijnen (eigen werk) of zijn bekend vanuit de (medische) wetenschappelijke literatuur. Maar de effecten in een levende muis met huidlymfoom kunnen anders zijn dan in een proefdiervrij alternatief of voor andere ziektebeelden in de mens. Dit komt onder andere vanwege de toegankelijkheid van de tumoren (een medicijn moet door de huid kunnen gaan) het samenspel tussen tumorcellen en de tumoromgeving en (wellicht meest belangrijke) een functionerend afweersysteem.</p>
<p>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.</p>	<p>Er worden alleen modellen gebruikt op basis van genetische afwijkingen die in de meeste huidlymfoom patiënten worden terug gevonden en dus uiterst relevant zijn voor de ziekte. Daarnaast kan op basis van literatuur, eigen onderzoek en ervaring bij de mens een goede inschatting worden gemaakt van een minimaal vereist behandelingseffect en de spreiding daarin. Op grond hiervan zal, in combinatie met statistische berekeningen, het aantal dieren in een experiment tot een minimum beperkt worden.</p>
<p>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.</p>	<p>Het opwekken van een huidontsteking kan gepaard gaan met jeuk. Als dit geconstateerd wordt (bijv. door krabgedrag) wordt de handeling onmiddellijk gestaakt en pas weer voortgezet als jeuk is verdwenen. We gebruiken pijnstilling rondom operaties. Als we veel tumorcellen aantreffen in het bloed worden de dieren gedood.</p>
<p>Licht de keuze van de soorten en de bijbehorende levensstadia toe</p>	<p>Vanwege de genetische overeenkomst met de mens, de korte generatietijd, de gecontroleerde huisvesting en de mogelijkheid van genetische modificatie is de muis het meest gebruikte proefdiermodel voor kanker. De doelstelling van dit project is om het ontstaan van huidlymfoom zo nauwkeurig mogelijk na te bootsen in de volwassen muis. Aangezien de eerste tekenen van huidlymfoomontwikkeling in een vroeg stadium al met het blote oog kunnen worden gezien zullen veel van onze onderzoeksvragen al beantwoord kunnen worden voordat grote tumoren ontstaan.</p>

VOOR EEN BEOORDELING ACHTERAF GESELECTEERD PROJECT

Project geselecteerd voor BA?	nee
Termijn voor BA	
Reden voor de beoordeling achteraf	
Bevat ernstige procedures	
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 03 juni 2021

Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD20209584

Instelling: 5.1 lid2h
 Onderzoeker: 5.1 lid2e
 Project: Maus models of cutaneous lymphomas: from pathogenesis to therapeutic intervention
 Aanvraagnummer: AVD20209584
 Betreft: Nieuwe aanvraag
 Categorieën: Fundamenteel onderzoek
 Translationeel of toegepast onderzoek

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

Proces	
	<p>Er zijn geen vragen gesteld aan de DEC.</p> <p>De volgende vragen zijn aan de aanvraag² gesteld: ¹</p> <ul style="list-style-type: none"> - Gezien de start- en einddatum op het aanvraagformulier, vragen wij u of u deze wilt aanpassen? - Purpose of the project bij de NTS (2de tabblad) is niet gelijk aan dat van het projectvoorstel bij 2.1. Gelieve dit consistent te maken³ - Kunt u in bijlage 3.4.4.1 de sub total en subtotals narekenen in uw tabel onder B en K? ⁴ - Kunt u in bijlage 3.4.4.1 onder K het cumulatief ongerief van dieren weergeven in percentages per ongeriefcategorie? <p>5.2 lid1</p> <p>5.2 lid1</p> <p>- In bijlage 3.4.4.2 staat bij de 'estimated numbers Development of PDX tumor models: Approx.. 500'. Kunt u een onderbouwing geven hoe u aan</p>

Overzicht van opmerkingen bij AVD20209584b_AdviesNotaCCD_5.1 lid2e.pdf

Pagina: 1

Nummer: 1 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Sticky Note Datum: 7-6-2021 15:03:46

Om in lijn met de DEC te blijven (Ze stellen ook als voorwaarde dat ze deze onduidelijkheden opgehelder willen hebben):
In het projectvoorstel staat: "Most treatment strategies have already been optimized for humans". Deze opmerking in een onderzoeksvorstel naar nieuwe behandelingen schept verwarring. Kunt u deze zin verhelderen of verwijderen uit het projectvoorstel?

Het is onduidelijk hoe zeldzaam de varianten zijn die nu onderzocht worden. Kunt u de incidentie, mortaliteit en overlevingskansen van deze varianten in uw aanvraag benoemen?

U geeft aan bezig te zijn met het ontwikkelen van *in vitro* modellen, maar het wordt niet duidelijk welke dierexperimenten hierdoor mogelijk over een paar jaar vervangen zouden kunnen worden. Kunt u dit verhelderen?

Nummer: 2 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Sticky Note Datum: 7-6-2021 14:08:37

Specifieker neerzetten waarom je dit vraagt. Dus even uitleggen dat de aanvraag nu van datum tot datum is aangevraagd. De CCD realiseert zich dat uw hierdoor een jaar minder de tijd hebt om uw onderzoek uit te voeren. Als u wilt dat de begin en einddatum van uw onderzoek wordt aangepast dient een nieuw getekend aanvraagformulier bij de CCD in te dienen met daarop de nieuwe data.

5.2 lid1

Nummer: 3 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Sticky Note Datum: 7-6-2021 14:28:29

Altijd uitleggen waarom je iets vraagt.

Dus in bijlage 1 van de dierproeven geeft u aan 2444 dieren te willen gebruiken. Wanneer de aantallen in de tabel onder B en K bij elkaar worden opgeteld is de soms hier echter geen 2444 van. Kunt u de aantallen narekenen en kloppend maken in bijlage 1 van de dierproeven?

Nummer: 4 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Sticky Note Datum: 7-6-2021 14:37:00

Om mee te gaan met de onduidelijkheden die er nog voor de DEC zijn: u zegt in bijlage 1 van de dierproeven het volgende: 5.1 lid1c
Kunt u verhelderen wat het voor uw onderzoek betekent wanneer dit niet bevestigd wordt?

Nummer: 5 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Highlight Datum: 7-6-2021 14:28:09

Nummer: 6 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Sticky Note Datum: 7-6-2021 14:27:56

5.2 lid1

Nummer: 7 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Sticky Note Datum: 7-6-2021 14:49:09

U geeft in bijlage 2 van de dierproeven aan bij de primary outcome om immuunparameters te gaan testen. U maakt in deze bijlage echter gebruik van een immuundeficiente muis. Kunt u onderbouwen waarom u dit een relevante primaire uitleesparameter voor uw onderzoek vindt?

In bijlage 2 van de dierproeven staat dat tumorcellen worden gelabeld met luciferase om vervolgens een FACS meting te doen uit te voeren. Dit is niet logisch. Kunt u dit verhelderen of uit de aanvraag halen?

	<p>dit aantal dieren bent gekomen?</p> <p>- Kunt u in bijlage 3.4.4.2 aangeven of u mannelijke en/of vrouwelijke dieren gebruikt voor uw proef? 1</p> <p>Vragen over de NTS: 1</p> <p>- De NTS bevat technisch taalgebruik (bijvoorbeeld transgene, genotypering en genetische modificatie) waardoor deze niet goed navolgbaar is voor het algemeen publiek. Wij verzoeken u om de technische termen in de NTS te vervangen door meer gangbaar taalgebruik of deze toe te lichten.</p> <p>- In bijlage 3.4.4.1 geeft u aan dat er pilots plaats vinden en hoe ze bijdrage aan dit onderzoek. Dit wordt niet vermeld in uw NTS. Kunt u dit alsnog toevoegen?</p> <p>- In de NTS wordt niet duidelijk dat het over een 2 specifieke en relatief zeldzame huidlymfomen gaat. Kunt u dit alsnog toelichten?</p> <p>- In de NTS is het ongerief bij de dieren 860 mild en 3154 moderate. Dit komt niet overeen met de bijlage 3.4.4.1 en 3.4.4.2. Kunt u de aantallen in de NTS aanpassen zodat deze overeenkomen met de bijlages?</p>			
Naam proef	Diersoort	Stam	Aantal dieren	Herkomst
3.4.4.1 Testing of GEMMs: Induction, progression and targeted treatment of skin lymphomas				
	Muizen (Mus musculus)		2.444	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn
3.4.4.2 Patient Derived Xenograft (PDX) models				
	Muizen (Mus musculus)	immunodeficient mice (NSG)	1.720	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn

Pagina: 2

Nummer: 1 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Sticky Note Datum: 7-6-2021 14:13:58
De DEC had wel wat puntjes over de NTS, 5.2 lid1 (vraag C21 uit het advies).

U zegt bij vermindering het volgende: "er worden alleen modellen gebruikt op basis van genetische afwijkingen die in de meeste huidlymfoom patiënten worden terug gevonden". Dit klopt niet aangezien ze ook een model voor zeer zeldzame agressieve tumoren willen gebruiken. Kunt u dit stuk in de NTS kloppend maken met het projectvoorstel?

Nummer: 2 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Sticky Note Datum: 7-6-2021 14:18:11
5.2 lid1

Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

3.4.4.1 Testing of GEMMs: Induction, progression and targeted treatment of skin lymphomas

Muizen (*Mus musculus*) Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt. Citaat:
Both males and females can be used initially, but depending on the type of tumors and the rate at which they will develop, a preference for either male or female might emerge.

3.4.4.2 Patient Derived Xenograft (PDX) models


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


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

2 DEC advies


DEC-advies	<p>Citaat C4 (doel): Het primaire onderzoeksdoel is het vergaren van kennis over vroege pathogenese van primaire huidlymfomen. Het uiteindelijke doel van het totale onderzoeksvoorstel is het vinden van 'aangrijpingspunten' voor nieuwe behandelstrategieën voor patiënten met primaire huidlymfomen. DEC leden vinden dat er een duidelijke relatie bestaat tussen het directe en het uiteindelijke doel; het fundamentele onderzoek naar de pathogenese van primaire huidlymfomen biedt wellicht translationeel perspectief als er aangrijpingspunten worden gevonden voor nieuwe therapieën. Daarmee ligt het uiteindelijke doel in het verlengde van het primaire doel. DEC leden vinden het directe doel van het voorgestelde onderzoek relevant en gerechtvaardigd binnen de context van het onderzoek van primaire huidlymfomen; er ontbreekt nog essentiële informatie over de pathogenese die mogelijk gebruikt kan worden om nieuwe behandelopties te vinden.</p> <p>Citaat C13 (HEP): Naar mening van de DEC zijn de humane eindpunten voldoende duidelijk bepaald. Er zijn klinische observaties, zoals afwijkend gedrag, afwijkingen in de locomotie, duidelijke afname van lichaamsgewicht en de body condition score (volgens Ullman-Culleré and Foltz, 1999) die het HEP markeren. De opgegeven incidentie van het bereiken van een humaan eindpunt is relatief laag, <5% en < 10%. Deze inschatting wordt door het ontbreken van ervaring met deze proefopzet niet onderbouwd maar de DEC leden zien geen reden om te twijfelen aan de genoemde percentages.</p> <p>Citaat C18 (geslachten):</p>
-------------------	--


Pagina: 3

 Nummer: 1 Auteur: **5.1 lid2e** Onderwerp: Sticky Note Datum: 7-6-2021 14:19:34
Niet in de aanvraag vermeld, nog vragen aan de aanvrager.

 Nummer: 2 Auteur: **5.1 lid2e** Onderwerp: Sticky Note Datum: 7-6-2021 14:49:44
Citaat C1:

De DEC leden hebben de indiener twee maal vragen gesteld en kritische opmerkingen gemaakt over het onderzoeksvoorstel. De aanvrager heeft naar aanleiding hiervan de documenten wel flink aangepast maar volgens de DEC leden staan er ook in deze derde versie nog zaken die onduidelijk zijn of beter verwoord hadden moeten worden. De DEC heeft besloten om ondanks genoemde tekortkomingen wel een ethische afweging te maken omdat er wel voldoende duidelijkheid verkregen is over: 1. De gevolgen voor en de belasting van de proefdieren, 2. De mogelijke opbrengst volgens de aanvragers en 3. De haalbaarheid van het onderzoeksvoorstel. Daarmee voldoet het voorstel volgens de DEC aan de definitie van een project, het vertoont overeenkomst met voorbeeld 1 uit de handleiding. Daarnaast heeft de DEC besloten om in het DEC advies naast de uitkomst van de ethische afweging ook de gesignaleerde onduidelijkheden te vermelden; deze zijn vermeld bij E-3.

 Nummer: 3 Auteur: **5.1 lid2e** Onderwerp: Sticky Note Datum: 7-6-2021 14:51:09
Wat wil je met dit citaat zeggen? Ik zou hem weghalen.

 Nummer: 4 Auteur: **5.1 lid2e** Onderwerp: Highlight Datum: 7-6-2021 14:49:45

De onderzoeker geeft in de eerste appendix aan dat "Both males and females can be used initially, but depending on the type of tumors and the rate at which they will develop, a preference for either male or female might emerge". In de tweede appendix wordt voor het gebruik van de NSG muizen geen sekse vermeld. De DEC gaat ervan uit dat voor het gehele onderzoek mannetjes en vrouwtjes muizen in gelijke aantallen worden gebruikt en constateert dat er geen duidelijk onderbouwing wordt geleverd waarom het gebruik van alleen mannen of alleen vrouwen gerechtvaardigd is.

Citaat C21 (NTS):

De niet-technische samenvatting is een compacte weergave van het project. De NTS bevat nog wel slordigheden ("de oorknip duurt kort pijn") en tegenstrijdigheden. (Bij vermindering staat: "er worden alleen modellen gebruikt op basis van genetische afwijkingen die in de meeste huidlymfoom patiënten worden terug gevonden". Dit klopt niet aangezien ze ook een model voor zeer zeldzame agressieve tumoren willen gebruiken). Tenslotte is de NTS, voor de doelgroep, niet overal begrijpelijk geformuleerd.

Citaat Advies 3:

Er is tijdens de derde beoordeling en bespreking van dit projectvoorstel in de DEC vergadering geconstateerd dat ook de derde versie van de aanvraag nog steeds slordigheden en onduidelijkheden bevat die nog niet gecorrigeerd zijn. Niettemin heeft de DEC besloten om wel een ethische afweging te maken. Zaken die niet duidelijk en/of verwarrend zijn:

- a. In het projectvoorstel staat: "Most treatment strategies have already been optimized for humans". Deze opmerking in een onderzoeksvoorstel naar nieuwe behandelingen schept verwarring.
- b. Het is onduidelijk hoe zeldzaam de varianten zijn die nu onderzocht worden.
- c. Onderzoeksgroep is bezig met het ontwikkeling van in vitro modellen, maar het wordt niet duidelijk welke dierexperimenten hierdoor mogelijk over een paar jaar vervangen zouden kunnen worden.
- d. In tabel 1 van appendix 1 klopt het subtotaal niet qua verdeling tussen mild en matig ongerief (790 mild en 1654 matig ipv 860 mild en 1584 matig).
- e. Bij treatment modalities staat (dit betreft onderzoek met GM muizen): "We anticipate constitutive activation of the JAK/STAT pathway or NFkB pathway in tumor cells and, when confirmed by our genetic/FACS analysis, we will test small molecule inhibitors". Wat als dat niet bevestigd wordt? Wordt er dan nog ergens anders naar gekeken?
- f. In appendix 2 staat dat tumorcellen worden gelabeld met luciferase om vervolgens een FACS meting te doen uit te voeren. Dit is niet logisch. De

DEC gaat er van uit dat dit per ongeluk is blijven staan nadat de bioluminescentie metingen uit de appendix zijn verwijderd.

g. Bij de primary outcome (dit betreft onderzoek met de PDX modellen) staat dat de onderzoekers immuunparameters gaan testen. Aangezien er gebruikt wordt gemaakt van NSG muizen lijkt dit, volgens de DEC, geen relevante primaire uitleesparameter.

h. Her gebruik van anesthesie bij een operatie is geen refinement, maar een standaard onderdeel van de ingreep.

i. Het is onduidelijk waar de 500 benodigde dieren voor de ontwikkeling van het PDX tumor model op gebaseerd is.

Ethische afweging van de DEC:

1. Rechtvaardigt het onderzoek, naar de vroege pathogenese van primaire huidlymfomen en naar nieuwe behandelmethoden van deze huidtumoren, de inzet van 4164 muizen gegeven het feit dat ca. 75% van deze dieren cumulatief matig en 25% cumulatief licht ongerief zullen ondervinden ?

2. Het voorgestelde onderzoeksproject met 4164 proefdieren is bedoeld om nieuwe kennis te vergaren omtrent een bijzondere vorm van huidkanker bij mensen, primaire huidlymfomen. De incidentie is laag te noemen, 160 nieuwe gevallen per jaar in Nederland, maar het ziektebeeld is veelal ernstig mede omdat de diagnose pas laat wordt gesteld waardoor de patiënten geen tijdige adequate behandeling krijgen. Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: het proefdieronderzoek is, in absolute zin, nadelig voor de muizen als gevolg van het te verwachten cumulatieve matige ongerief en de schending en aantasting van de fysieke en gedragsmatige integriteit van het dier. Daarnaast worden de dieren in het kader van het experiment gedood. Waarden die voor onderzoekers bevorderd kunnen worden: een mogelijk voordeel door het vergaren van meer inzicht in de pathogenese en oncogene pathways van primaire huidlymfomen. Nieuwe wetenschappelijke kennis kan resulteren in publicaties die de carrière mogelijkheden van de wetenschappers kunnen bevorderen. Waarden die voor patiënten met primaire huidlymfomen bevorderd kunnen worden: een mogelijk groot voordeel omdat de prognose voor patiënten met primaire huidlymfomen kan verbeteren als in een vroeg stadium een effectieve behandeling kan worden ingezet. Waarden die voor de samenleving bevorderd kunnen worden: een mogelijk groot voordeel omdat het voorgestelde onderzoek een behandelingsstrategie kan gaan opleveren waarmee de incidentie en de ernst van primaire huidlymfomen kan worden verminderd. Dit zal leiden tot een vermindering van de ziektelast, afname van de directe kosten in de gezondheidszorg en tot

een afname van de indirecte kosten door vermindering van ziekteverzuim en arbeidsongeschiktheid.

De ethische afweging door DEC leden levert geen consensus op, zes DEC leden zijn van mening dat de belangen van de patiënten (en hun naasten), de samenleving en de onderzoekers zwaarder wegen dan de belangen van de proefdieren. Daarentegen vindt één DEC lid dat de mogelijke opbrengst van het onderzoek niet opweegt tegen het te verwachten ongerief bij de muizen. De zes DEC leden vinden het verkrijgen van meer inzicht in de pathogenese van primaire huidlymfomen van groot maatschappelijk en wetenschappelijk belang; het gebruik van proefdieren is hierbij onvermijdelijk. Deze zes DEC leden geven een positief advies en het zevende DEC lid geeft een negatief advies.

3. Zes DEC leden zijn overtuigd van het belang van de doelstellingen van dit project. Naar inziens van deze DEC leden beschrijft de aanvraag belangrijk onderzoek, dat zowel maatschappelijk als ook wetenschappelijk zeer relevant is. Deze DEC leden zijn van mening dat:

- de waarden die voor de patiënten, de samenleving en de onderzoekers bevorderd kunnen worden zwaarder wegen dan de waarden die voor de proefdieren in het geding zijn
- de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstelling en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project
- dat de onderzoeksgroep voldoende kennis en ervaring heeft om met de gekozen onderzoeksstrategie en met de voorgestelde dierproeven de doelstelling te behalen en dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om het ongerief van de dieren te beperken.
- de doelstelling niet zonder het gebruik van proefdieren behaald kan worden en acht het gebruik van proefdieren en het daarmee samenhangende ongerief bij de dieren ethisch gerechtvaardigd.

De motivatie van het negatieve advies van het zevende DEC lid:

Bij aanvraag AVD9584 kom ik tot een negatief advies, d.w.z. het advies om de voorgenomen dierproeven niet toe te staan. Mijn overwegingen hierbij zijn als volgt:

- In de projectaanvraag komt naar voren dat men zeldzame vormen van cutane lymfomen wil onderzoeken, maar het blijft onduidelijk hoe zeldzaam deze cutane lymfomen precies zijn. In antwoord op onze vragen is wel genoemd dat één van de vier varianten die men wil onderzoeken gemiddeld eenmaal per vier jaar in de Nederlandse kliniek wordt gezien. Voor het onderzoek naar deze (en iedere andere onderzochte) variant wil men wel 1041 muizen opofferen. Ik vraag me

ernstig af of het ongerief (dat weliswaar op maximaal 'matig' is ingeschat) voor deze muizen opweegt tegen het beperkte aantal patiënten met deze variant van de aandoening. Natuurlijk zijn er wereldwijd beduidend meer patiënten met dit type cutane lymfoom dan alleen in Nederland, maar daartegenover staat ook (zoals altijd) een kans dat het proefdieronderzoek überhaupt geen klinisch relevante toepassingen oplevert. De in onze DEC besproken suggestie dat ieder van deze vier varianten onderzocht moet worden om een totaalbeeld van de aandoening te krijgen, of dat onderzoek naar de meer zeldzame varianten wetenschappelijk of klinisch belangrijke resultaten voor andere varianten gaat opleveren, vind ik erg speculatief. Alles bij elkaar ben ik er niet van overtuigd dat het voorgenomen proefdieronderzoek naar de meest zeldzame varianten van deze aandoening gerechtvaardigd is. (Zeker in samenhang met het volgende punt.)

- De onderzoekers maken duidelijk dat ze ook aan proefdiervrije alternatieven voor dit onderzoek werken. In antwoord op onze vraag in welk stadium het in vitro onderzoek zich bevindt en wanneer het in vivo onderzoek zou kunnen vervangen, hebben de onderzoekers geantwoord dat ze niet verwachten binnen 2 jaar de in vitro modellen ontwikkeld en gevalideerd te hebben. Zeker voor zover het erg zeldzame aandoeningen betreft, zou je wat mij betreft gewoon 2 jaar moeten wachten tot deze modellen wel ontwikkeld en gevalideerd zijn. Maar het wordt ook niet erg duidelijk in hoeverre deze in vitro alternatieven echte alternatieven zullen zijn.

De onderzoekers schrijven hierover in het project proposal: "Even if successful, effects are expected to be different in an intact body due to; among other things, the interaction with the tumor environment and stroma, induction of a systemic immune response and the spread in vivo. Therefore, to gain understanding of the pathogenesis of the novo tumors we need the intact animal to simulate the (inflammatory) conditions under which the cutaneous lymphomas appear to arise. Recreating these conditions in vitro (ex vivo) is not (yet) possible." Hierin wordt niet duidelijk gemaakt welke delen van het voorgestelde onderzoek wel met in vitro modellen vervangen zou kunnen worden, en wat dit betekent voor het benodigde aantal muizen. Als het punt is dat helemaal niets van het voorgestelde onderzoek door in vitro onderzoek vervangen zou kunnen worden, dan is mij onduidelijk waarom de ontwikkeling van deze in vitro modellen überhaupt door de onderzoekers genoemd wordt. (Het werd al in het project proposal genoemd voordat we er als DEC een vraag over stelden.)

Kortom, ik ben er niet van overtuigd dat het proefdieronderzoek naar alle vier de varianten van cutane lymfomen gerechtvaardigd is, gelet op de zeldzaamheid van sommige van deze varianten en gelet op de ontwikkeling van dierproefvrije alternatieven. Misschien hadden de

onderzoekers mij kunnen overtuigen als ze gericht op deze punten waren ingegaan. Aangezien we als DEC echter besloten hebben niet voor een derde maal onze vragen aan de onderzoekers voor te leggen, hanteer ik het 'nee, tenzij' principe door een negatief advies af te geven.

De DEC heeft extern advies ingewonnen bij

- de aanvrager is om aanvullingen gevraagd
- De DEC heeft bij de aanvrager vragen gesteld over:
- Projectvoorstel: de subdoelen, de meerwaarde van muismodel 1 ten opzichte van muismodel 2, het stadium van het in vitro onderzoek, de go/no-go momenten
 - Appendix 1: de behandeling, cumulatief ongerief, go/no-go momenten, toepassing DNFB en huisvesting
 - Appendix 2: de reinoculatie/retransplantatie van tumor cellen, statische onderbouwing voor de aantallen, gebruik pups, de behandeling, cumulatieve ongerief, mogelijkheid om handelingen te combineren, het gebruikte adjuvans, het toepassen van de grimace scale, hoe bioluminescentie wordt toegepast bij de xenografts om tumor groei te monitoren, huisvesting en de humane eindpunten.
 - NTS verduidelijken

Het DEC advies is Positief

Het uitgebrachte advies is ¹ gebaseerd op consensus.
Zie ethische afweging punt 5

3 Kwaliteit DEC advies

Kwaliteit DEC-advies

Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld. Bij de beantwoording van de beoordelingsvragen verstrekt u over het algemeen een heldere onderbouwing. U geeft in het advies op heldere wijze de discussies weer die in de DEC hebben plaatsgevonden. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen.

5.2 lid1

Pagina: 8

Nummer: 1 Auteur: **5.1 lid2e** Onderwerp: Sticky Note Datum: 7-6-2021 14:52:24

E3

Nummer: 2 Auteur: **5.1 lid2e** Onderwerp: Sticky Note Datum: 7-6-2021 14:55:05


Ik zou nog het meerderheidsstandpunt benoemen **5.2 lid1** . Iets van De CCD waardeert het zeer dat u helder en navolgbaar in advies laat zien hoe het advies met een meerderheidsstandpunt tot stand is gekomen, en wat daarbij de afwegingen waren. De CCD kon goed volgen hoe de discussie is verlopen

4 Inhoudelijke beoordeling


Belangen- verstrengeling	5.1 lid2e
Doelstelling Doelstelling	<p>Citaat: The primary aim of the project is to understand the function of crucial (early) tumor drivers of cutaneous lymphoma.</p> <p>Eventually, this knowledge may lead to targeted therapies that can efficiently cure patients or prevent progression to malignant stages. To enable an extensive experimental approach to optimize such interventions we aim to develop credible mouse models representing cutaneous T-cell lymphoma.</p> <p>Here, this overarching aim is broken down into sub-goals which can be addressed by mouse experiments. First of all:</p> 5.1 lid1c


5.1 lid 1 c

Pagina: 10

 Nummer: 1 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Sticky Note Datum: 7-6-2021 14:57:22
Weghalen

 Nummer: 2 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Highlight Datum: 7-6-2021 14:56:44

 Nummer: 3 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Highlight Datum: 7-6-2021 14:57:24

Wetenschappelijk en maatschappelijk belang	<p>Citaat: The scientific relevance lies in determining the main signaling pathways that prove to cause cutaneous lymphoma in the mouse models and establish clear parallels with what is observed in patients. The</p> <p>5.1 lid 1 c</p> <p>In relation to clinical practice and derived social relevance, well-demarcated molecular diagnosis is important for proper prognosis and for properly matched therapies, especially in early stages to avert further detrimental development. Such diagnosis is currently attained by systematic clinical and immune-histological analyses. This project aims to establish more objective and reliable refined diagnostic and prognostic molecular markers that will better identify patients at risk of a detrimental disease course. Accordingly, such markers will also guide development of novel therapeutic approaches that will further improve treatment of these patients. This cancer type is relatively rare, 5.1 lid 2h</p> <p>5.1 lid 2h</p>
Onderbouwing wetenschappelijk en maatschappelijk belang	<p>Het belang is voldoende uitgewerkt</p> <p> ¹</p>
<p>Wetenschappelijke kwaliteit Kwaliteit aanvrager/ onderzoeksgroep en onderzoek</p>	<p>Het secretariaat heeft geen reden te twijfelen aan de kwaliteit van de aanvragers en het onderzoek.</p>

Nummer: 1 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Sticky Note Datum: 7-6-2021 14:58:36

Citaat C7 uit het DEC advies:

5.1 lid2h

Naar inziens van de DEC beschikt de betrokken onderzoeksgroep ook over voldoende kennis van proefdieren en over ervaring met dierexperimenteel onderzoek om te kunnen voldoen aan de 3V-beginselen en om zoveel mogelijk te voorkomen dat mens, dier en milieu negatieve effecten ondervinden als gevolg van de voorgestelde dierproeven. Daarbij is de proefdierfaciliteit van de vergunninghouder goed uitgerust en zijn de biotechnici bekwaam in het verzorgen van muizen en het monitoren van gezondheidsproblemen.

en dan: Het secretariaat heeft geen reden te twijfelen aan de kwaliteit van de aanvragers en het onderzoek.

3V's

Vervanging	<p>3.4.4.1 Testing of GEMMs: Induction, progression and targeted treatment of skin lymphomas: Citaat:</p> <p>5.1 lid2h, 5.1 lid1c</p> <p>5.1 lid2h, 5.1 lid1c Even if successful, effects are expected to be different in an intact body due to; among other things, the interaction with the tumor environment and stroma, induction of a systemic immune response and the spread in vivo. Therefore, to gain understanding of the pathogenesis of the novo tumors we need the intact animal to simulate the (inflammatory) conditions under which the cutaneous lymphomas appear to arise. Recreating these conditions in vitro (ex vivo) is not (yet) possible. The effectiveness of certain (combination) therapies that depend on a systemic immune response should be tested in an intact organism and cannot be replaced.</p>
	<p>3.4.4.2 Patient Derived Xenograft (PDX) models: Citaat:</p> <p>5.1 lid2h, 5.1 lid1c</p> <p>5.1 lid2h, 5.1 lid1c Results from patient cells in PDX models may then be compared with patient cells co-cultured with in vitro skin models. However, the mouse model will still be preferred to test systemic therapies and/or on systemic adverse side effects. To reduce the number of animals, we will test and optimise combinations of treatments using the few available cell lines. Although these cell lines can give a good indication of interesting combinations, unfortunately not all questions can be answered with these models. The effects are expected to be different in an intact organism due to, among other things, the accessibility of the tumors, the spread in vivo, the interaction with the tumor environment and stroma, induction of a systemic immune response.</p>

Verminderen	
	<p>3.4.4.1 Testing of GEMMs: Induction, progression and targeted treatment of skin lymphomas: Citaat: To reduce the number of animals, we have tested and will test and optimise combinations of treatments using appropriate cell lines from the few cutaneous lymphoma cell lines available. Although these cell lines can give a good indication of interesting combinations, unfortunately not all questions can be answered with these models. We deploy a step-wise approach in the project on different levels to minimize the number of mice. Candidate genes and resulting constructs are first tested in vitro. Moreover, for each model we will start with optimization of dose and time. Only the most promising gene(s), best representing the skin lymphoma entities, will then be tested in vivo for treatment modalities (final stage). Through these steps we aim to use the mice as efficiently as possible and to reduce the number of mice. Deploying standard therapies in the GEMMs for reference, also provides a reference for minimal required effect levels – i.e. new therapies should prove superior - and corresponding group sizes. Using appropriate statistical power calculations, the number of animals in these experiments will be kept to a minimum.</p>
	<p>3.4.4.2 Patient Derived Xenograft (PDX) models: Citaat: A phasing has been applied to the project. New candidate treatments are first tested in vitro on tumor cell lines. Only the best are then tested in vivo, starting with dose and injection route optimization (phase 1). Only the most promising treatment on the optimal dose will then be tested in the combination experiments (phase 2). Through step-wise approach, we aim to use the mice as efficiently as possible and to reduce the number of mice. The minimum number of animals per experiment will be determined with the help of statistical calculations.</p>
Verfijnen	
	<p>3.4.4.1 Testing of GEMMs: Induction, progression and targeted treatment of skin lymphomas: Citaat: The first signs of cutaneous lymphoma development can be seen in the skin at an early stage of tumor development. Thus, the experimental endpoint of the majority of experiments will be 1000mm³ which is well ahead of achieving the maximum cumulative tumor burden of 2000mm³ mentioned in the code of practice animal tests in cancer research. This greatly reduces the level of discomfort. Moreover, the blood of these animals will be screened for systemic dissemination.</p>
	<p>3.4.4.2 Patient Derived Xenograft (PDX) models: Zie bijlage 3.4.4.1</p>

3.4.4.1 Testing of GEMMs: Induction, progression and targeted treatment of skin lymphomas: De 3V's zijn voldoende onderbouwd

3.4.4.2 Patient Derived Xenograft (PDX) models: De 3V's zijn voldoende onderbouwd

Hergebruik Er is geen sprake van hergebruik van dieren.

Naam proef	Worden de dieren gedood?	Doden volgens richtlijn?
3.4.4.1 Testing of GEMMs: Induction, progression and targeted treatment of skin lymphomas	Ja	volgens de richtlijn.
3.4.4.2 Patient Derived Xenograft (PDX) models	Ja	volgens de richtlijn.

Naam proef

<p>3.4.4.1 Testing of GEMMs: Induction, progression and targeted treatment of skin lymphomas</p>	<p>HEP: < 10%</p>	<p>Citaat: General: We adhere to the human endpoints as described in the "code of practice animal experiments in cancer research" (20% weight loss, apathy, moribund and, typical risk of for our type of experiments, severe scratching/wounding or overly agitated upon touching treated skin). During the experiments we will consult our local animal welfare panel (IvD) when complications arise. In the rare event (we aim to keep it well below 5%) that one of the human endpoints is reached, e.g. because of an 'explosive' tumor growth/dissemination, the animal will be immediately taken out of the experiment and killed in accordance with Annex IV of the 2010/63 / EU directive. It will also be critically examined (based on the available information from all laboratory animals within the experiment) whether a certain experiment in progress should be stopped in its entirety or not.</p> <p>The human endpoints differ per model. The following human endpoints apply to developing and early (sub)cutaneous tumors: - achieve maximum cumulative tumor size measured in 3 dimensions of 1000 mm³, or in 2 dimensions occupying 300 mm² of skin area. - severe skin irritation/scratching - achieving a body condition score of 2 or lower (according to Ullman-Culleré and Foltz, 1999)</p> <p>For the advanced, late stage models and treatment thereof the following human end points also apply: - Combination of several factors including the total tumor burden, the course in mouse weight and well-being / behavior and locomotion of the mice, the body condition score (according to Ullman-Culleré and Foltz, 1999). - The limit is in any case at: The animal loses more than 15% of the body weight in a relatively short time (1-2 days) or the body weight has decreased by more than 20% compared to the own weight at the start of the test , or a body condition score of 2 or lower. Ullman-Culleré MH, Foltz CJ. Body condition scoring: a rapid and accurate method for assessing health status in mice. Lab Anim Sci. 1999 Jun;49(3):319-23.</p>
---	----------------------	---

Muizen (Mus musculus)	Ongerief: 65,0% Matig 35,0% Licht	
3.4.4.2 Patient Derived Xenograft (PDX) models	HEP: < 5%	<p>Citaat: General: We adhere to the human endpoints as described in the "code of practice animal experiments in cancer research". In the unlikely event that one of the human endpoints is reached, the animal will be immediately taken out of the experiment and killed in accordance with Annex IV of the 2010/63 / EU directive.</p> <p>The human endpoints differ per model. The following human endpoints apply to subcutaneous tumors:</p> <ul style="list-style-type: none"> - achieve maximum cumulative tumor size measured in 3 dimensions of 1000 mm³. - severe skin irritation or if the tumor breaks through the skin. - achieving a body condition score of 2 or lower (according to Ullman-Culleré and Foltz, 1999) <p>For the orthotopic models the following human endpoints apply:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Combination of several factors including the total tumor burden measured with bioluminescence (maximum intensity reached), the size of the tumor, the location of the tumor (s), the amount of tumors, the course of the mouse weight and the well-being / behavior and the locomotion of the mice, the body condition score (according to Ullman-Culleré and Foltz, 1999). - The limit is in any case at: The animal loses more than 15% of the body weight in a relatively short time (1-2 days) or the body weight has decreased by more than 20% compared to the own weight at the start of the test , or a body condition score of 2 or lower.
Muizen (Mus musculus)	Ongerief: 90,0% Matig 10,0% Licht	

5 Samenvatting

5.2 lid1

5.2 lid1

Het DEC advies is niet gebaseerd op consensus. Een van de DEC leden geeft een negatief DEC advies. Zie ethische afweging punt 3.

2e inschatting van het humaan eindpunt wordt door de onderzoeker niet onderbouwd vanwege het ontbreken aan ervaring met deze proefopzet. De opgegeven incidentie van het bereiken van een humaan eindpunt is relatief laag. <5% en < 10%. volgens de DEC, maar wel voldoende duidelijk bepaald.

5.2 lid1

In bijlage 3.4.4.1 is de aanvrager verzocht om het sub total en de subtotals na te rekenen. Het Secretariaat is uitgegaan van subtotals. Het cumulatieve ongerief in deze bijlage is niet vermeld. De aanvrager is verzocht om dit uit te reken en toe te voegen.

In bijlage 3.4.4.2 is voor het ontwikkelen van PDX tumor modellen de aanvrager gevraagd om een onderbouwing te geven voor de aantallen.

Er zijn vragen gesteld over de NTS. De aanvrager is verzocht om toelichting te geven over pilots, het soort huidlymfomen wat wordt onderzocht, het aantal dieren kloppend te maken met de bijlages en de terminologie te vereenvoudigen.

6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning

5.2 lid1

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

Nummer: 1 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Sticky Note Datum: 7-6-2021 15:42:07

5.2 lid1

5.2 lid1

Nummer: 2 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Highlight Datum: 7-6-2021 15:00:32

Nummer: 3 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Sticky Note Datum: 7-6-2021 15:40:18

Dit zet je in feite allemaal neer in je samenvatting van het proces. Ik zou dit weghalen. Wat je wel moet benoemen is dat de DEC na 2 vragen rondes toch nog onduidelijkheden in de aanvraag zag.

Dus De DEC heeft na 3 vragenrondes geconstateerd dat ook de derde versie van de aanvraag nog steeds slordigheden en onduidelijkheden bevat die nog niet gecorrigeerd zijn. Niettemin heeft de DEC besloten om een ethische afweging te maken. Het Secretariaat heeft naast de openstaande vragen van de DEC ook nog een aantal onduidelijkheden die aan de aanvrager gevraagd zijn. Dit zijn, net als de vragen van de DEC, ook slordigheden. Het ontbreken van deze onduidelijkheden zal er niet toe leiden dat de commissie geen ethische afweging kan maken.



Advies aan CCD

Datum 09 juni 2021
Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD20209584

Instelling: 5.1 lid2h
Onderzoeker: 5.1 lid2e
Project: Maus models of cutaneous lymphomas: from pathogenesis to therapeutic intervention
Aanvraagnummer: AVD20209584
Betreft: Nieuwe aanvraag
Categorieën: Fundamenteel onderzoek
Translationeel of toegepast onderzoek

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

Proces	<p>Er zijn geen vragen gesteld aan de DEC.</p> <p>De volgende vragen over de NTS zijn aan de aanvrager gesteld:</p> <ul style="list-style-type: none">- De NTS bevat technisch taalgebruik (bijvoorbeeld transgene, genotypering en genetische modificatie) waardoor deze niet goed navolgbaar is voor het algemeen publiek. Wij verzoeken u om de technische termen in de NTS te vervangen door meer gangbaar taalgebruik of deze toe te lichten.- In bijlage 3.4.4.1 geeft u aan dat er pilots plaats vinden en hoe ze bijdrage aan dit onderzoek. Dit wordt niet vermeld in uw NTS. Kunt u dit alsnog toevoegen?- In de NTS wordt niet duidelijk dat het over een aantal specifieke en relatief zeldzame huidlymfomen gaat. Ook mist informatie over de incidentie, sterfte en overlevingskans van de patiënt. Kunt u dit alsnog toelichten?- In de NTS is het ongerief bij de dieren 860 mild en 3154 moderate. Dit komt niet overeen met de bijlage 3.4.4.1 en 3.4.4.2. Kunt u de aantallen in de NTS aanpassen zodat deze overeenkomen met de bijlages?- U zegt bij vermindering het volgende: "er worden alleen modellen gebruikt op basis van genetische afwijkingen die in de meeste huidlymfoom patiënten worden terug gevonden". Dit klopt niet aangezien u ook een model voor zeer zeldzame agressieve tumoren willen gebruiken. Kunt u dit stuk in de NTS kloppend maken met het
---------------	---

projectvoorstel?

De volgende vragen zijn aan de aanvrager gesteld:

- U heeft een projectvergunning aangevraagd van 27-04-2020 t/m 26-04-2025. De CCD realiseert zich dat u hierdoor een jaar minder de tijd heeft om uw onderzoek uit te voeren. Als u wilt dat de begin en einddatum van uw onderzoek wordt aangepast dient een nieuw getekend aanvraagformulier bij de CCD in te dienen met daarop de nieuwe data.

- In het projectvoorstel staat: "Most treatment strategies have already been optimized for humans". Deze opmerking in een onderzoeksvoorstel naar nieuwe behandelingen schept verwarring. Kunt u deze zin verhelderen of verwijderen uit het projectvoorstel?

- Het is onduidelijk hoe zeldzaam de varianten zijn die nu onderzocht worden. Kunt u de incidentie, mortaliteit en overlevingskansen van deze varianten in uw aanvraag benoemen?

- U geeft aan bezig te zijn met het ontwikkeling van in vitro modellen, maar het wordt niet duidelijk welke dierexperimenten hierdoor mogelijk over een paar jaar vervangen zouden kunnen worden. Kunt u dit verhelderen?

- Purpose of the project bij de NTS (2de tabblad) is niet gelijk aan dat van het projectvoorstel bij 2.1. Gelieve dit consistent te maken.

- In bijlage 3.4.4.1 geeft u aan 2444 dieren te willen gebruiken. Wanneer de aantallen in de tabel onder B en K bij elkaar worden opgeteld is de som hier echter geen 2444 van. Kunt u de aantallen narekenen en kloppend maken in bijlage 3.4.4.1?

- Kunt u in bijlage 3.4.4.1 onder K het cumulatief ongerief van dieren weergeven in percentages per ongeriefcategorie?

- U zegt in bijlage 3.4.4.1 van de dierproeven het volgende: when confirmed by our genetic/FACS analysis, we will test small molecule inhibitors in relevant models. Kunt u verhelderen wat het voor uw onderzoek betekent wanneer dit niet bevestigd wordt?

- In bijlage 3.4.4.2 verwijst u naar bijlage 3.4.4.1. Alle bijlages moeten opzichzelfstaand te lezen zijn. Kunt u de verwijzingen eruit halen en dit aanvullen met de juiste informatie?

- U geeft in bijlage 3.4.4.2 van de dierproeven aan bij de primary

	<p>outcome om immuunparameters te gaan testen. U maakt in deze bijlage echter gebruik van een immuundeficiente muis. Kunt u onderbouwen waarom u dit een relevante primaire uitleesparameter voor uw onderzoek vindt?</p> <p>- In bijlage 3.4.4.2 van de dierproeven staat dat tumorcellen worden gelabeld met luciferase om vervolgens een FACS meting te doen uit te voeren. Dit is niet logisch. kunt u dit verhelderen of uit de aanvraag halen?</p> <p>- In bijlage 3.4.4.2 staat bij de 'estimated numbers Development of PDX tumor models: Approx.. 500'. Kunt u een onderbouwing geven hoe u aan dit aantal dieren bent gekomen?</p> <p>- Kunt u in bijlage 3.4.4.2 aangeven of u mannelijke en/of vrouwelijke dieren gebruikt voor uw proef?</p>			
Naam proef	Diersoort	Stam	Aantal dieren	Herkomst
3.4.4.1 Testing of GEMMs: Induction, progression and targeted treatment of skin lymphomas				
	Muizen (Mus musculus)		2.444	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn
3.4.4.2 Patient Derived Xenograft (PDX) models				
	Muizen (Mus musculus)	immunodeficient mice (NSG)	1.720	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn

Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

3.4.4.1 Testing of GEMMs: Induction, progression and targeted treatment of skin lymphomas

Muizen (Mus musculus)

Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt. Citaat: Both males and females can be used initially, but depending on the type of tumors and the rate at which they will develop, a preference for either male or female might emerge.

3.4.4.2 Patient Derived Xenograft (PDX) models

Muizen (Mus musculus)

Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt. Niet in de aanvraag vermeld, er is een toelichting gevraagd aan de aanvrager.

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

2 DEC advies

DEC-advies	<p>Citaat C1 :</p> <p>...De DEC leden hebben de indiener twee maal vragen gesteld en kritische opmerkingen gemaakt over het onderzoeksvoorstel. De aanvrager heeft naar aanleiding hiervan de documenten wel flink aangepast maar volgens de DEC leden staan er ook in deze derde versie nog zaken die onduidelijk zijn of beter verwoord hadden moeten worden. De DEC heeft besloten om ondanks genoemde tekortkomingen wel een ethische afweging te maken omdat er wel voldoende duidelijkheid verkregen is over: 1. De gevolgen voor en de belasting van de proefdieren, 2. De mogelijke opbrengst volgens de aanvragers en 3. De haalbaarheid van het onderzoeksvoorstel. Daarmee voldoet het voorstel volgens de DEC aan de definitie van een project, het vertoont overeenkomst met voorbeeld 1 uit de handleiding. Daarnaast heeft de DEC besloten om in het DEC advies naast de uitkomst van de ethische afweging ook de gesignaleerde onduidelijkheden te vermelden; deze zijn vermeld bij E-3.</p> <p>Citaat C13 (HEP):</p> <p>Naar mening van de DEC zijn de humane eindpunten voldoende duidelijk bepaald. Er zijn klinische observaties, zoals afwijkend gedrag, afwijkingen in de locomotie, duidelijke afname van lichaamsgewicht en de body condition score (volgens Ullman-Culleré and Foltz, 1999) die het HEP markeren. De opgegeven incidentie van het bereiken van een humaan eindpunt is relatief laag, <5% en < 10%. Deze inschatting wordt door het ontbreken van ervaring met deze proefopzet niet onderbouwd maar de DEC leden zien geen reden om te twijfelen aan de genoemde percentages.</p> <p>Citaat C18 (geslachten):</p> <p>De onderzoeker geeft in de eerste appendix aan dat "Both males and females can be used initially, but depending on the type of tumors and the rate at which they will develop, a preference for either male or female might emerge". In de tweede appendix wordt voor het gebruik van de NSG muizen geen sekse vermeld. De DEC gaat ervan uit dat voor het gehele onderzoek mannetjes en vrouwtjes muizen in gelijke aantallen worden gebruikt en constateert dat er geen duidelijk onderbouwing wordt geleverd waarom het gebruik van alleen mannen of alleen vrouwen gerechtvaardigd is.</p> <p>Citaat C21 (NTS):</p> <p>De niet-technische samenvatting is een compacte weergave van het project. De NTS bevat nog wel slordigheden ("de oorknip duurt kort pijn") en tegenstrijdigheden. (Bij vermindering staat: "er worden alleen</p>
-------------------	--

modellen gebruikt op basis van genetische afwijkingen die in de meeste huidlymfoom patiënten worden terug gevonden". Dit klopt niet aangezien ze ook een model voor zeer zeldzame agressieve tumoren willen gebruiken). Tenslotte is de NTS, voor de doelgroep, niet overal begrijpelijk geformuleerd.

Citaat Advies E3:

Er is tijdens de derde beoordeling en bespreking van dit projectvoorstel in de DEC vergadering geconstateerd dat ook de derde versie van de aanvraag nog steeds slordigheden en onduidelijkheden bevat die nog niet gecorrigeerd zijn. Niettemin heeft de DEC besloten om wel een ethische afweging te maken. Zaken die niet duidelijk en/of verwarrend zijn:

- a. In het projectvoorstel staat: "Most treatment strategies have already been optimized for humans". Deze opmerking in een onderzoeksvorstel naar nieuwe behandelingen schept verwarring.
- b. Het is onduidelijk hoe zeldzaam de varianten zijn die nu onderzocht worden.
- c. Onderzoeksgroep is bezig met het ontwikkeling van in vitro modellen, maar het wordt niet duidelijk welke dierexperimenten hierdoor mogelijk over een paar jaar vervangen zouden kunnen worden.
- d. In tabel 1 van appendix 1 klopt het subtotaal niet qua verdeling tussen mild en matig ongerief (790 mild en 1654 matig ipv 860 mild en 1584 matig).
- e. Bij treatment modalities staat (dit betreft onderzoek met GM muizen): "We anticipate constitutive activation of the JAK/STAT pathway or NFkB pathway in tumor cells and, when confirmed by our genetic/FACS analysis, we will test small molecule inhibitors". Wat als dat niet bevestigd wordt? Wordt er dan nog ergens anders naar gekeken?
- f. In appendix 2 staat dat tumorcellen worden gelabeld met luciferase om vervolgens een FACS meting te doen uit te voeren. Dit is niet logisch. De DEC gaat er van uit dat dit per ongeluk is blijven staan nadat de bioluminescentie metingen uit de appendix zijn verwijderd.
- g. Bij de primary outcome (dit betreft onderzoek met de PDX modellen) staat dat de onderzoekers immuunparameters gaan testen. Aangezien er gebruikt wordt gemaakt van NSG muizen lijkt dit, volgens de DEC, geen relevante primaire uitleesparameter.
- h. Her gebruik van anesthesie bij een operatie is geen refinement, maar een standaard onderdeel van de ingreep.
- i. Het is onduidelijk waar de 500 benodigde dieren voor de ontwikkeling van het PDX tumor model op gebaseerd is.

Ethische afweging van de DEC:

1. Rechtvaardigt het onderzoek, naar de vroege pathogenese van

primaire huidlymfomen en naar nieuwe behandelmethoden van deze huidtumoren, de inzet van 4164 muizen gegeven het feit dat ca. 75% van deze dieren cumulatief matig en 25% cumulatief licht ongerief zullen ondervinden ?

2. Het voorgestelde onderzoeksproject met 4164 proefdieren is bedoeld om nieuwe kennis te vergaren omtrent een bijzondere vorm van huidkanker bij mensen, primaire huidlymfomen. De incidentie is laag te noemen, 160 nieuwe gevallen per jaar in Nederland, maar het ziektebeeld is veelal ernstig mede omdat de diagnose pas laat wordt gesteld waardoor de patiënten geen tijdige adequate behandeling krijgen. Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: het proefdieronderzoek is, in absolute zin, nadelig voor de muizen als gevolg van het te verwachten cumulatieve matige ongerief en de schending en aantasting van de fysieke en gedragsmatige integriteit van het dier. Daarnaast worden de dieren in het kader van het experiment gedood.

Waarden die voor onderzoekers bevorderd kunnen worden: een mogelijk voordeel door het vergaren van meer inzicht in de pathogenese en oncogene pathways van primaire huidlymfomen. Nieuwe wetenschappelijke kennis kan resulteren in publicaties die de carrière mogelijkheden van de wetenschappers kunnen bevorderen. Waarden die voor patiënten met primaire huidlymfomen bevorderd kunnen worden: een mogelijk groot voordeel omdat de prognose voor patiënten met primaire huidlymfomen kan verbeteren als in een vroeg stadium een effectieve behandeling kan worden ingezet. Waarden die voor de samenleving bevorderd kunnen worden: een mogelijk groot voordeel omdat het voorgestelde onderzoek een behandelingsstrategie kan gaan opleveren waarmee de incidentie en de ernst van primaire huidlymfomen kan worden verminderd. Dit zal leiden tot een vermindering van de ziektelast, afname van de directe kosten in de gezondheidszorg en tot een afname van de indirecte kosten door vermindering van ziekteverzuim en arbeidsongeschiktheid.

De ethische afweging door DEC leden levert geen consensus op, zes DEC leden zijn van mening dat de belangen van de patiënten (en hun naasten), de samenleving en de onderzoekers zwaarder wegen dan de belangen van de proefdieren. Daarentegen vindt één DEC lid dat de mogelijke opbrengst van het onderzoek niet opweegt tegen het te verwachten ongerief bij de muizen. De zes DEC leden vinden het verkrijgen van meer inzicht in de pathogenese van primaire huidlymfomen van groot maatschappelijk en wetenschappelijk belang; het gebruik van proefdieren is hierbij onvermijdelijk. Deze zes DEC leden geven een positief advies en het zevende DEC lid geeft een negatief advies.

3. Zes DEC leden zijn overtuigd van het belang van de doelstellingen van dit project. Naar inziens van deze DEC leden beschrijft de aanvraag belangrijk onderzoek, dat zowel maatschappelijk als ook wetenschappelijk zeer relevant is. Deze DEC leden zijn van mening dat:

- de waarden die voor de patiënten, de samenleving en de onderzoekers bevorderd kunnen worden zwaarder wegen dan de waarden die voor de proefdieren in het geding zijn
- de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstelling en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project
- dat de onderzoeksgroep voldoende kennis en ervaring heeft om met de gekozen onderzoeksstrategie en met de voorgestelde dierproeven de doelstelling te behalen en dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om het ongerief van de dieren te beperken.
- de doelstelling niet zonder het gebruik van proefdieren behaald kan worden en acht het gebruik van proefdieren en het daarmee samenhangende ongerief bij de dieren ethisch gerechtvaardigd.

De motivatie van het negatieve advies van het zevende DEC lid:
Bij aanvraag AVD9584 kom ik tot een negatief advies, d.w.z. het advies om de voorgenomen dierproeven niet toe te staan. Mijn overwegingen hierbij zijn als volgt:

- In de projectaanvraag komt naar voren dat men zeldzame vormen van cutane lymfomen wil onderzoeken, maar het blijft onduidelijk hoe zeldzaam deze cutane lymfomen precies zijn. In antwoord op onze vragen is wel genoemd dat één van de vier varianten die men wil onderzoeken gemiddeld eenmaal per vier jaar in de Nederlandse kliniek wordt gezien. Voor het onderzoek naar deze (en iedere andere onderzochte) variant wil men wel 1041 muizen offeren. Ik vraag me ernstig af of het ongerief (dat weliswaar op maximaal 'matig' is ingeschat) voor deze muizen opweegt tegen het beperkte aantal patiënten met deze variant van de aandoening. Natuurlijk zijn er wereldwijd beduidend meer patiënten met dit type cutane lymfoom dan alleen in Nederland, maar daartegenover staat ook (zoals altijd) een kans dat het proefdieronderzoek überhaupt geen klinisch relevante toepassingen oplevert. De in onze DEC besproken suggestie dat ieder van deze vier varianten onderzocht moet worden om een totaalbeeld van de aandoening te krijgen, of dat onderzoek naar de meer zeldzame varianten wetenschappelijk of klinisch belangrijke resultaten voor andere varianten gaat opleveren, vind ik erg speculatief. Alles bij elkaar ben ik er niet van overtuigd dat het voorgenomen proefdieronderzoek naar de meest zeldzame varianten van deze aandoening gerechtvaardigd is. (Zeker in samenhang met het volgende punt.)

- De onderzoekers maken duidelijk dat ze ook aan proefdierlijke alternatieven voor dit onderzoek werken. In antwoord op onze vraag in welk stadium het in vitro onderzoek zich bevindt en wanneer het in vivo onderzoek zou kunnen vervangen, hebben de onderzoekers geantwoord dat ze niet verwachten binnen 2 jaar de in vitro modellen ontwikkeld en gevalideerd te hebben. Zeker voor zover het erg zeldzame aandoeningen betreft, zou je wat mij betreft gewoon 2 jaar moeten wachten tot deze modellen wel ontwikkeld en gevalideerd zijn. Maar het wordt ook niet erg duidelijk in hoeverre deze in vitro alternatieven echte alternatieven zullen zijn.

De onderzoekers schrijven hierover in het project proposal: "Even if successful, effects are expected to be different in an intact body due to; among other things, the interaction with the tumor environment and stroma, induction of a systemic immune response and the spread in vivo. Therefore, to gain understanding of the pathogenesis of the novo tumors we need the intact animal to simulate the (inflammatory) conditions under which the cutaneous lymphomas appear to arise. Recreating these conditions in vitro (ex vivo) is not (yet) possible." Hierin wordt niet duidelijk gemaakt welke delen van het voorgestelde onderzoek wel met in vitro modellen vervangen zou kunnen worden, en wat dit betekent voor het benodigde aantal muizen. Als het punt is dat helemaal niets van het voorgestelde onderzoek door in vitro onderzoek vervangen zou kunnen worden, dan is mij onduidelijk waarom de ontwikkeling van deze in vitro modellen überhaupt door de onderzoekers genoemd wordt. (Het werd al in het project proposal genoemd voordat we er als DEC een vraag over stelden.)

Kortom, ik ben er niet van overtuigd dat het proefdieronderzoek naar alle vier de varianten van cutane lymfomen gerechtvaardigd is, gelet op de zeldzaamheid van sommige van deze varianten en gelet op de ontwikkeling van dierproefvrije alternatieven. Misschien hadden de onderzoekers mij kunnen overtuigen als ze gericht op deze punten waren ingegaan. Aangezien we als DEC echter besloten hebben niet voor een derde maal onze vragen aan de onderzoekers voor te leggen, hanteer ik het 'nee, tenzij' principe door een negatief advies af te geven.

De DEC heeft extern advies ingewonnen bij

- de aanvrager is om aanvullingen gevraagd

De DEC heeft bij de aanvrager vragen gesteld over:

- Projectvoorstel: de subdoelen, de meerwaarde van muismodel 1 ten opzichte van muismodel 2, het stadium van het in vitro onderzoek, de

	<p>go/no-go momenten</p> <ul style="list-style-type: none"> - Appendix 1: de behandeling, cumulatief ongerief, go/no-go momenten, toepassing DNFB en huisvesting - Appendix 2: de reinoculatie/retransplantatie van tumor cellen, statische onderbouwing voor de aantallen, gebruik pups, de behandeling, cumulatieve ongerief, mogelijkheid om handelingen te combineren, het gebruikte adjuvans, het toepassen van de grimace scale, hoe bioluminescentie wordt toegepast bij de xenografts om tumor groei te monitoren, huisvesting en de humane eindpunten. - NTS verduidelijken <p>Het DEC advies is Positief</p> <p>Het uitgebrachte advies is niet gebaseerd op consensus. Zie ethische afweging punt E3</p>
--	--

3 Kwaliteit DEC advies

Kwaliteit DEC-advies	
<p>Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld. Bij de beantwoording van de beoordelvragen verstrekt u over het algemeen een heldere onderbouwing. U geeft in het advies op heldere wijze de discussies weer die in de DEC hebben plaatsgevonden. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen.</p> <p>De CCD waardeert het zeer dat u helder en navolgbaar in uw advies laat zien hoe het advies met een meerderheidsstandpunt tot stand is gekomen, en wat daarbij de afwegingen waren. De CCD kon goed volgen hoe de discussie is verlopen.</p>	

4 Inhoudelijke beoordeling

Belangen-verstrengeling	<p>5.1 lid2e</p> 
--------------------------------	---

Doelstelling

Doelstelling

Citaat:

The primary aim of the project is to understand the function of crucial (early) tumor drivers of cutaneous lymphoma.

Eventually, this knowledge may lead to targeted therapies that can efficiently cure patients or prevent progression to malignant stages. To enable an extensive experimental approach to optimize such interventions we aim to develop credible mouse models representing cutaneous T-cell lymphoma.

Here, this overarching aim is broken down into sub-goals which can be addressed by mouse experiments. First of all:

5.1 lid 1 c

<p>Wetenschappelijk en maatschappelijk belang</p>	<p>Citaat: The scientific relevance lies in determining the main signaling pathways that prove to cause cutaneous lymphoma in the mouse models and establish clear parallels with what is observed in patients. ^{5.1 lid1g}</p> <p>[Redacted]</p> <p>In relation to clinical practice and derived social relevance, well-demarcated molecular diagnosis is important for proper prognosis and for properly matched therapies, especially in early stages to avert further detrimental development. Such diagnosis is currently attained by systematic clinical and immune-histological analyses. This project aims to establish more objective and reliable refined diagnostic and prognostic molecular markers that will better identify patients at risk of a detrimental disease course. Accordingly, such markers will also guide development of novel therapeutic approaches that will further improve treatment of these patients. This cancer type is relatively rare, ^{5.1 lid2h}</p> <p>[Redacted]</p>
<p>Onderbouwing wetenschappelijk en maatschappelijk belang</p>	<p>Het belang is voldoende uitgewerkt</p>

<p>Wetenschappelijke kwaliteit Kwaliteit aanvrager/ onderzoeksgroep en onderzoek</p>	<p>Citaat DEC advies C7: 5.1 lid2h</p> <p>[Redacted text]</p> <p>Naar inziens van de DEC beschikt de betrokken onderzoeksgroep ook over voldoende kennis van proefdieren en over ervaring met dierexperimenteel onderzoek om te kunnen voldoen aan de 3V-beginselen en om zoveel mogelijk te voorkomen dat mens, dier en milieu negatieve effecten ondervinden als gevolg van de voorgestelde dierproeven. Daarbij is de proefdierfaciliteit van de vergunninghouder goed uitgerust en zijn de biotechnici bekwaam in het verzorgen van muizen en het monitoren van gezondheidsproblemen.</p> <p>Het secretariaat heeft geen reden te twijfelen aan de kwaliteit van de aanvragers en het onderzoek.</p>
---	---

3V's

Vervanging	<p>3.4.4.1 Testing of GEMMs: Induction, progression and targeted treatment of skin lymphomas: Citaat: Primary cutaneous lymphoma cells are extremely difficult to culture in vitro, most likely because a proper micro-environment is lacking. 5.1 lid2h, 5.1 lid1e</p> <p>[Redacted]</p> <p>Even if successful, effects are expected to be different in an intact body due to; among other things, the interaction with the tumor environment and stroma, induction of a systemic immune response and the spread in vivo. Therefore, to gain understanding of the pathogenesis of the novo tumors we need the intact animal to simulate the (inflammatory) conditions under which the cutaneous lymphomas appear to arise. Recreating these conditions in vitro (ex vivo) is not (yet) possible. The effectiveness of certain (combination) therapies that depend on a systemic immune response should be tested in an intact organism and cannot be replaced.</p>
	<p>3.4.4.2 Patient Derived Xenograft (PDX) models: Citaat: Primary cutaneous lymphoma cells are extremely difficult to culture in vitro, most likely because a proper environment is lacking. 5.1 lid2h, 5.1 lid1e</p> <p>[Redacted]</p> <p>Results from patient cells in PDX models may then be compared with patient cells co-cultured with in vitro skin models. However, the mouse model will still be preferred to test systemic therapies and/or on systemic adverse side effects. To reduce the number of animals, we will test and optimise combinations of treatments using the few available cell lines. Although these cell lines can give a good indication of interesting combinations, unfortunately not all questions can be answered with these models. The effects are expected to be different in an intact organism due to, among other things, the accessibility of the tumors, the spread in vivo, the interaction with the tumor environment and stroma, induction of a systemic immune response.</p>

Verminderen	
	<p>3.4.4.1 Testing of GEMMs: Induction, progression and targeted treatment of skin lymphomas: Citaat: To reduce the number of animals, we have tested and will test and optimise combinations of treatments using appropriate cell lines from the few cutaneous lymphoma cell lines available. Although these cell lines can give a good indication of interesting combinations, unfortunately not all questions can be answered with these models. We deploy a step-wise approach in the project on different levels to minimize the number of mice. Candidate genes and resulting constructs are first tested in vitro. Moreover, for each model we will start with optimization of dose and time. Only the most promising gene(s), best representing the skin lymphoma entities, will then be tested in vivo for treatment modalities (final stage). Through these steps we aim to use the mice as efficiently as possible and to reduce the number of mice. Deploying standard therapies in the GEMMs for reference, also provides a reference for minimal required effect levels – i.e. new therapies should prove superior - and corresponding group sizes. Using appropriate statistical power calculations, the number of animals in these experiments will be kept to a minimum.</p>
	<p>3.4.4.2 Patient Derived Xenograft (PDX) models: Citaat: A phasing has been applied to the project. New candidate treatments are first tested in vitro on tumor cell lines. Only the best are then tested in vivo, starting with dose and injection route optimization (phase 1). Only the most promising treatment on the optimal dose will then be tested in the combination experiments (phase 2). Through step-wise approach, we aim to use the mice as efficiently as possible and to reduce the number of mice. The minimum number of animals per experiment will be determined with the help of statistical calculations.</p>
Verfijnen	
	<p>3.4.4.1 Testing of GEMMs: Induction, progression and targeted treatment of skin lymphomas: Citaat: The first signs of cutaneous lymphoma development can be seen in the skin at an early stage of tumor development. Thus, the experimental endpoint of the majority of experiments will be 1000mm³ which is well ahead of achieving the maximum cumulative tumor burden of 2000mm³ mentioned in the code of practice animal tests in cancer research. This greatly reduces the level of discomfort. Moreover, the blood of these animals will be screened for systemic dissemination.</p>
	<p>3.4.4.2 Patient Derived Xenograft (PDX) models: Zie bijlage 3.4.4.1</p>

3.4.4.1 Testing of GEMMs: Induction, progression and targeted treatment of skin lymphomas: De 3V's zijn voldoende onderbouwd

3.4.4.2 Patient Derived Xenograft (PDX) models: De 3V's zijn voldoende onderbouwd

Hergebruik	Er is geen sprake van hergebruik van dieren.
-------------------	--

Naam proef	Worden de dieren gedood?	Doden volgens richtlijn?
3.4.4.1 Testing of GEMMs: Induction, progression and targeted treatment of skin lymphomas	Ja	volgens de richtlijn.
3.4.4.2 Patient Derived Xenograft (PDX) models	Ja	volgens de richtlijn.

Naam proef		
-------------------	--	--

<p>3.4.4.1 Testing of GEMMs: Induction, progression and targeted treatment of skin lymphomas</p>	<p>HEP: < 10%</p>	<p>Citaat:</p> <p>General: We adhere to the human endpoints as described in the "code of practice animal experiments in cancer research" (20% weight loss, apathy, moribund and, typical risk of for our type of experiments, severe scratching/wounding or overly agitated upon touching treated skin). During the experiments we will consult our local animal welfare panel (IvD) when complications arise. In the rare event (we aim to keep it well below 5%) that one of the human endpoints is reached, e.g. because of an 'explosive' tumor growth/dissemination, the animal will be immediately taken out of the experiment and killed in accordance with Annex IV of the 2010/63 / EU directive. It will also be critically examined (based on the available information from all laboratory animals within the experiment) whether a certain experiment in progress should be stopped in its entirety or not.</p> <p>The human endpoints differ per model. The following human endpoints apply to developing and early (sub)cutaneous tumors:</p> <ul style="list-style-type: none"> - achieve maximum cumulative tumor size measured in 3 dimensions of 1000 mm³, or in 2 dimensions occupying 300 mm² of skin area. - severe skin irritation/scratching - achieving a body condition score of 2 or lower (according to Ullman-Culleré and Foltz, 1999) <p>For the advanced, late stage models and treatment thereof the following human end points also apply:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Combination of several factors including the total tumor burden, the course in mouse weight and well-being / behavior and locomotion of the mice, the body condition score (according to Ullman-Culleré and Foltz, 1999. - The limit is in any case at: The animal loses more than 15% of the body weight in a relatively short time (1-2 days) or the body weight has decreased by more than 20% compared to the own weight at the start of the test , or a body condition score of 2 or lower. <p>Ullman-Culleré MH, Foltz CJ. Body condition scoring: a rapid and accurate method for assessing health status in mice. Lab Anim Sci. 1999 Jun;49(3):319-23.</p>
---	----------------------	--

Muizen (Mus musculus)	Ongerief: 65,0% Matig 35,0% Licht	
3.4.4.2 Patient Derived Xenograft (PDX) models	HEP: < 5%	<p>Citaat: General: We adhere to the human endpoints as described in the "code of practice animal experiments in cancer research". In the unlikely event that one of the human endpoints is reached, the animal will be immediately taken out of the experiment and killed in accordance with Annex IV of the 2010/63 / EU directive.</p> <p>The human endpoints differ per model. The following human endpoints apply to subcutaneous tumors:</p> <ul style="list-style-type: none"> - achieve maximum cumulative tumor size measured in 3 dimensions of 1000 mm³. - severe skin irritation or if the tumor breaks through the skin. - achieving a body condition score of 2 or lower (according to Ullman-Culleré and Foltz, 1999) <p>For the orthotopic models the following human endpoints apply:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Combination of several factors including the total tumor burden measured with bioluminescence (maximum intensity reached), the size of the tumor, the location of the tumor (s), the amount of tumors, the course of the mouse weight and the well-being / behavior and the locomotion of the mice, the body condition score (according to Ullman-Culleré and Foltz, 1999). - The limit is in any case at: The animal loses more than 15% of the body weight in a relatively short time (1-2 days) or the body weight has decreased by more than 20% compared to the own weight at the start of the test , or a body condition score of 2 or lower.
Muizen (Mus musculus)	Ongerief: 90,0% Matig 10,0% Licht	

5 Samenvatting

5.2 lid1

5.2 lid1

Het DEC advies is niet gebaseerd op consensus. Een van de DEC leden geeft een negatief DEC advies. Zie ethische afweging punt E3. 5.2 lid1

De DEC heeft na twee vragenrondes geconstateerd dat ook de derde versie van de aanvraag nog steeds slordigheden en onduidelijkheden bevat die nog niet gecorrigeerd zijn. Niettemin heeft de DEC besloten om een ethische afweging te maken. Het Secretariaat heeft naast de openstaande vragen van de DEC ook nog een aantal onduidelijkheden die aan de aanvrager gevraagd zijn. Dit zijn, net als de vragen van de DEC, ook slordigheden. Het ontbreken van deze onduidelijkheden zal er niet toe leiden dat de commissie geen ethische afweging kan maken.

6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning

5.2 lid1

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 9 juni 2021 13:01
Aan: 5.1 lid2h
CC: 5.1 lid2e ; 5.1 lid2h
Onderwerp: Aanhouden AVD 5.1 lid2h 20209584

Geachte 5.1 lid2e

Op 20-03-2020 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Maus models of cutaneous lymphomas: from pathogenesis to therapeutic intervention" met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 20209584. 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

- De NTS bevat technisch taalgebruik (bijvoorbeeld transgene, genotypering en genetische modificatie) waardoor deze niet goed navolgbaar is voor het algemeen publiek. Wij verzoeken u om de technische termen in de NTS te vervangen door meer gangbaar taalgebruik of deze toe te lichten.
- In bijlage 3.4.4.1 geeft u aan dat er pilots plaats vinden en hoe ze bijdrage aan dit onderzoek. Dit wordt niet vermeld in uw NTS. Kunt u dit alsnog toevoegen?
- In de NTS wordt niet duidelijk dat het over een aantal specifieke en relatief zeldzame huidlymfomen gaat. Ook mist informatie over de incidentie, sterfte en overlevingskansen van de patiënt. Kunt u dit alsnog toelichten?
- In de NTS is het ongerief bij de dieren 860 mild en 3154 moderate. Dit komt niet overeen met de bijlage 3.4.4.1 en 3.4.4.2. Kunt u de aantallen in de NTS aanpassen zodat deze overeenkomen met de bijlages?
- U zegt bij vermindering het volgende: "er worden alleen modellen gebruikt op basis van genetische afwijkingen die in de meeste huidlymfoom patiënten worden terug gevonden". Dit klopt niet aangezien u ook een model voor zeer zeldzame agressieve tumoren willen gebruiken. Kunt u dit stuk in de NTS kloppend maken met het projectvoorstel?

Onduidelijkheden

- U heeft een projectvergunning aangevraagd van 27-04-2020 t/m 26-04-2025. De CCD realiseert zich dat u hierdoor een jaar minder de tijd heeft om uw onderzoek uit te voeren. Als u wilt dat de begin en einddatum van uw onderzoek wordt aangepast dient een nieuw getekend aanvraagformulier bij de CCD in te dienen met daarop de nieuwe data.
- In het projectvoorstel staat: "Most treatment strategies have already been optimized for humans?". Deze opmerking in een onderzoeksvoorstel naar nieuwe behandelingen scheidt verwarring. Kunt u deze zin verhelderen of verwijderen uit het projectvoorstel?
- Het is onduidelijk hoe zeldzaam de varianten zijn die nu onderzocht worden. Kunt u de incidentie, mortaliteit en overlevingskansen van deze varianten in uw aanvraag benoemen?
- U geeft aan bezig te zijn met het ontwikkelen van in vitro modellen, maar het wordt niet duidelijk welke dierexperimenten hierdoor mogelijk over een paar jaar vervangen zouden kunnen worden. Kunt u dit verhelderen?

- Purpose of the project bij de NTS (2de tabblad) is niet gelijk aan dat van het projectvoorstel bij 2.1. Gelieve dit consistent te maken.
- In bijlage 3.4.4.1 geeft u aan 2444 dieren te willen gebruiken. Wanneer de aantallen in de tabel onder B en K bij elkaar worden opgeteld is de som hier echter geen 2444 van. Kunt u de aantallen narekenen en kloppend maken in bijlage 3.4.4.1?
- Kunt u in bijlage 3.4.4.1 onder K het cumulatief ongerief van dieren weergeven in percentages per ongeriefcategorie?
- U zegt in bijlage 3.4.4.1 van de dierproeven het volgende: when confirmed by our genetic/FACS analysis, we will test small molecule inhibitors in relevant models. Kunt u verhelderen wat het voor uw onderzoek betekent wanneer dit niet bevestigd wordt?
- In bijlage 3.4.4.2 verwijst u naar bijlage 3.4.4.1. Alle bijlages moeten op zichzelfstaand te lezen zijn. Kunt u de verwijzingen eruit halen en dit aanvullen met de juiste informatie?
- U geeft in bijlage 3.4.4.2 van de dierproeven aan bij de primary outcome om immuunparameters te gaan testen. U maakt in deze bijlage echter gebruik van een immuundeficiente muis. Kunt u onderbouwen waarom u dit een relevante primaire uitleesparameter voor uw onderzoek vindt?
- In bijlage 3.4.4.2 van de dierproeven staat dat tumorcellen worden gelabeld met luciferase om vervolgens een FACS meting te doen uit te voeren. Dit is niet logisch. Kunt u dit verhelderen of uit de aanvraag halen?
- In bijlage 3.4.4.2 staat bij de 'estimated numbers Development of PDX tumor models: Approx.. 500'. Kunt u een onderbouwing geven hoe u aan dit aantal dieren bent gekomen?
- Kunt u in bijlage 3.4.4.2 aangeven of u mannelijke en/of vrouwelijke dieren gebruikt voor uw proef?

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.

In principe heeft u 14 dagen de tijd om op deze vragen te reageren. Als u echter uiterlijk 16 juni op deze vragen kunt reageren, kunnen uw antwoorden in de eerstvolgende CCD vergadering van 18 juni worden ingebracht bij de bespreking van uw aanvraag.

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

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

.....
T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl

Geachte Centrale Commissie Dierproeven,

Allereerst dank dat me de mogelijkheid geboden wordt mijn aanvraag Mouse models of cutaneous lymphomas: from pathogenesis to therapeutic intervention (AVD [5.1 lid2h](#) 20209584) nader toe te lichten. Hieronder vindt U de antwoorden op de vragen. De gewenste aanpassingen zijn in de gewijzigde versie van de aanvraag doorgevoerd.

Met vr. groet [5.1 lid2e](#)

Niet technische samenvatting

- De NTS bevat technisch taalgebruik (bijvoorbeeld transgene, genotypering en genetische modificatie) waardoor deze niet goed navolgbaar is voor het algemeen publiek. Wij verzoeken u om de technische termen in de NTS te vervangen door meer gangbaar taalgebruik of deze toe te lichten.

Antw: Transgeen is vervangen door genetisch aangepast, genotypering vervangen door controle op genetische aanpassing, genetische modificatie vervangen door genetische aanpassing)

- In bijlage 3.4.4.1 geeft u aan dat er pilots plaats vinden en hoe ze bijdrage aan dit onderzoek. Dit wordt niet vermeld in uw NTS. Kunt u dit alsnog toevoegen?

Een eerste pilot liet zien dat 6 weken oxazolone behandeling geen jeuk/krabgedrag geeft, recent hebben we een tweede pilot uitgevoerd en na 10 weken oxazolone behandeling blijkt er ook geen jeuk op te treden (geen abnormaal krabgedrag). Dit is nu vermeld in bijlage 3.4.4.1. Deze tekst is toegevoegd aan NTS: De opgewekte huidontsteking blijkt de eerste 10 weken (duur van pilot experiment) geen jeuk te geven.

- In de NTS wordt niet duidelijk dat het over een aantal specifieke en relatief zeldzame huidlymfomen gaat. Ook mist informatie over de incidentie, sterfte en overlevingskans van de patiënt. Kunt u dit alsnog toelichten?

Antw: Deze tekst toegevoegd in NTS onder kopje maatschappelijk: Het meest voorkomende type huidlymfoom heeft een incidentie van 1:100.000, waarbij 20% van de patiënten overlijdt binnen 5 jaar na diagnose; meer agressieve typen hebben een 5-jaar overleving van 20-25% en een incidentie van 1 op 1 miljoen.

- In de NTS is het ongerief bij de dieren 860 mild en 3154 moderate. Dit komt niet overeen met de bijlage 3.4.4.1 en 3.4.4.2. Kunt u de aantallen in de NTS aanpassen zodat deze overeenkomen met de bijlages?

Antw: De aantallen zijn aangepast.

- U zegt bij vermindering het volgende: ?er worden alleen modellen gebruikt op basis van genetische afwijkingen die in de meeste huidlymfoom patiënten worden terug gevonden?. Dit klopt niet aangezien u ook een model voor zeer zeldzame agressieve tumoren willen gebruiken. Kunt u dit stuk in de NTS kloppend maken met het projectvoorstel?

Antw: “in de meeste huidlymfoom patiënten worden terug gevonden” is vervangen door: “gevonden worden in patiënten waar tumoren snel ontwikkelen en vaak overlijden als gevolg van de ziekte”

Onduidelijkheden

- U heeft een projectvergunning aangevraagd van 27-04-2020 t/m 26-04-2025. De CCD realiseert zich dat u hierdoor een jaar minder de tijd heeft om uw onderzoek uit te voeren. Als u wilt dat de begin en einddatum van uw onderzoek wordt aangepast dient een nieuw getekend aanvraagformulier bij de CCD in te dienen met daarop de nieuwe data.

Antw: Begin-en einddatum hoeven niet aangepast te worden

- In het projectvoorstel staat: ?Most treatment strategies have already been optimized for humans?. Deze opmerking in een onderzoeksvoorstel naar nieuwe behandelingen schept verwarring. Kunt u deze zin verhelderen of verwijderen uit het projectvoorstel?

Antw: Verhelderd door deze opmerking te vervangen door:

The dosage, timing and administration routes of the treatment modalities (for GEMMs and PDX) for which information is already available from the literature will be used as a guideline to minimize the number of experiments.

- Het is onduidelijk hoe zeldzaam de varianten zijn die nu onderzocht worden. Kunt u de incidentie, mortaliteit en overlevingskansen van deze varianten in uw aanvraag benoemen?

Toegevoegd in tekst. Samengevat, de meest voorkomende vorm heeft een incidentie van 1:100.000 en een 5-jaars overleving van 80%. De huidlymfomen van patiënten met een slecht beloop (patiënten die progressie van de ziekte vertoonden en uiteindelijk zijn overleden) zijn door ons genetisch gekarakteriseerd. Daarnaast zijn meerdere agressieve vormen van huidlymfomen door ons genetisch in detail onderzocht. Twee worden in de aanvraag genoemd, beiden hebben een incidentie van ongeveer 1 op 1 miljoen en een 5-jaars overleving van 20 % (voor AECyTCL, ook agressief CD8+ CTCL genoemd) en-25% (Sezary syndrome).

- U geeft aan bezig te zijn met het ontwikkeling van in vitro modellen, maar het wordt niet duidelijk welke dierexperimenten hierdoor mogelijk over een paar jaar vervangen zouden kunnen worden. Kunt u dit verhelderen?

Antw: We denken dat met name experimenten gericht op medicijnontwikkeling vervangen kunnen worden. In eerste instantie voor de PDX (transplantatie) modellen, later wellicht ook de autochtone tumormodellen. In het ideale geval zal een compleet humaan huidimmuunsysteem overgezet kunnen worden naar een kweekmodel, maar dat zal niet gaan lukken binnen de looptijd van dit project. Nu uitgelegd in tekst NTS: Er worden momenteel technieken ontwikkeld waarbij menselijke witte bloedcellen samen met nageemaakte menselijke huid worden gekweekt. Als dit lukt zullen we de resultaten van patiënten cellen in de muizenmodellen kunnen vergelijken met patiënten-cellen die in huidmodellen worden gekweekt om te bepalen in hoeverre deze kweekmodellen muizenexperimenten kunnen vervangen (bijv. voor het testen van medicijnen).

- Purpose of the project bij de NTS (2de tabblad) is niet gelijk aan dat van het projectvoorstel bij 2.1. Gelieve dit consistent te maken.

Antw: Excuses, ik had niet gezien dat het “pull-down menu” meer opties had. Nu consistent gemaakt door translational and applied research toe te voegen.

- In bijlage 3.4.4.1 geeft u aan 2444 dieren te willen gebruiken. Wanneer de aantallen in de tabel onder B en K bij elkaar worden opgeteld is de som hier echter geen 2444 van. Kunt u de aantallen narekenen en kloppend maken in bijlage 3.4.4.1?

Antw: In tabel B en K staan dezelfde aantallen. In B genoemd om aan te geven in welke experimenten ze gebruikt gaan worden, in K nogmaals omdat deze rubriek expliciet vraagt om het ongerief. Om de klaarblijkelijk ontstane verwarring te voorkomen, is de kolom ongerief verwijderd uit tabel B.

- Kunt u in bijlage 3.4.4.1 onder K het cumulatief ongerief van dieren weergeven in percentages per ongeriefcategorie?

Antw: Nu aangegeven in Tabel K.

- U zegt in bijlage 3.4.4.1 van de dierproeven het volgende: when confirmed by our genetic/FACS analysis, we will test small molecule inhibitors in relevant models. Kunt u verhelderen wat het voor uw onderzoek betekent wanneer dit niet bevestigd wordt?

Antw: Als ook de immunohistochemische analyse geen indicatie geeft voor activatie van de signaaltransductie route, worden de specifieke small molecule inhibitors niet getest omdat dan geen effect verwacht wordt en de dierproef niet zinvol is. Dit nu ook in aanvraag toegevoegd: Small molecule inhibitors will not be tested in case our genetic/FACS/immunohistochemical analysis cannot confirm activation of this signalling pathways.

- In bijlage 3.4.4.2 verwijst u naar bijlage 3.4.4.1. Alle bijlages moeten opzichzelfstaand te lezen zijn. Kunt u de verwijzingen eruit halen en dit aanvullen met de juiste informatie?

Antw: Verwijzingen zijn er uit gehaald en aangevuld met de juiste informatie

- U geeft in bijlage 3.4.4.2 van de dierproeven aan bij de primary outcome om immuunparameters te gaan testen. U maakt in deze bijlage echter gebruik van een immuundeficiente muis. Kunt u onderbouwen waarom u dit een relevante primaire uitleesparameter voor uw onderzoek vindt?

Antw: Ik bedoelde hiermee de conditie van de (resterende) tumorcellen, dat in dit geval namelijk humane immuun cellen zijn, en tumor infiltrerende immuun cellen die in het biopt/cel suspensie aanwezig waren op het moment van transplantatie. Is inderdaad verwarrend en daarom verwijderd uit de aanvraag.

- In bijlage 3.4.4.2 van de dierproeven staat dat tumorcellen worden gelabeld met luciferase om

vervolgens een FACS meting te doen uit te voeren. Dit is niet logisch. Kunt u dit verhelderen of uit de aanvraag halen?

Antw: Verwijderd uit de tekst

- In bijlage 3.4.4.2 staat bij de 'estimated numbers Development of PDX tumor models: Approx.. 500'. Kunt u een onderbouwing geven hoe u aan dit aantal dieren bent gekomen?

Antw: De onderbouwing voor maximaal 500 dieren staat in de tabel en nu ook aangegeven in de tekst:

In this stage we will compare the efficiency and feasibility of orthotopic inoculation and compare cells isolated by different methods (e.g. physical dissociation, enzymatic dissociation followed by magnetic beads or FACS sorting), vs bulk suspensions or complete biopsies. In addition, we will determine whether transplants or (semi) purified cells can be passaged to recipient mice to increase the number of cells available for inoculation. Number of animals needed for these experiments is approx.. 200.

As a second step we will determine whether larger (cryopreserved) batches of genetically characterized (tumor) cells can be made and used to generate models representing 5.1 lid1c

For each of these 20 samples we will generate models (n=5) which will be analysed by genetic/immunohistochemical analysis of tissues obtained at the end of the experiments. For fast growing tumors (as judged macroscopically) we will use FACS to check for blood involvement. These experiments will be repeated at least once to confirm reproducibility and thus paving the way for the final step, testing of treatment modalities under standardized conditions. Number of animals needed for these experiments is max 300.

- Kunt u in bijlage 3.4.4.2 aangeven of u mannelijke en/of vrouwelijke dieren gebruikt voor uw proef?

Antw: We hebben geen voorkeur, maar als tijdens de uitvoering van de experimenten blijkt dat een model robuuster is in een vrouwelijke of mannelijke muis zullen we dat bij voorkeur gebruiken. In tekst toegevoegd: "We have a priori no preference for male or female mice, but this might change in course of the experiments (e.g. when a particular model turns out to be more robust in male or female)".

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



Form Project proposal

- This form should be used to write the project proposal for animal procedures.
- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed.
- For more information on the project proposal, see our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

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

2 Categories

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

3 General description of the project

3.1 Background

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

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

Cutaneous lymphomas are cancers of lymphocytes that primarily involve the skin. Each year about 160 new cases are diagnosed in the Netherlands. Once it was recognized that primary cutaneous lymphomas, (malignant lymphomas presenting in the skin without concurrent extracutaneous disease) have a

completely different clinical behavior and prognosis than histologically similar systemic lymphomas involving the skin only secondarily, different types of treatment were initiated. In the last two decades several new types of primary cutaneous T-cell lymphomas (CTCL) and primary cutaneous B-cell lymphomas (CBCL) were described in connection with appropriate aggressiveness in therapy. Correct diagnosis and prognosis are of utmost importance for adequate treatment, i.e. aggressive treatment where needed and avoiding overtreatment of relatively benign lesions needlessly burdening the patient (very different from systemic lymphomas). Clinical studies and formalizing diagnostic criteria [Willemze et al., 2019] by the European Organisation of Research and Treatment of Cancer (EORTC) contributed greatly. We are now pursuing further refinement by objective molecular criteria. Cutaneous T-cell lymphoma (CTCL) is the most common type of cutaneous lymphoma, and typically in early stages presents with red, scaly patches or plaques on the skin (Fig. 1).

5.1 lid1c

Fig 1. Different stages of tumor development in cutaneous T-cell lymphoma. On top clinical representation, below cartoons schematically describing the change in malignant vs non-malignant cells during progression (Adapted from (Krejsgaard et al, 2017)).

CTCL often mimics eczema, psoriasis, or another chronic dermatitis (Fig. 2), causing substantial delays in proper diagnosis and adequate treatment, sometimes by years or even decades when the tumor may still suddenly progress to a fatal stage.

5.1 lid 1 c

5.1 lid 1 c

5.1 lid1c

As primary cutaneous lymphoma cells are extremely difficult to culture in vitro, most likely because a proper micro-environment is lacking, we have to resort to mouse models to study the impact of these defective genes.

5.1 lid1c, 5.1 lid2h

alterations as potential causes of CTCL and subsequently as therapeutic targets for MF in particular.

5.1 lid1c

5.1 lid2f, 5.1 lid1c

5.1 lid2f

In sum, in this project we aim to elaborate on the genetic findings and create in vivo mouse models of autochthonous CTCLs permitting the necessary next steps in dissecting the precise role(s) of selected genes in the pathogenesis. Our window of interest is primarily the early stage of tumor development rather than the advanced stage. This cannot be studied in humans because patients are not seen in the clinic at that stage, nor can we use currently available organ models because the interaction between the oncogenic pathways and the immune system is lacking.

These genetic mouse models can serve as valid experimental models for (targeted) therapy. In addition, we want to test and compare efficacy of novel targeted therapies, based on insights from the clinic or from our genetic tumor-prone animals. Therefore, these treatments will be tested for efficacy in human CTCLs implanted in immune-compromised mice. In this perspective mouse models can be instrumental in establishing that recurring genetic alterations in the genomes of cutaneous lymphomas and chronic inflammation are indeed tumor drivers and that targeting these alterations may actually prevent or cause regression of the tumor.

5.1 lid2e, 5.1 lid2h

5.1 lid2e, 5.1 lid2h

Gallardo M, Lee HJ, Zhang X, Bueso-Ramos C, Pagoon LR, McArthur M, Multani A, Nazha A, Manshoury T, Parker-Thornburg J, Rapado I, Quintas-Cardama A, Komblau SM, Martinez-Lopez J, Post SM. hnRNP K Is a Haploinsufficient Tumor Suppressor that Regulates Proliferation and Differentiation Programs in Hematologic Malignancies. *Cancer Cell*. 2015 Oct 12;28(4):486-499.

5.1 lid2e, 5.1 lid2h

Lindahl LM, Willerslev-Olsen A, Gjerdrum LMR, Nielsen PR, Blümel E, Rittig AH, Celis P, Herpers B, Becker JC, Stausbøl-Grøn B, Wasik MA, Gluud M, Fredholm S, Buus TB, Johansen C, Nastasi C, Peiffer L, Kubat L, Bzorek M, Eriksen JO, Krejsgaard T, Bonefeld CM, Geisler C, Mustelin T, Langhoff E, Givskov M, Woetmann A, Kilian M, Litman T, Iversen L, Odum N. Antibiotics inhibit tumor and disease activity in cutaneous T-cell lymphoma. *Blood*. 2019 Sep 26;134(13):1072-1083.

Pecorino L. In: *Molecular Biology of Cancer*, 3rd ed. Oxford Univ, Press, 2012.

5.1 lid2e, 5.1 lid2h

3.2 Purpose

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

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

The primary aim of the project is to understand the function of crucial (early) tumor drivers of cutaneous lymphoma.

Eventually, this knowledge may lead to targeted therapies that can efficiently cure patients or prevent progression to malignant stages. To enable an extensive experimental approach to optimize such interventions we aim to develop credible mouse models representing cutaneous T-cell lymphoma. Here, this overarching aim is broken down into sub-goals which can be addressed by mouse experiments. **First of all:**

5.1 lid1c

5.1 lid2e, 5.1 lid2h

3.3 Relevance

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

The scientific relevance lies in determining the main signaling pathways that prove to cause cutaneous lymphoma in the mouse models and establish clear parallels with what is observed in patients. [5.1 lid1c](#)

In relation to clinical practice and derived social relevance, well-demarcated molecular diagnosis is important for proper prognosis and for properly matched therapies, especially in early stages to avert further detrimental development. Such diagnosis is currently attained by systematic clinical and immunohistological analyses. This project aims to establish more objective and reliable refined diagnostic and prognostic molecular markers that will better identify patients at risk of a detrimental disease course. Accordingly, such markers will also guide development of novel therapeutic approaches that will further improve treatment of these patients. [5.1 lid2h](#)

3.4 Research strategy

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

The structure of the project is shown in the flow diagram below (Fig. 4), where the different mouse-experimental protocols are dealt with in the stated numbered appendices and refer back to sub-goals in section 3.2:

appendix 1 corresponds with sub-goal a) and starts with GEM (Genetically Engineered Mouse) strains to generated cutaneous lymphoma, appendix 2, corresponds with sub-goal b), and employs xenotransplants of human cutaneous lymphoma.

Sub-goal c), testing drugs, makes up the final parts of both appendices 1 and 2.

Acquiring the GEM strains, is the lead in to the experiments discussed in appendix 1. What is also clear from this depiction is how the full circle, patient-mouse-patient, will be established; the final part through experimental therapies. Drug(s) will be selected based on current treatments, and according to the outcome of the genomic analysis of the experimental tumors, either of murine or human origin as well as from (recent) literature. Herewith, the overall strategy, starting from and comparison with human cutaneous lymphoma, is clearly visualized.

5.1 lid1c

Fig. 4. Flowchart to outline the structure of the project. See text for explanation.

There are two arms in the project: one generating de novo tumors in transgenic mice and the other based on xenotransplants of human cutaneous lymphoma (PDX model). 5.1 lid1c

5.1 lid1c

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

This project encompasses three main parts, following sub-goals stated under section 3.2

5.1 lid1c

5.1 lid1c

5.1 lid1c

[Redacted content]

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

5.1 lid1c

5.1 lid1c

[Redacted content]

5.1 lid1c

[Redacted content]

5.1 lid 1 c

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

Serial number	Type of animal procedure
1	Testing of GEMMs: Induction, progression and targeted treatment of skin lymphomas
2	Patient derived xenografts transplant models
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.

5.1 lid2h

1.2 Provide the name of the licenced establishment.

5.1 lid2h

1.3 List the serial number and type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
1	Testing of GEMMs: Induction, progression and targeted treatment of skin lymphomas

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

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

The first part deals with the protocol for the induction 5.1 lid1c

5.1 lid1c

5.1 lid1 c

5.1 lid2e, 5.1 lid2h

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

5.1 lid1 c

5.1 lid1 c

5.1 lid 1 c

5.1 lid 1 c

End of the experiment:

After reaching the experimental end point by successful treatment or by pre-set treatment duration determined in advance for each experiment, the animals will be killed by standard method according to Annex IV EU Directive 2010/63 with minimal discomfort.

Sample for analysis:

- blood collection via tail vein (volume and frequency according to guidelines Diehl et al., 2001) or under terminal anesthesia (orbital puncture or heart puncture).
- euthanasia by means of an authorized method according to Annex IV EU directive 2010/63 followed by removal of tumor and tissues for analysis in the laboratory.

5.1 lid2e, 5.1 lid2h

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

We will make a distinction between experiments with different outcome parameters.

Tumor induction: We are primarily interested in two main end points upon [5.1 lid1c](#)

Unfortunately, there is no precedent to guide us on this animal model for [5.1 lid1c](#)

Hence, we will first need to perform pilot experiments with modest numbers of animals, i.e. $n = 5$ per group. Next, we can decide on proper mouse numbers and endpoints (e.g. scoring the time laps or number of skin applications required to get to the intended endpoint). If required we can scale up the experiment according to a proper power analysis of the acquired pilot data. In broad outline, we aim to attain both a statistically and biologically significant endpoint, i.e. also with an evident and potentially clinically relevant difference between control and test groups.

For tumor latencies, sizes and number per mouse (real numbers), we aim to have differences of at least 2 SD (standard deviations) between group means (either or not logarithmically transformed to have proper normal distributions in the endpoints). With a required significance of $p < 0.05$ and a power of at least 0.8 we will calculate group size with the standard formula (i.e. $n = 2((Z_{\alpha/2} - Z_b)/2)^2$, with $Z_{\alpha/2} = 1.96$ and $Z_b = -0.84$). We will use two-tailed Student's t-test to determine if two sets of normally distributed data are significantly different from each other (or one-way ANOVA in comparing multiple

groups). Log-rank test will be performed for survival and time to progression curves. For all studies, $P < 0.05$ will be considered significant.

Tumor progression analysis: Evolution and progression of tumors will be studied by analysis of tumors generated under standardized conditions based on previous experiments. We aim to analyze in depth (by next generation sequencing, expression profiles, morphology etc.) representative samples of 7 early stage, 7 moderate and 7 late stage tumors for each transgenic mouse model. Data will be analyzed with appropriate software packages to establish significance in differences in expression.

Tumor treatment: A distinction is made between experiments with the outcome parameter (1) analysis of parameters via sampling, whereby the means between groups is compared by t-test, ANOVA or non-parametric test and (2) effectiveness by means of Kaplan-Meier survival analysis (% vs time).

For each experiment and outcome parameter, the minimum number of animals needed to achieve a statistically meaningful result between the main test groups will be calculated using appropriate software (e.g. Stata, MedCalc, or CCRB, ClinCalc on line or other for survival statistics). The necessary information about the spread and the expected treatment effect is extrapolated from a pilot experiment or previous comparable experiments or from literature. An average experiment will contain 3-6 different groups (eg untreated, treatment A, treatment B, treatment C, treatment A + B + C). An experiment with (1) an analysis of parameters via sampling will contain 4-7 animals per group, assuming an effect size of at least 150 - 200% (difference/sd) to be demonstrated, a significance threshold of 5% and a power of 80%. An experiment with (2) outcome parameter effectiveness will contain 6-11 mice per group, depending on the expected hazard ratio (between 0.20 and 0.30), with an alpha of 0.05 and a power of 80%. Power calculations for individual experiments will be based on latest information from literature or own experiments on variation and discussed with IvD and bio-statistician.

5.1 lid1c

B. The animals

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

Mice will be used originating from own breeding facility or obtained from a reputable supplier or institute. The mice will have an age of 6 - 20 weeks at the start of the experiment; preferably age-matched within 4 weeks for each experiment, but no more than 10 weeks age differences. Both males and females can be used initially, but depending on the type of tumors and the rate at which they will develop, a preference for either male or female might emerge.

5.1 lid1c

For the final stage of the project with various curative treatments, a typical experiment for each model will contain a maximum of 6 groups (5 treatment options + control) with a maximum of 12 animals per group, ie a maximum of 72 animals per experiment. We envisage 3 modes of delivery (topical – mild discomfort - , injection,- moderate discomfort or drinking water, no discomfort). We will have 4 tumor models representing different skin lymphoma models. Maximum animals required for this is $72 \times 4 \times 3 = 864$ animals. This brings us to a total of 2444 mice.

5.1 lid1c

Table 1

	group size	# of groups	# of models	'repeat' x	Sub total
Initially, pilot	7	5	4	0	140
Follow-up	12x3 [#]	5	4	1	1440
Treatment	12	6	4	2*	864
Total # mice					2444

*different treatments (routes) #expanded group size for sampling of approximately 3 tumor stages (early, moderate and late)

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement: Primary cutaneous lymphoma cells are extremely difficult to culture in vitro, most likely because a proper micro-environment is lacking. 5.1 lid2h

5.1 lid2h

Even if successful, effects are expected to be different in an intact body due to; among other things, the interaction with the tumor environment and stroma, induction of a systemic immune response and the spread in vivo. Therefore, to gain understanding of the pathogenesis of the novo tumors we need the intact animal to simulate 5.1 lid1c

The effectiveness of certain (combination) therapies that depend on a systemic immune response should be tested in an intact organism and cannot be replaced.

Reduction: To reduce the number of animals, we have tested and will test and optimise combinations of treatments using appropriate cell lines from the few cutaneous lymphoma cell lines available. Although these cell lines can give a good indication of interesting combinations, unfortunately not all questions can be answered with these models. We deploy a step-wise approach in the project on different levels to minimize the number of mice. Candidate genes and resulting constructs are first tested in vitro. Moreover, for each model we will start with optimization of dose and time. Only the most promising

gene(s), best representing the skin lymphoma entities, will then be tested in vivo for treatment modalities (final stage). Through these steps we aim to use the mice as efficiently as possible and to reduce the number of mice. Deploying standard therapies in the GEMMs for reference, also provides a reference for minimal required effect levels – i.e. new therapies should prove superior - and corresponding group sizes. Using appropriate statistical power calculations, the number of animals in these experiments will be kept to a minimum.

Refinement: The first signs of cutaneous lymphoma development can be seen in the skin at an early stage of tumor development. Thus, the experimental endpoint of the majority of experiments will be 1000mm³ which is well ahead of achieving the maximum cumulative tumor burden of 2000mm³ mentioned in the code of practice animal tests in cancer research. This greatly reduces the level of discomfort. Moreover, the blood of these animals will be screened for systemic dissemination.

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

The experiments will be carried out by experienced, well-trained and qualified personnel. The animals will be accurately monitored and reported. Pain relief methods are applied where and when necessary. In case intra-tumoral injections are used for treatment, this will be done under anaesthesia, according to the applicable Standard Operating Procedures (SOPs).

In order to prevent adverse effects on the pathogen status of the lab, all reagents and cells that go into the mouse will be screened. All biological material is disposed of via regulated procedures.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Anesthesia is used during intra-tumor injections according to the applicable Standard Operating Procedures (SOPs).

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Genotyping requires ear clipping at a young age. 5.1 lid1c

Injections and drawing of blood cause pain and stress. When mice awaken after sedation (necessary for some experiments to avoid licking of topically applied medication) they experience stress.)

Explain why these effects may emerge.

5.1 lid1c

, thus keeping the discomfort to a minimum and - important to this long term experiment - in order to not have scratch wounds (which can cause aspecific tumor promotion).

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

Every effort is made to prevent complications, including through the deployment of experienced staff and working with standard protocols. In addition, the mice are closely monitored during the first 4-6 hours and again 24 hours after anesthesia. Should a complication arise, the animal is immediately taken out of the experiment / killed.

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

Human endpoints:

General: We adhere to the humane endpoints as described in the "code of practice animal experiments in cancer research" (20% weight loss, apathy, moribund and, typical risk of ~~for~~ our type of experiments, severe scratching/wounding or overly agitated upon touching treated skin). During the experiments we will consult our local animal welfare panel (IvD) when complications arise. In the rare event (we aim to keep it well below 5%) that one of the humane endpoints is reached, e.g. because of an 'explosive' tumor growth/dissemination, the animal will be immediately taken out of the experiment and killed in accordance with Annex IV of the 2010/63 / EU directive. It will also be critically examined (based on the available information from all laboratory animals within the experiment) whether a certain experiment in progress should be stopped in its entirety or not.

The humane endpoints differ per model.

5.1 lid1c

For the advanced, late stage models and treatment thereof the following humane endpoints also apply:

5.1 lid1c

- The limit is in any case at: The animal loses more than 15% of the body weight in a relatively short time (1-2 days) or the body weight has decreased by more than 20% compared to the own weight at the start of the test , or a body condition score of 2 or lower.

Ullman-Culleré MH, Foltz CJ. Body condition scoring: a rapid and accurate method for assessing health status in mice. Lab Anim Sci. 1999 Jun;49(3):319-23.

Indicate the likely incidence.

<5 and <10% resp, in induction experiments and experimental treatment (more advanced tumors); these are percentages we want to stay well below of and we think are achievable – but with these novel experiments we have no data yet.

K. Classification of severity of procedures

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

Pilot experiments will show at what rate tumors will develop and 5.1 lid1c . A (pilot) experiment for induction of tumors will encompass 5 groups with a maximum of 7 animals per group, ie a maximum of 35 animals per experiment. With 4-GEMMs we arrive at 140 mice. In repeating experiments (on average 2 times for each model) for optimization, possible expansion of group size (anticipated average of n = 12) and closer study of tumor progression with further sampling, we get an additional 1440 mice (see table below). 5.1 lid1c

For the final stage of the project with various curative treatments, a typical experiment for each model will contain a maximum of 6 groups (5 treatment options + control) with a maximum of 12 animals per group, ie a maximum of 72 animals per experiment. We envisage 3 modes of delivery (topical – mild discomfort - , injection, – moderate discomfort or drinking water, no discomfort). We will have max 4 tumor models representing different skin lymphoma. Maximum animals required for this is 72 x 4 x 3 = 864 animals. This brings us to a total of 2444 mice.

Although some of the treatment regimens to raise the tumors (mainly repeated topical challenges maintaining chronic skin inflammation) impose mild to moderate discomfort, the treatment of the tumors will most likely cause moderate discomfort.

	group size	# of groups	# of models	'repeat' x	Sub total	discomfort
Initially, pilot	7	5	4	0	140	50% mild 50% moderate
Follow-up	12x3 [#]	5	4	1	1440	50% mild 50% moderate
Treatment	12	6	4	2*	864	100% moderate
Subtotals					790 1654	Mild Moderate
Total # mice					2444	32% mild 68% moderate

*different treatments (routes)

[#]expanded group size for sampling and analysis of approximately 3 tumor stages (early, moderate and late)

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

In order not to cause the tumor burden to become too large and for the removal of organs or samples, it is essential to kill the animals.

After reaching the experimental end point, or treatment duration determined in advance for each experiment, the animals are killed via the usual euthanasia method according to Annex IV EU Directive 2010/63 with minimal discomfort.

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

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

Yes



Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.

5.1 lid2h

1.2 Provide the name of the licenced establishment.

5.1 lid2h

1.3 List the serial number and type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
2	Patient Derived Xenograft (PDX) models

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

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

5.1 lid1c

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

Tumor inoculation

5.1 lid1 c

5.1 lid1 c

5.1 lid2e, 5.1 lid2h

5.1 lid2e, 5.1 lid2h

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

A distinction is made between experiments by the different outcomes (1) analysis of variables via sampling, in which the averages between groups are compared by means of a t-test, ANOVA or non-parametric test and (2) effectiveness by means of Kaplan-Meier survival analysis. For each experiment and outcome variable, the minimum number of animals will be calculated that is needed to achieve a statistically meaningful result between the most important test groups. For this, use is made of sample size calculation software (PS Power and Sample Size Calculations Dupont and Plummer Vanderbilt University) and, if necessary, advice is requested from statisticians. The required information about distribution and the expected treatment effect is extrapolated from a possible pilot experiment or previous comparable experiments or from the literature.

A typical experiment with (1) analysis of variables via sampling will contain 4-7 animals per group, assuming a demonstrable effect size of at least 150 - 200 %, (difference in mean/sd), an unreliability threshold (alpha) of 5% and a power of 80%. An experiment with the outcome variable (2) % tumor clearance ('survival of tumor') will contain 6 - 11 mice per group, depending on the expected hazard ratio (e.g., 0.2 - 0.3), with an alpha of 0.05 and a power of 80%. Power calculations for individual experiments will be based on latest information from literature or own experiments on variation and discussed with IvD and bio-statistician .

B. The animals

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

Animal species:

5.1 lid2h, preferentially NSG mice (deficient in T, B and NK cells). We have a priori no preference for male or female mice, but this might change in course of the experiments (e.g. when a particular model turns out to be more robust in male or female).

Origin of the animals:

The mice acquired from a registered breeding company or - if available - from our own breeding.

Stages of life:

Mice will be 8 to 20 weeks old at the start of the experiment (preferentially within a 4-week range for each experiment).

Estimated numbers:

Development of PDX tumor models: Approx..500

In this stage we will compare the efficiency and feasibility 5.1 lid1c

Number of animals needed for these experiments is max 300.

Treatment:

An average experiment to test treatment will contain 4 different groups.

For example in phase 1, monotherapy, the following groups: mock, dose 1, dose 2, dose 3.

For example in phase 2, combination therapy, the following groups: untreated, treatment A, treatment B, treatment A + B).

For experiments with outcome type 1 (variables) / phase 1: 4 - 7 mice per group.

For experiments with outcome type 2 (survival)/ phase 2: 6 - 11 mice per group.

5.1 lid1c

We estimate the maximum number of animals required for the next 4 years at 1720 animals

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement: Primary cutaneous lymphoma cells are extremely difficult to culture in vitro, most likely because a proper environment is lacking. 5.1 lid1c, 5.1 lid2h

To reduce the number of animals, we will test and optimise combinations of treatments using the few available cell lines. Although these cell lines can give a good indication of interesting combinations, unfortunately not all questions can be answered with these models. The effects are expected to be different in an intact organism due to, among other things, the accessibility of the tumors, the spread in vivo, the interaction with the tumor environment and stroma, induction of a systemic immune response.

Reduction: A phasing has been applied to the project. New candidate treatments are first tested in vitro on tumor cell lines. Only the best are then tested in vivo, starting with dose and injection route optimization (phase 1). Only the most promising treatment on the optimal dose will then be tested in the combination experiments (phase 2). Through step-wise approach, we aim to use the mice as efficiently as possible and to reduce the number of mice. The minimum number of animals per experiment will be determined with the help of statistical calculations.

Refinement: The first signs of cutaneous lymphoma development can be seen in the skin at an early stage of tumor development. Thus, the experimental endpoint of the majority of experiments will be 1000mm³ which is well ahead of achieving the maximum cumulative tumor burden of 2000mm³

mentioned in the code of practice animal tests in cancer research. This greatly reduces the level of discomfort. Moreover, the blood of these animals will be screened for systemic dissemination.

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

Pain relief will be applied peri-operatively according to the applicable Standard Operating Procedures (SOPs). The experiments will be conducted by experienced, well-trained and authorized personnel. The animals are carefully monitored to identify any complications.

To prevent adverse environmental effects, all reagents and cells that go into the mouse are screened. All biological material is disposed of via regulated procedures.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

Entirely novel experiments – no prior examples to be guided by.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Pain relief will be applied peri-operatively to relieve pain. Anesthesia is used during intra-tumor injections, according to the applicable Standard Operating Procedures (SOPs).

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

The animals may experience stress and / or irritation from problems from the wounds. The stitches (in case of transplanted human biopsies) can be clawed open or gnawed open, which can cause pain or complications, such as the opening of the wound and infection.

Explain why these effects may emerge.

Stress can be caused by the actions (injections of tumor cells, injections of drug candidates, blood collection) and disorientation after waking up the anesthesia. Irritation can be caused by the stitches (if applicable).

Stress, itching and natural behavior can cause the stitches to be scratched or nipped and infected.

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

Every effort is made to prevent complications, including through the deployment of experienced staff and working with standard protocols. In addition, the mice are closely monitored during the first 4-6 hours and again 24 hours after surgery. Should a complication arise, the animal is immediately taken out of the experiment / killed.

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

Human endpoints:

General: We adhere to the human endpoints as described in the "code of practice animal experiments in cancer research". In the unlikely event that one of the human endpoints is reached, the animal will be immediately taken out of the experiment and killed in accordance with Annex IV of the 2010/63 / EU directive.

The human endpoints differ per model.

The following human endpoints apply to subcutaneous tumors:

- achieve maximum cumulative tumor size measured in 3 dimensions of 1000 mm³.
- severe skin irritation or if the tumor breaks through the skin.
- achieving a body condition score of 2 or lower (according to Ullman-Culleré and Foltz, 1999)

For the orthotopic models the following human end points apply:

- Combination of several factors including the total tumor burden measured with bioluminescence (maximum intensity reached), the size of the tumor, the location of the tumor (s), the amount of tumors, the course of the mouse weight and the well-being / behavior and the locomotion of the mice, the body condition score (according to Ullman-Culleré and Foltz, 1999).
- The limit is in any case at: The animal loses more than 15% of the body weight in a relatively short time (1-2 days) or the body weight has decreased by more than 20% compared to the own weight at the start of the test , or a body condition score of 2 or lower.

Indicate the likely incidence.

5%

K. Classification of severity of procedures

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

	Species	Number of animals	category (cumulative)	Discomfort (sum of procedures)
Pilots on tumor inoculation & tumor cells passaging thru successive host mice	mouse	150	100% mild	Only inoculation of cells and subsequent observation

Pilots on tumor cutaneous implants	mouse	50	100% moderate	Implant thru surgery under anesthesia and subsequent analgesia
Subcutaneous models, tumor inoculation via injection	mouse	Max 300	50% mild 50% moderate	Tumor inoculation by injection and measurement Blood collection (each mild but moderate in accumulation)
(sub)cutaneous models with biopsies or tumor inoculation via injection	mouse	1220	100% moderate	Tumor inoculation /transplantation via surgery; Treatment under inhaled or injected anesthesia; Blood collection
Total		1720	17% mild, 83% moderate	

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

In order not to cause the tumor burden to become too large and for the removal of organs or samples, it is essential to kill the animals at the appropriate time (either preventing excessive discomfort or planned beforehand).

After reaching the experimental end point, or treatment duration determined in advance for each experiment, the animals are killed via the usual euthanasia method according to Annex IV EU Directive 2010/63 with minimal discomfort.

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

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

Yes

Naam van het project	Muismodellen voor huidlymfomen: ontwikkeling, karakterisering en mogelijkheden voor behandeling
NTS-identificatiecode	NTS-NL-192733 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.	48
Trefwoorden	huidlymfoom autochtoon muismodel PDX muismodel
Doel(en) van het project	Fundamenteel onderzoek: Oncologie Omzettinggericht en toegepast onderzoek: Kanker bij de mens

DOELSTELLINGEN EN VERWACHTE VOORDELEN VAN HET PROJECT

Beschrijf de doelstellingen van het project (bijvoorbeeld het aanpakken van bepaalde wetenschappelijke onduidelijkheden, of wetenschappelijke of klinische behoeften).	Huidlymfomen zijn opvallende, direct zichtbare, vormen van witte bloedcel kankers, die ontstaan in de huid. We hebben door genetische analyse van deze lymfomen uit patiënten aanwijzingen gevonden (mutaties) die de ontwikkeling tot een kanker kunnen verklaren. Nu willen we gebruik maken van genetisch aangepaste diermodellen om het gevolg van deze afwijkingen in witte bloedcellen in de huid nauwkeurig vast te stellen. Daarnaast willen we gebruik gaan maken van transplantatie modellen waarbij menselijke huidlymfoomcellen in geschikte muizenmodellen gebracht worden. In beide modellen zullen we testen of nieuwe medicijnen werkzaam zijn.
Welke potentiële voordelen kan dit project opleveren? Leg uit hoe de wetenschap vooruit kan worden geholpen of mensen, dieren of het milieu uiteindelijk voordeel kunnen hebben bij het project. Maak, waar van toepassing, een onderscheid tussen voordelen op korte termijn (binnen de looptijd van het project) en voordelen op lange termijn (die mogelijk pas worden bereikt nadat het project is afgerond).	<p>Wetenschappelijk Er worden muismodellen gemaakt waarin de muizen huidlymfomen krijgen die erg lijken op die van de mens. Hiermee kunnen we meer inzicht krijgen in lymfoomontwikkeling.</p> <p>Maatschappelijk Behandelmogelijkheden voor huidlymfomen zijn zeer beperkt en hebben vaak ernstige bijwerkingen die de kwaliteit van leven aantasten. Het meest voorkomende type huidlymfoom heeft een incidentie van 1:100.000, waarbij 20% van de patiënten overlijdt binnen 5 jaar na diagnose; meer agressieve typen hebben een 5-jaar overleving van 20-25% en een incidentie van 1 op 1 miljoen. Dit project zal hopelijk bijdragen aan het vinden van methoden die bij behandeling van huidlymfomen effectief (en bij voorkeur al in een vroeg stadium van de ziekte) ingezet kunnen worden.</p>

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>De genetisch aangepaste muizen krijgen op jonge leeftijd een oorknip voor controle op de genetische aanpassing, ze worden behandeld met een stofje op de huid voor het opwekken van een (eczeem-achtige) huidontsteking en met een stof die zorgt voor een eenmalige genetische verandering in immuun cellen in de huid.</p> <p>In andere muizen worden huidlymfocytcellen getransplanteerd. In deze transplantatiemodellen worden tumorcellen van patiënten ingebracht in de huid d.m.v. eenmalige injectie of via een chirurgische ingreep (eenmalig).</p> <p>Muizen krijgen vervolgens medicijnen toegediend: op de huid, in de huid via injectie of via het drinkwater.</p> <p>Ook zal er bij muizen bloed worden afgenomen voor het meten van bloedwaarden.</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>De oorknip duurt kort pijn, het scheren voorafgaand aan opwekken van een huidontsteking geeft kort stress. De huidontsteking kan gepaard gaan met jeuk, als dit geconstateerd wordt (bijv. door krabgedrag) wordt de handeling onmiddellijk gestaakt en pas weer voortgezet als jeuk is verdwenen. De opgewekte huidontsteking blijkt de eerste 10 weken (duur van pilot experiment) geen jeuk te geven. Injecties en bloedafname geven kort pijn en stress. Sommige dieren worden verdoofd (bijv. bij behandeling om aflikken te voorkomen, injecties, implanteren van tumormateriaal) het wakker worden geeft stress. In een uitzonderlijk geval kunnen tumoren uitzaaien zonder dat het opgemerkt wordt in het bloedbeeld; dit gaat gepaard met gewichtsverlies. Bij gewichtsverlies van > 20% wordt het dier gedood. De meeste handelingen en het ontstaan van tumoren geven licht ongerief, maar meerdere combinaties en/of herhalingen worden als matig beoordeeld. De mate van ongerief in dit project is als volgt verdeeld: Licht: 25% Matig: 75%</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>4164</td> <td>0</td> <td>1090</td> <td>3074</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>	Soort:	Totaal aantal	Geraamde aantallen naar ernstgraad				Terminaal	Licht	Matig	Ernstig	Muizen (<i>Mus musculus</i>)	4164	0	1090	3074	0
Soort:	Totaal aantal			Geraamde aantallen naar ernstgraad													
		Terminaal	Licht	Matig	Ernstig												
Muizen (<i>Mus musculus</i>)	4164	0	1090	3074	0												
<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>Alle dieren worden na afloop van het experiment gedood. Er worden weefsels uitgenomen voor analyse in het laboratorium.</p>																

TOEPASSING VAN DE DRIE V'S

<p>1. Vervanging Beschrijf welke diervrije alternatieven op dit gebied voorhanden zijn en waarom zij niet voor het project kunnen worden gebruikt.</p>	<p>Combinaties van behandelingen worden geoptimaliseerd met behulp van cellijnen (eigen werk) of zijn bekend vanuit de (medische) wetenschappelijke literatuur. Maar de effecten in een levende muis met huidlymfoom kunnen anders zijn dan in een proefdiervrij alternatief of voor andere ziektebeelden in de mens. Dit komt onder andere vanwege de toegankelijkheid van de tumoren (een medicijn moet door de huid kunnen gaan) het samenspel tussen tumorcellen en de tumoromgeving en (wellicht meest belangrijke) een functionerend afweersysteem. Er worden momenteel technieken ontwikkeld waarbij menselijke witte bloedcellen samen met nagemaakte menselijke huid worden gekweekt. Als dit lukt zullen we de resultaten van patiënten cellen in de muizenmodellen kunnen vergelijken met patiënten-cellen die in huidmodellen worden gekweekt om te bepalen in hoeverre deze kweekmodellen muizenexperimenten kunnen vervangen (bijv. voor het testen van medicijnen).</p>
<p>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.</p>	<p>Er worden alleen modellen gebruikt op basis van genetische afwijkingen die gevonden worden in patiënten waar tumoren snel ontwikkelen en vaak overlijden als gevolg van de ziekte en dus uiterst relevant zijn voor de ziekte. Daarnaast kan op basis van literatuur, eigen onderzoek en ervaring bij de mens een goede inschatting worden gemaakt van een minimaal vereist behandelingseffect en de spreiding daarin. Op grond hiervan zal, in combinatie met statistische berekeningen, het aantal dieren in een experiment tot een minimum beperkt worden.</p>
<p>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.</p>	<p>Het opwekken van een huidontsteking kan gepaard gaan met jeuk. Als dit geconstateerd wordt (bijv. door krabgedrag) wordt de handeling onmiddellijk gestaakt en pas weer voortgezet als jeuk is verdwenen.</p> <p>We gebruiken pijnstilling rondom operaties.</p> <p>Als we veel tumorcellen aantreffen in het bloed worden de dieren gedood.</p>
<p>Licht de keuze van de soorten en de bijbehorende levensstadia toe</p>	<p>Vanwege de genetische overeenkomst met de mens, de korte generatietijd, de gecontroleerde huisvesting en de mogelijkheid om muizen genetisch aan te passen is de muis het meest gebruikte proefdiermodel voor kanker. De doelstelling van dit project is om het ontstaan van huidlymfoom zo nauwkeurig mogelijk na te bootsen in de volwassen muis. Aangezien de eerste tekenen van huidlymfoomontwikkeling in een vroeg stadium al met het blote oog kunnen worden gezien zullen veel van onze onderzoeksvragen al beantwoord kunnen worden voordat grote tumoren ontstaan.</p>

VOOR EEN BEOORDELING ACHTERAF GESELECTEERD PROJECT

Project geselecteerd voor BA?	nee
Termijn voor BA	
Reden voor de beoordeling achteraf	
Bevat ernstige procedures	
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 juni 2021
Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD20209584

Instelling: 5.1 lid2h
Onderzoeker: 5.1 lid2e
Project: Maus models of cutaneous lymphomas: from pathogenesis to therapeutic intervention
Aanvraagnummer: AVD20209584
Betreft: Nieuwe aanvraag
Categorieën: Fundamenteel onderzoek
Translationeel of toegepast onderzoek

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

Proces	<p>Er zijn geen vragen gesteld aan de DEC.</p> <p>De volgende vragen over de NTS zijn aan de aanvrager gesteld:</p> <ul style="list-style-type: none">- De NTS bevat technisch taalgebruik (bijvoorbeeld transgene, genotypering en genetische modificatie) waardoor deze niet goed navolgbaar is voor het algemeen publiek. Wij verzoeken u om de technische termen in de NTS te vervangen door meer gangbaar taalgebruik of deze toe te lichten.- In bijlage 3.4.4.1 geeft u aan dat er pilots plaats vinden en hoe ze bijdrage aan dit onderzoek. Dit wordt niet vermeld in uw NTS. Kunt u dit alsnog toevoegen?- In de NTS wordt niet duidelijk dat het over een aantal specifieke en relatief zeldzame huidlymfomen gaat. Ook mist informatie over de incidentie, sterfte en overlevingskans van de patiënt. Kunt u dit alsnog toelichten?- In de NTS is het ongerief bij de dieren 860 mild en 3154 moderate. Dit komt niet overeen met de bijlage 3.4.4.1 en 3.4.4.2. Kunt u de aantallen in de NTS aanpassen zodat deze overeenkomen met de bijlages?- U zegt bij vermindering het volgende: "er worden alleen modellen gebruikt op basis van genetische afwijkingen die in de meeste huidlymfoom patiënten worden terug gevonden". Dit klopt niet aangezien u ook een model voor zeer zeldzame agressieve tumoren willen gebruiken. Kunt u dit stuk in de NTS kloppend maken met het
---------------	---

projectvoorstel?

De volgende vragen zijn aan de aanvrager gesteld:

- U heeft een projectvergunning aangevraagd van 27-04-2020 t/m 26-04-2025. De CCD realiseert zich dat u hierdoor een jaar minder de tijd heeft om uw onderzoek uit te voeren. Als u wilt dat de begin en einddatum van uw onderzoek wordt aangepast dient een nieuw getekend aanvraagformulier bij de CCD in te dienen met daarop de nieuwe data.

- In het projectvoorstel staat: "Most treatment strategies have already been optimized for humans". Deze opmerking in een onderzoeksvoorstel naar nieuwe behandelingen schept verwarring. Kunt u deze zin verhelderen of verwijderen uit het projectvoorstel?

- Het is onduidelijk hoe zeldzaam de varianten zijn die nu onderzocht worden. Kunt u de incidentie, mortaliteit en overlevingskansen van deze varianten in uw aanvraag benoemen?

- U geeft aan bezig te zijn met het ontwikkeling van in vitro modellen, maar het wordt niet duidelijk welke dierexperimenten hierdoor mogelijk over een paar jaar vervangen zouden kunnen worden. Kunt u dit verhelderen?

- Purpose of the project bij de NTS (2de tabblad) is niet gelijk aan dat van het projectvoorstel bij 2.1. Gelieve dit consistent te maken.

- In bijlage 3.4.4.1 geeft u aan 2444 dieren te willen gebruiken. Wanneer de aantallen in de tabel onder B en K bij elkaar worden opgeteld is de som hier echter geen 2444 van. Kunt u de aantallen narekenen en kloppend maken in bijlage 3.4.4.1?

- Kunt u in bijlage 3.4.4.1 onder K het cumulatief ongerief van dieren weergeven in percentages per ongeriefcategorie?

- U zegt in bijlage 3.4.4.1 van de dierproeven het volgende: when confirmed by our genetic/FACS analysis, we will test small molecule inhibitors in relevant models. Kunt u verhelderen wat het voor uw onderzoek betekent wanneer dit niet bevestigd wordt?

- In bijlage 3.4.4.2 verwijst u naar bijlage 3.4.4.1. Alle bijlages moeten opzichzelfstaand te lezen zijn. Kunt u de verwijzingen eruit halen en dit aanvullen met de juiste informatie?

- U geeft in bijlage 3.4.4.2 van de dierproeven aan bij de primary

	<p>outcome om immuunparameters te gaan testen. U maakt in deze bijlage echter gebruik van een immuundeficiente muis. Kunt u onderbouwen waarom u dit een relevante primaire uitleesparameter voor uw onderzoek vindt?</p> <p>- In bijlage 3.4.4.2 van de dierproeven staat dat tumorcellen worden gelabeld met luciferase om vervolgens een FACS meting te doen uit te voeren. Dit is niet logisch. Kunt u dit verhelderen of uit de aanvraag halen?</p> <p>- In bijlage 3.4.4.2 staat bij de 'estimated numbers Development of PDX tumor models: Approx.. 500'. Kunt u een onderbouwing geven hoe u aan dit aantal dieren bent gekomen?</p> <p>- Kunt u in bijlage 3.4.4.2 aangeven of u mannelijke en/of vrouwelijke dieren gebruikt voor uw proef?</p>			
Naam proef	Diersoort	Stam	Aantal dieren	Herkomst
3.4.4.1 Testing of GEMMs: Induction, progression and targeted treatment of skin lymphomas				
	Muizen (Mus musculus)		2.444	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn
3.4.4.2 Patient Derived Xenograft (PDX) models				
	Muizen (Mus musculus)	immunodeficient mice (NSG)	1.720	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn

Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

3.4.4.1 Testing of GEMMs: Induction, progression and targeted treatment of skin lymphomas

Muizen (Mus musculus)

Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt. Citaat: Both males and females can be used initially, but depending on the type of tumors and the rate at which they will develop, a preference for either male or female might emerge.

3.4.4.2 Patient Derived Xenograft (PDX) models

Muizen (Mus musculus)

Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt. Niet in de aanvraag vermeld, er is een toelichting gevraagd aan de aanvrager.

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

2 DEC advies

DEC-advies	<p>Citaat C1 :</p> <p>...De DEC leden hebben de indiener twee maal vragen gesteld en kritische opmerkingen gemaakt over het onderzoeksvoorstel. De aanvrager heeft naar aanleiding hiervan de documenten wel flink aangepast maar volgens de DEC leden staan er ook in deze derde versie nog zaken die onduidelijk zijn of beter verwoord hadden moeten worden. De DEC heeft besloten om ondanks genoemde tekortkomingen wel een ethische afweging te maken omdat er wel voldoende duidelijkheid verkregen is over: 1. De gevolgen voor en de belasting van de proefdieren, 2. De mogelijke opbrengst volgens de aanvragers en 3. De haalbaarheid van het onderzoeksvoorstel. Daarmee voldoet het voorstel volgens de DEC aan de definitie van een project, het vertoont overeenkomst met voorbeeld 1 uit de handleiding. Daarnaast heeft de DEC besloten om in het DEC advies naast de uitkomst van de ethische afweging ook de gesignaleerde onduidelijkheden te vermelden; deze zijn vermeld bij E-3.</p> <p>Citaat C13 (HEP):</p> <p>Naar mening van de DEC zijn de humane eindpunten voldoende duidelijk bepaald. Er zijn klinische observaties, zoals afwijkend gedrag, afwijkingen in de locomotie, duidelijke afname van lichaamsgewicht en de body condition score (volgens Ullman-Culleré and Foltz, 1999) die het HEP markeren. De opgegeven incidentie van het bereiken van een humaan eindpunt is relatief laag, <5% en < 10%. Deze inschatting wordt door het ontbreken van ervaring met deze proefopzet niet onderbouwd maar de DEC leden zien geen reden om te twijfelen aan de genoemde percentages.</p> <p>Citaat C18 (geslachten):</p> <p>De onderzoeker geeft in de eerste appendix aan dat "Both males and females can be used initially, but depending on the type of tumors and the rate at which they will develop, a preference for either male or female might emerge". In de tweede appendix wordt voor het gebruik van de NSG muizen geen sekse vermeld. De DEC gaat ervan uit dat voor het gehele onderzoek mannetjes en vrouwtjes muizen in gelijke aantallen worden gebruikt en constateert dat er geen duidelijk onderbouwing wordt geleverd waarom het gebruik van alleen mannen of alleen vrouwen gerechtvaardigd is.</p> <p>Citaat C21 (NTS):</p> <p>De niet-technische samenvatting is een compacte weergave van het project. De NTS bevat nog wel slordigheden ("de oorknip duurt kort pijn") en tegenstrijdigheden. (Bij vermindering staat: "er worden alleen</p>
-------------------	--

modellen gebruikt op basis van genetische afwijkingen die in de meeste huidlymfoom patiënten worden terug gevonden". Dit klopt niet aangezien ze ook een model voor zeer zeldzame agressieve tumoren willen gebruiken). Tenslotte is de NTS, voor de doelgroep, niet overal begrijpelijk geformuleerd.

Citaat Advies E3:

Er is tijdens de derde beoordeling en bespreking van dit projectvoorstel in de DEC vergadering geconstateerd dat ook de derde versie van de aanvraag nog steeds slordigheden en onduidelijkheden bevat die nog niet gecorrigeerd zijn. Niettemin heeft de DEC besloten om wel een ethische afweging te maken. Zaken die niet duidelijk en/of verwarrend zijn:

a. In het projectvoorstel staat: "Most treatment strategies have already been optimized for humans". Deze opmerking in een onderzoeksvorstel naar nieuwe behandelingen schept verwarring.

b. Het is onduidelijk hoe zeldzaam de varianten zijn die nu onderzocht worden.

c. Onderzoeksgroep is bezig met het ontwikkeling van in vitro modellen, maar het wordt niet duidelijk welke dierexperimenten hierdoor mogelijk over een paar jaar vervangen zouden kunnen worden.

d. In tabel 1 van appendix 1 klopt het subtotaal niet qua verdeling tussen mild en matig ongerief (790 mild en 1654 matig ipv 860 mild en 1584 matig).

e. Bij treatment modalities staat (dit betreft onderzoek met GM muizen): "We anticipate constitutive activation of the JAK/STAT pathway or NFkB pathway in tumor cells and, when confirmed by our genetic/FACS analysis, we will test small molecule inhibitors". Wat als dat niet bevestigd wordt? Wordt er dan nog ergens anders naar gekeken?

f. In appendix 2 staat dat tumorcellen worden gelabeld met luciferase om vervolgens een FACS meting te doen uit te voeren. Dit is niet logisch. De DEC gaat er van uit dat dit per ongeluk is blijven staan nadat de bioluminescentie metingen uit de appendix zijn verwijderd.

g. Bij de primary outcome (dit betreft onderzoek met de PDX modellen) staat dat de onderzoekers immuunparameters gaan testen. Aangezien er gebruikt wordt gemaakt van NSG muizen lijkt dit, volgens de DEC, geen relevante primaire uitleesparameter.

h. Her gebruik van anesthesie bij een operatie is geen refinement, maar een standaard onderdeel van de ingreep.

i. Het is onduidelijk waar de 500 benodigde dieren voor de ontwikkeling van het PDX tumor model op gebaseerd is.

Ethische afweging van de DEC:

1. Rechtvaardigt het onderzoek, naar de vroege pathogenese van

primaire huidlymfomen en naar nieuwe behandelmethoden van deze huidtumoren, de inzet van 4164 muizen gegeven het feit dat ca. 75% van deze dieren cumulatief matig en 25% cumulatief licht ongerief zullen ondervinden ?

2. Het voorgestelde onderzoeksproject met 4164 proefdieren is bedoeld om nieuwe kennis te vergaren omtrent een bijzondere vorm van huidkanker bij mensen, primaire huidlymfomen. De incidentie is laag te noemen, 160 nieuwe gevallen per jaar in Nederland, maar het ziektebeeld is veelal ernstig mede omdat de diagnose pas laat wordt gesteld waardoor de patiënten geen tijdige adequate behandeling krijgen. Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: het proefdieronderzoek is, in absolute zin, nadelig voor de muizen als gevolg van het te verwachten cumulatieve matige ongerief en de schending en aantasting van de fysieke en gedragsmatige integriteit van het dier. Daarnaast worden de dieren in het kader van het experiment gedood.

Waarden die voor onderzoekers bevorderd kunnen worden: een mogelijk voordeel door het vergaren van meer inzicht in de pathogenese en oncogene pathways van primaire huidlymfomen. Nieuwe wetenschappelijke kennis kan resulteren in publicaties die de carrière mogelijkheden van de wetenschappers kunnen bevorderen. Waarden die voor patiënten met primaire huidlymfomen bevorderd kunnen worden: een mogelijk groot voordeel omdat de prognose voor patiënten met primaire huidlymfomen kan verbeteren als in een vroeg stadium een effectieve behandeling kan worden ingezet. Waarden die voor de samenleving bevorderd kunnen worden: een mogelijk groot voordeel omdat het voorgestelde onderzoek een behandelingsstrategie kan gaan opleveren waarmee de incidentie en de ernst van primaire huidlymfomen kan worden verminderd. Dit zal leiden tot een vermindering van de ziektelast, afname van de directe kosten in de gezondheidszorg en tot een afname van de indirecte kosten door vermindering van ziekteverzuim en arbeidsongeschiktheid.

De ethische afweging door DEC leden levert geen consensus op, zes DEC leden zijn van mening dat de belangen van de patiënten (en hun naasten), de samenleving en de onderzoekers zwaarder wegen dan de belangen van de proefdieren. Daarentegen vindt één DEC lid dat de mogelijke opbrengst van het onderzoek niet opweegt tegen het te verwachten ongerief bij de muizen. De zes DEC leden vinden het verkrijgen van meer inzicht in de pathogenese van primaire huidlymfomen van groot maatschappelijk en wetenschappelijk belang; het gebruik van proefdieren is hierbij onvermijdelijk. Deze zes DEC leden geven een positief advies en het zevende DEC lid geeft een negatief advies.

3. Zes DEC leden zijn overtuigd van het belang van de doelstellingen van dit project. Naar inziens van deze DEC leden beschrijft de aanvraag belangrijk onderzoek, dat zowel maatschappelijk als ook wetenschappelijk zeer relevant is. Deze DEC leden zijn van mening dat:

- de waarden die voor de patiënten, de samenleving en de onderzoekers bevorderd kunnen worden zwaarder wegen dan de waarden die voor de proefdieren in het geding zijn
- de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstelling en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project
- dat de onderzoeksgroep voldoende kennis en ervaring heeft om met de gekozen onderzoeksstrategie en met de voorgestelde dierproeven de doelstelling te behalen en dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om het ongerief van de dieren te beperken.
- de doelstelling niet zonder het gebruik van proefdieren behaald kan worden en acht het gebruik van proefdieren en het daarmee samenhangende ongerief bij de dieren ethisch gerechtvaardigd.

De motivatie van het negatieve advies van het zevende DEC lid:
Bij aanvraag AVD9584 kom ik tot een negatief advies, d.w.z. het advies om de voorgenomen dierproeven niet toe te staan. Mijn overwegingen hierbij zijn als volgt:

- In de projectaanvraag komt naar voren dat men zeldzame vormen van cutane lymfomen wil onderzoeken, maar het blijft onduidelijk hoe zeldzaam deze cutane lymfomen precies zijn. In antwoord op onze vragen is wel genoemd dat één van de vier varianten die men wil onderzoeken gemiddeld eenmaal per vier jaar in de Nederlandse kliniek wordt gezien. Voor het onderzoek naar deze (en iedere andere onderzochte) variant wil men wel 1041 muizen opofferen. Ik vraag me ernstig af of het ongerief (dat weliswaar op maximaal 'matig' is ingeschat) voor deze muizen opweegt tegen het beperkte aantal patiënten met deze variant van de aandoening. Natuurlijk zijn er wereldwijd beduidend meer patiënten met dit type cutane lymfoom dan alleen in Nederland, maar daartegenover staat ook (zoals altijd) een kans dat het proefdieronderzoek überhaupt geen klinisch relevante toepassingen oplevert. De in onze DEC besproken suggestie dat ieder van deze vier varianten onderzocht moet worden om een totaalbeeld van de aandoening te krijgen, of dat onderzoek naar de meer zeldzame varianten wetenschappelijk of klinisch belangrijke resultaten voor andere varianten gaat opleveren, vind ik erg speculatief. Alles bij elkaar ben ik er niet van overtuigd dat het voorgenomen proefdieronderzoek naar de meest zeldzame varianten van deze aandoening gerechtvaardigd is. (Zeker in samenhang met het volgende punt.)

- De onderzoekers maken duidelijk dat ze ook aan proefdierlijke alternatieven voor dit onderzoek werken. In antwoord op onze vraag in welk stadium het in vitro onderzoek zich bevindt en wanneer het in vivo onderzoek zou kunnen vervangen, hebben de onderzoekers geantwoord dat ze niet verwachten binnen 2 jaar de in vitro modellen ontwikkeld en gevalideerd te hebben. Zeker voor zover het erg zeldzame aandoeningen betreft, zou je wat mij betreft gewoon 2 jaar moeten wachten tot deze modellen wel ontwikkeld en gevalideerd zijn. Maar het wordt ook niet erg duidelijk in hoeverre deze in vitro alternatieven echte alternatieven zullen zijn.

De onderzoekers schrijven hierover in het project proposal: "Even if successful, effects are expected to be different in an intact body due to; among other things, the interaction with the tumor environment and stroma, induction of a systemic immune response and the spread in vivo. Therefore, to gain understanding of the pathogenesis of the novo tumors we need the intact animal to simulate the (inflammatory) conditions under which the cutaneous lymphomas appear to arise. Recreating these conditions in vitro (ex vivo) is not (yet) possible." Hierin wordt niet duidelijk gemaakt welke delen van het voorgestelde onderzoek wel met in vitro modellen vervangen zou kunnen worden, en wat dit betekent voor het benodigde aantal muizen. Als het punt is dat helemaal niets van het voorgestelde onderzoek door in vitro onderzoek vervangen zou kunnen worden, dan is mij onduidelijk waarom de ontwikkeling van deze in vitro modellen überhaupt door de onderzoekers genoemd wordt. (Het werd al in het project proposal genoemd voordat we er als DEC een vraag over stelden.)

Kortom, ik ben er niet van overtuigd dat het proefdieronderzoek naar alle vier de varianten van cutane lymfomen gerechtvaardigd is, gelet op de zeldzaamheid van sommige van deze varianten en gelet op de ontwikkeling van dierproefvrije alternatieven. Misschien hadden de onderzoekers mij kunnen overtuigen als ze gericht op deze punten waren ingegaan. Aangezien we als DEC echter besloten hebben niet voor een derde maal onze vragen aan de onderzoekers voor te leggen, hanteer ik het 'nee, tenzij' principe door een negatief advies af te geven.

De DEC heeft extern advies ingewonnen bij

- de aanvrager is om aanvullingen gevraagd

De DEC heeft bij de aanvrager vragen gesteld over:

- Projectvoorstel: de subdoelen, de meerwaarde van muismodel 1 ten opzichte van muismodel 2, het stadium van het in vitro onderzoek, de

	<p>go/no-go momenten</p> <ul style="list-style-type: none"> - Appendix 1: de behandeling, cumulatief ongerief, go/no-go momenten, toepassing DNFB en huisvesting - Appendix 2: de reinoculatie/retransplantatie van tumor cellen, statische onderbouwing voor de aantallen, gebruik pups, de behandeling, cumulatieve ongerief, mogelijkheid om handelingen te combineren, het gebruikte adjuvans, het toepassen van de grimace scale, hoe bioluminescentie wordt toegepast bij de xenografts om tumor groei te monitoren, huisvesting en de humane eindpunten. - NTS verduidelijken <p>Het DEC advies is Positief</p> <p>Het uitgebrachte advies is niet gebaseerd op consensus. Zie ethische afweging punt E3</p>
--	--

3 Kwaliteit DEC advies

Kwaliteit DEC-advies	
<p>Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld. Bij de beantwoording van de beoordelvragen verstrekt u over het algemeen een heldere onderbouwing. U geeft in het advies op heldere wijze de discussies weer die in de DEC hebben plaatsgevonden. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen.</p> <p>De CCD waardeert het zeer dat u helder en navolgbaar in uw advies laat zien hoe het advies met een meerderheidsstandpunt tot stand is gekomen, en wat daarbij de afwegingen waren. De CCD kon goed volgen hoe de discussie is verlopen.</p>	

4 Inhoudelijke beoordeling

Belangen-verstrengeling	<p>5.1 lid2e</p> 
--------------------------------	---

Doelstelling

Doelstelling

Citaat:

The primary aim of the project is to understand the function of crucial (early) tumor drivers of cutaneous lymphoma.

Eventually, this knowledge may lead to targeted therapies that can efficiently cure patients or prevent progression to malignant stages. To enable an extensive experimental approach to optimize such interventions we aim to develop credible mouse models representing cutaneous T-cell lymphoma.

Here, this overarching aim is broken down into sub-goals which can be addressed by mouse experiments. First of all:

5.1 lid 1 c

<p>Wetenschappelijk en maatschappelijk belang</p>	<p>Citaat: The scientific relevance lies in determining the main signaling pathways that prove to cause cutaneous lymphoma in the mouse models and establish clear parallels with what is observed in patients. ^{5.1 lid1g}</p> <p>[Redacted]</p> <p>In relation to clinical practice and derived social relevance, well-demarcated molecular diagnosis is important for proper prognosis and for properly matched therapies, especially in early stages to avert further detrimental development. Such diagnosis is currently attained by systematic clinical and immune-histological analyses. This project aims to establish more objective and reliable refined diagnostic and prognostic molecular markers that will better identify patients at risk of a detrimental disease course. Accordingly, such markers will also guide development of novel therapeutic approaches that will further improve treatment of these patients. This cancer type is relatively rare, ^{5.1 lid2h}</p> <p>[Redacted]</p>
<p>Onderbouwing wetenschappelijk en maatschappelijk belang</p>	<p>Het belang is voldoende uitgewerkt</p>
<p>Wetenschappelijke kwaliteit Kwaliteit aanvrager/onderzoeksgroep en onderzoek</p>	<p>Citaat DEC advies C7: ^{5.1 lid2h}</p> <p>[Redacted]</p> <p>Naar inziens van de DEC beschikt de betrokken onderzoeksgroep ook over voldoende kennis van proefdieren en over ervaring met dierexperimenteel onderzoek om te kunnen voldoen aan de 3V-beginselen en om zoveel mogelijk te voorkomen dat mens, dier en milieu negatieve effecten ondervinden als gevolg van de voorgestelde dierproeven. Daarbij is de proefdierfaciliteit van de vergunninghouder goed uitgerust en zijn de biotechnici bekwaam in het verzorgen van muizen en het monitoren van gezondheidsproblemen.</p>

3V's

Vervanging	<p>3.4.4.1 Testing of GEMMs: Induction, progression and targeted treatment of skin lymphomas: Citaat: Primary cutaneous lymphoma cells are extremely difficult to culture in vitro, most likely because a proper micro-environment is lacking. 5.1 lid2h, 5.1 lid1g</p> <p>[Redacted]</p> <p>Even if successful, effects are expected to be different in an intact body due to; among other things, the interaction with the tumor environment and stroma, induction of a systemic immune response and the spread in vivo. Therefore, to gain understanding of the pathogenesis of the novo tumors we need the intact animal to simulate the (inflammatory) conditions under which the cutaneous lymphomas appear to arise. Recreating these conditions in vitro (ex vivo) is not (yet) possible. The effectiveness of certain (combination) therapies that depend on a systemic immune response should be tested in an intact organism and cannot be replaced.</p>
	<p>3.4.4.2 Patient Derived Xenograft (PDX) models: Citaat: Primary cutaneous lymphoma cells are extremely difficult to culture in vitro, most likely because a proper environment is lacking. 5.1 lid2h, 5.1 lid1g</p> <p>[Redacted]</p> <p>Results from patient cells in PDX models may then be compared with patient cells co-cultured with in vitro skin models. However, the mouse model will still be preferred to test systemic therapies and/or on systemic adverse side effects. To reduce the number of animals, we will test and optimise combinations of treatments using the few available cell lines. Although these cell lines can give a good indication of interesting combinations, unfortunately not all questions can be answered with these models. The effects are expected to be different in an intact organism due to, among other things, the accessibility of the tumors, the spread in vivo, the interaction with the tumor environment and stroma, induction of a systemic immune response.</p>

Verminderen	
	<p>3.4.4.1 Testing of GEMMs: Induction, progression and targeted treatment of skin lymphomas: Citaat: To reduce the number of animals, we have tested and will test and optimise combinations of treatments using appropriate cell lines from the few cutaneous lymphoma cell lines available. Although these cell lines can give a good indication of interesting combinations, unfortunately not all questions can be answered with these models. We deploy a step-wise approach in the project on different levels to minimize the number of mice. Candidate genes and resulting constructs are first tested in vitro. Moreover, for each model we will start with optimization of dose and time. Only the most promising gene(s), best representing the skin lymphoma entities, will then be tested in vivo for treatment modalities (final stage). Through these steps we aim to use the mice as efficiently as possible and to reduce the number of mice. Deploying standard therapies in the GEMMs for reference, also provides a reference for minimal required effect levels – i.e. new therapies should prove superior - and corresponding group sizes. Using appropriate statistical power calculations, the number of animals in these experiments will be kept to a minimum.</p>
	<p>3.4.4.2 Patient Derived Xenograft (PDX) models: Citaat: A phasing has been applied to the project. New candidate treatments are first tested in vitro on tumor cell lines. Only the best are then tested in vivo, starting with dose and injection route optimization (phase 1). Only the most promising treatment on the optimal dose will then be tested in the combination experiments (phase 2). Through step-wise approach, we aim to use the mice as efficiently as possible and to reduce the number of mice. The minimum number of animals per experiment will be determined with the help of statistical calculations.</p>
Verfijnen	
	<p>3.4.4.1 Testing of GEMMs: Induction, progression and targeted treatment of skin lymphomas: Citaat: The first signs of cutaneous lymphoma development can be seen in the skin at an early stage of tumor development. Thus, the experimental endpoint of the majority of experiments will be 1000mm³ which is well ahead of achieving the maximum cumulative tumor burden of 2000mm³ mentioned in the code of practice animal tests in cancer research. This greatly reduces the level of discomfort. Moreover, the blood of these animals will be screened for systemic dissemination.</p>
	<p>3.4.4.2 Patient Derived Xenograft (PDX) models: Zie bijlage 3.4.4.1</p>

3.4.4.1 Testing of GEMMs: Induction, progression and targeted treatment of skin lymphomas: De 3V's zijn voldoende onderbouwd

3.4.4.2 Patient Derived Xenograft (PDX) models: De 3V's zijn voldoende onderbouwd

Hergebruik	Er is geen sprake van hergebruik van dieren.
-------------------	--

Naam proef	Worden de dieren gedood?	Doden volgens richtlijn?
3.4.4.1 Testing of GEMMs: Induction, progression and targeted treatment of skin lymphomas	Ja	volgens de richtlijn.
3.4.4.2 Patient Derived Xenograft (PDX) models	Ja	volgens de richtlijn.

Naam proef		
-------------------	--	--

<p>3.4.4.1 Testing of GEMMs: Induction, progression and targeted treatment of skin lymphomas</p>	<p>HEP: < 10%</p>	<p>Citaat:</p> <p>General: We adhere to the human endpoints as described in the "code of practice animal experiments in cancer research" (20% weight loss, apathy, moribund and, typical risk of for our type of experiments, severe scratching/wounding or overly agitated upon touching treated skin). During the experiments we will consult our local animal welfare panel (IvD) when complications arise. In the rare event (we aim to keep it well below 5%) that one of the human endpoints is reached, e.g. because of an 'explosive' tumor growth/dissemination, the animal will be immediately taken out of the experiment and killed in accordance with Annex IV of the 2010/63 / EU directive. It will also be critically examined (based on the available information from all laboratory animals within the experiment) whether a certain experiment in progress should be stopped in its entirety or not.</p> <p>The human endpoints differ per model. The following human endpoints apply to developing and early (sub)cutaneous tumors:</p> <ul style="list-style-type: none"> - achieve maximum cumulative tumor size measured in 3 dimensions of 1000 mm³, or in 2 dimensions occupying 300 mm² of skin area. - severe skin irritation/scratching - achieving a body condition score of 2 or lower (according to Ullman-Culleré and Foltz, 1999) <p>For the advanced, late stage models and treatment thereof the following human end points also apply:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Combination of several factors including the total tumor burden, the course in mouse weight and well-being / behavior and locomotion of the mice, the body condition score (according to Ullman-Culleré and Foltz, 1999. - The limit is in any case at: The animal loses more than 15% of the body weight in a relatively short time (1-2 days) or the body weight has decreased by more than 20% compared to the own weight at the start of the test , or a body condition score of 2 or lower. <p>Ullman-Culleré MH, Foltz CJ. Body condition scoring: a rapid and accurate method for assessing health status in mice. Lab Anim Sci. 1999 Jun;49(3):319-23.</p>
---	----------------------	--

Muizen (Mus musculus)	Ongerief: 65,0% Matig 35,0% Licht	
3.4.4.2 Patient Derived Xenograft (PDX) models	HEP: < 5%	<p>Citaat: General: We adhere to the human endpoints as described in the "code of practice animal experiments in cancer research". In the unlikely event that one of the human endpoints is reached, the animal will be immediately taken out of the experiment and killed in accordance with Annex IV of the 2010/63 / EU directive.</p> <p>The human endpoints differ per model. The following human endpoints apply to subcutaneous tumors:</p> <ul style="list-style-type: none"> - achieve maximum cumulative tumor size measured in 3 dimensions of 1000 mm³. - severe skin irritation or if the tumor breaks through the skin. - achieving a body condition score of 2 or lower (according to Ullman-Culleré and Foltz, 1999) <p>For the orthotopic models the following human endpoints apply:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Combination of several factors including the total tumor burden measured with bioluminescence (maximum intensity reached), the size of the tumor, the location of the tumor (s), the amount of tumors, the course of the mouse weight and the well-being / behavior and the locomotion of the mice, the body condition score (according to Ullman-Culleré and Foltz, 1999). - The limit is in any case at: The animal loses more than 15% of the body weight in a relatively short time (1-2 days) or the body weight has decreased by more than 20% compared to the own weight at the start of the test , or a body condition score of 2 or lower.
Muizen (Mus musculus)	Ongerief: 90,0% Matig 10,0% Licht	

5 Samenvatting

5.2 lid1

oordeel te kunnen komen. Het DEC-advies kan als grondslag dienen voor het besluit.

Het DEC advies is niet gebaseerd op consensus. Een van de DEC leden geeft een negatief DEC advies. Zie ethische afweging punt E3. **5.2 lid1**

De DEC heeft na twee vragenrondes geconstateerd dat ook de derde versie van de aanvraag nog steeds slordigheden en onduidelijkheden bevat die nog niet gecorrigeerd zijn. Niettemin heeft de DEC besloten om een ethische afweging te maken. Het Secretariaat heeft naast de openstaande vragen van de DEC ook nog een aantal onduidelijkheden die aan de aanvrager gevraagd zijn. Dit zijn, net als de vragen van de DEC, ook slordigheden. Het ontbreken van deze onduidelijkheden zal er niet toe leiden dat de commissie geen ethische afweging kan maken.

6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning

5.2 lid1

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 <info@zbo-ccd.nl>
Verzonden: dinsdag 29 juni 2021 11:16
Aan: 5.1 lid2h; info@zbo-ccd.nl
Onderwerp: RE: DEC advies AVD9584

Geachte DEC,

De CCD heeft de aanvraag van AVD 5.1 lid2h 20209584 afgelopen vergadering besproken daarin blijven bepaalde zaken voor de CCD onduidelijk waaronder de zeldzaamheid van de te onderzoeken lymfomen. In de motivatie van het DEC lid dat tot een negatief advies komt staat het volgende: "In de projectaanvraag komt naar voren dat men zeldzame vormen van cutane lymfomen wil onderzoeken, maar het blijft onduidelijk hoe zeldzaam deze cutane lymfomen precies zijn. In antwoord op onze vragen is wel genoemd dat één van de vier varianten die men wil onderzoeken gemiddeld eenmaal per vier jaar in de Nederlandse kliniek wordt gezien." Kunt u de CCD vertellen welke variant dit betrof. Na vragen aan de aanvrager blijft het voor de CCD onduidelijk over welke variant het 7de DEC lid spreekt.

Met vriendelijke groet,

5.1 lid2e

Namens:
Centrale Commissie Dierproeven

www.centralecommissiedierproeven.nl

Prinses Beatrixlaan 2 | 2595 AL | Den Haag
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag

T: 0800-7890789 E: info@zbo-ccd.nl

Van: 5.1 lid2h
Verzonden: donderdag 27 mei 2021 14:38
Aan: info@zbo-ccd.nl
Onderwerp: DEC advies AVD9584

Geachte collega van de CCD,

In de bijlage het DEC advies voor AVD 5.1 lid2h 20209584.

Ik verneem graag of deze in goede orde is ontvangen.

Met vriendelijke groet,

5.1 lid2e

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

verwijderen.

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

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

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

5.1 lid2h 14 juli 2021,

Betreft aanvraag AVD 5.1 lid2h 20209584

Geachte CCD,

U stelde de volgende vraag:

Geachte DEC,

De CCD heeft de aanvraag van AVD 5.1 lid2h 20209584 afgelopen vergadering besproken daarin blijven bepaalde zaken voor de CCD onduidelijk waaronder de zeldzaamheid van de te onderzoeken lymfomen. In de motivatie van het DEC lid dat tot een negatief advies komt staat het volgende: "In de projectaanvraag komt naar voren dat men zeldzame vormen van cutane lymfomen wil onderzoeken, maar het blijft onduidelijk hoe zeldzaam deze cutane lymfomen precies zijn. In antwoord op onze vragen is wel genoemd dat één van de vier varianten die men wil onderzoeken gemiddeld eenmaal per vier jaar in de Nederlandse kliniek wordt gezien." Kunt u de CCD vertellen welke variant dit betrof. Na vragen aan de aanvrager blijft het voor de CCD onduidelijk over welke variant het 7de DEC lid spreekt.

In de motivatie van het DEC lid (dat negatief advies heeft uitgebracht) is niet vermeld dat de incidentie van primaire huidlymfomen, volgens het projectvoorstel, in Nederland ca. 160 per jaar is en dat komt overeen met ca. 1 op de 100.000. Daarmee voldoet het volgens informatie van de Rijksoverheid aan de definitie van een zeldzame aandoening.

<https://www.rijksoverheid.nl/.../zeldzame-aandoeningen>

Zeldzame aandoeningen zijn ziekten die bij minder dan 1 op de 2.000 personen voorkomen. Ze zijn ernstig, chronisch en vaak levensbedreigend. Mensen met een zeldzame aandoening kunnen terecht bij een expertisecentrum voor zeldzame aandoeningen (EZCA). In Nederland zijn daar ongeveer 350 van, elk met een eigen specialisatie. Deze EZCA's gebruiken hiervoor de nieuwste medische inzichten. Ook doen ze wetenschappelijk onderzoek om meer over de aandoening te weten te komen

Binnen deze groep (familie) van primaire huidlymfomen komt een zeer zeldzame vorm voor die beschreven staat in de laatste alinea van het antwoord op een vraag van de DEC.

Samenvattend in Nederlands expertisecentrum van primaire huid lymfomen 'ziet men' ongeveer 160 patiënten per jaar en de zeer zeldzame zeer agressieve vorm ziet men maar 1 keer in de vier jaar.

Ik hoop hiermee u vraag toereikend te hebben beantwoord.

Met vriendelijke groet,

5.1 lid2e

Voorzitter 5.1 lid2h .

Vraag van DEC:

Daarbij is het belangrijk om duidelijker uit te leggen wat de meerwaarde is van muismodel 1 (de geïnduceerde lymfoma's in GEMM's) t.o.v. muismodel 2 (PDX modellen) voor het behalen van de doelstelling. Volgens de DEC leden is het creëren van het eerste muismodel: een omslachtige procedure met een onzekere uitkomst en voor de muizen is het een belastende interventie die veel ongerief veroorzaakt. Kortom de DEC leden vragen zich af hoe relevant dit complexe en belastende model is gezien het ongerief dat het veroorzaakt.

Antwoord aanvrager:

Het eerste model is er op gericht om vroege veranderingen in het ontstaan van huidlymfomen beter te begrijpen. Met deze informatie kan in de klinische praktijk de diagnose en prognose van vroege huidlymfomen verbeterd worden. Een autochtoon muismodel waarin huidlymfomen op een gecontroleerde, voorspelbare en reproduceerbare wijze geïnduceerd kunnen worden is ons inziens ook belangrijk om vroege interventies/therapieën op een juiste wijze te testen. Het voorwerk (ontwikkelen van transgene muismodellen) is complex, het uiteindelijke gebruik als model is relatief simpel en makkelijk reproduceerbaar dus robuust.

Het daarbij komende ongerief voor de dieren is ons inziens licht tot matig. Het gebruik van [5.1 lid1c](#)

[Redacted text]

Uiteraard om voor het dier geen onnodig ongerief te veroorzaken maar ook in het belang van het langlopende experiment (maximaal 20 weken behandeling, gevolgd door een onbepaalde tijd tot het optreden van de verwachte huidlymfomen). We zullen de behandeling aanpassen/staken als er [5.1 lid1c](#)

[Redacted text]

Een nadeel van het PDX model t.o.v. de gecontroleerde, geïnduceerde huidlymfoma's in GEMM's is dat het PDX model patiënt afhankelijk is (genetische veranderingen in de tumorcellen zijn op het moment van transplantatie niet bekend). Bovendien zijn de PDX modellen die we voorstellen meer representatief voor de late (tumor) fase van het huidlymfoom, niet voor de vroege fase.

Tot slot, we kennen nu de vermoedelijke genetische afwijkingen van zeer zeldzame maar uiterst agressieve huidlymfomen [5.1 lid2h](#)

Deze informatie willen we gebruiken om GEMM's voor agressieve huidlymfomen te ontwikkelen. Patiënten met dit specifieke type huidlymfoom worden zelden gezien in onze kliniek (gemiddeld eens in de 4 jaar) waarmee een PDX model geen optie is.



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 93118
2509 AC Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl

Datum 20 augustus 2021
Betreft Aanvullende adviesnota AVD20209584

Titel project: Mouse models of cutaneous lymphomas; from pathogenesis to therapeutic intervention.

Proces

In de CCD vergadering van 18 juni 2021 is deze aanvraag besproken (zie map 'originele aanvraag'). Tijdens de vergadering is besloten een voorgenomen besluit tot afwijzen te doen voor een deel van de aanvraag. Het deel dat zou worden afgewezen betreft de zeer zeldzame maar uiterst agressieve huidlymfoom 'de vierde variant'. Van deze variant ontbreekt een aantal punten om de schade-batenanalyse te maken (zie afwijsggrond). Hiermee zou het bestuur meegaan met de reactie van het 7^{de} DEC lid dat een minderheidsstandpunt innam.

In het DEC advies werd een minderheidsstandpunt ingenomen door één DEC-lid. Dit DEC-lid motiveerde dat onduidelijk blijft hoe zeldzaam de cutane huidlymfomen zijn, waarvan een 'vierde variant' extreem zeldzaam is. Dit leidt voor dit DEC-lid tot een negatieve schade-baten afweging voor de gehele aanvraag.

Tijdens de bespreking van dit dossier in de CCD vergadering is de voorgenomen afwijzing voor 'de vierde variant' gebaseerd op het minderheidsstandpunt van dit DEC-lid. De CCD heeft op basis hiervan besloten de experimenten met 'de vierde variant' niet te vergunnen.

Tijdens het uitwerken van de voorgenomen afwijzing bleek dat het niet helder was wat 'de vierde variant' was. Om deze reden heeft het Secretariaat de DEC gevraagd naar welke variant het 7^{de} DEC-lid verwees in het minderheidsstandpunt.

Onduidelijkheden

Voor de zeer zeldzame maar uiterst agressieve huidlymfoom waren voor de CCD nog de volgende onduidelijkheden:

- Het is niet helder onderbouwd wat de maatschappelijke en wetenschappelijke relevantie is van de geteste variant.
- Het is onvoldoende duidelijk hoe het ongerief van de dieren opweegt tegen de voordelen die het kan opleveren voor de mens.
- Het is onduidelijk hoe het onderzoek zich internationaal verhoudt tot andere onderzoeken naar deze aandoening.
- Het is niet helder hoe de synthesis of evidence is toegepast voor dit onderzoek.

Reactie aanvrager op gestelde vragen

Aan de aanvrager waren voor de vergadering van 18 juni al vragen gesteld, waarvan de antwoorden niet tijdig waren ontvangen voor bespreking in de vergadering (zie map AVD20209584g_reactie aanvrager).

De vraag die gesteld is aan de aanvrager is: Het is onduidelijk hoe zeldzaam de varianten zijn die nu onderzocht worden. Kunt u de incidentie, mortaliteit en overlevingskansen van deze varianten in uw aanvraag benoemen?

Citaat antwoord aanvrager: "de meest voorkomende vorm heeft een incidentie van 1:100.000 en een 5-jaars overleving van 80%. De huidlymfomen van patiënten met een slecht beloop (patiënten die progressie van de ziekte vertoonden en uiteindelijk zijn overleden) zijn door ons genetisch gekarakteriseerd. Daarnaast zijn meerdere agressieve vormen van huidlymfomen door ons genetisch in detail onderzocht. Twee worden in de aanvraag genoemd, beiden hebben een incidentie van ongeveer 1 op 1 miljoen en een 5-jaars overleving van 20 % (voor AECyTCL, ook agressief CD8+ CTCL genoemd) en -25% (Sezary syndrome)."

Reactie DEC op de gestelde vraag

De volgende vraag is gesteld aan de DEC naar aanleiding van het besluit van de CCD in de vergadering van 18 juni: In de motivatie van het DEC lid dat tot een negatief advies komt staat het volgende: "In de projectaanvraag komt naar voren dat men zeldzame vormen van cutane lymfomen wil onderzoeken, maar het blijft onduidelijk hoe zeldzaam deze cutane lymfomen precies zijn. In antwoord op onze vragen is wel genoemd dat één van de vier varianten die men wil onderzoeken gemiddeld eenmaal per vier jaar in de Nederlandse kliniek wordt gezien." Kunt u de CCD vertellen welke variant dit betrof. Na vragen aan de aanvrager blijft het voor de CCD onduidelijk over welke variant het 7^e DEC lid spreekt.

Citaat antwoord DEC: "In de motivatie van het DEC lid (dat negatief advies heeft uitgebracht) is niet vermeld dat de incidentie van primaire huidlymfomen, volgens het projectvoorstel, in Nederland ca. 160 per jaar is en dat komt overeen met ca. 1 op de 100.000. Daarmee voldoet het volgens informatie van de Rijksoverheid aan de definitie van een zeldzame aandoening.

Binnen deze groep (familie) van primaire huidlymfomen komt een zeer zeldzame vorm voor die beschreven staat in de laatste alinea van het antwoord op een vraag van de DEC*.

Samenvattend in Nederlands expertisecentrum van primaire huid lymfomen 'ziet men' ongeveer 160 patiënten per jaar en de zeer zeldzame zeer agressieve vorm ziet men maar 1 keer in de vier jaar."

** "Tot slot, we kennen nu de vermoedelijke genetische afwijkingen van zeer zeldzame maar uiterst agressieve huidlymfomen (...). Deze informatie willen we gebruiken om GEMM's voor agressieve huidlymfomen te ontwikkelen. Patiënten met dit specifieke type huidlymfomen worden zelden gezien in onze kliniek (gemiddeld eens in de 4 jaar) waarmee een PDX model geen optie is."*

Samenvatting

Na nadere vragen aan de DEC en aan de aanvrager blijft het onduidelijk welke variant het meest zeldzaam zou zijn. Het staat echter wel vast dat alle te onderzoeken varianten zelden voorkomen. Met de aanvullende informatie van de aanvrager en de DEC is het nu wel helder wat de incidentie, mortaliteit en overlevingskansen zijn, en dus kan een ethische afweging gemaakt worden.

Voorstel Secretariaat

Het is niet duidelijk geworden welke de uiterst en zeer zeldzame variant is waarvan de CCD besloten had deze niet te vergunnen, dus het eerder genomen besluit door de CCD kan niet worden uitgevoerd. De vier geteste modellen bevatten allemaal varianten die zeldzaam zijn. Het is daarom niet mogelijk om een 'vierde variant' uit de aanvraag los te maken. In de voorgaande CCD vergadering is besloten wel onderzoek naar een aantal varianten te vergunnen. Daarnaast is door de aanvrager aangegeven dat voor de meest zeldzame varianten alleen de experimenten in bijlage 1 kunnen worden uitgevoerd, en het PDX-model voor deze variant(en) niet mogelijk is. Voor de meer zeldzame varianten zullen dus ook minder dierproeven worden uitgevoerd.

Om bovenstaande redenen stelt het Secretariaat voor om de aanvraag niet deels voorgenomen af te wijzen, maar om de aanvraag in zijn geheel toe te wijzen.

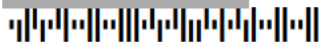


> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

5.1 lid2h

5.1 lid2e

5.1 lid2h



Centrale Commissie

Dierproeven

Postbus 93118

2509 AC Den Haag

centralecommissiedierproeven.nl

0800 7890789

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD 5.1 lid2h 20209584

Bijlagen

3

Datum 23 augustus 2021

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 5.1 lid2e

Op 20 maart 2020 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Mouse models of cutaneous lymphomas; from pathogenesis to therapeutic intervention" met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 20209584. 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 23 augustus 2021 tot en met 26 april 2025.

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

Procedure

Advies dierexperimentencommissie

Wij hebben advies gevraagd bij de 5.1 lid2h (hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 27 mei 2021. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

Nadere vragen aanvrager

Op 9 juni 2021 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft tijdig antwoord gegeven. Het verzoek om aanvullingen had betrekking op het totaal aantal proefdieren en het cumulatief ongerief te berekenen, het toelichten van modellen, en de Niet Technische Samenvatting aan te passen op inconsistenties en terminologie te vereenvoudigen. Uw reactie is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

Datum:

23 augustus 2021

Aanvraagnummer:

AVD 5:1 lid2n 20209584

Overwegingen

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

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, stuur een e-mail naar info@zbo-ccd.nl of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Datum:

23 augustus 2021

Aanvraagnummer:AVD **5.1 lid2h** 20209584

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

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 23 augustus 2021 tot en met 26 april 2025, voor het project "Mouse models of cutaneous lymphomas; from pathogenesis to therapeutic intervention" met aanvraagnummer AVD^{5.1 lid2h}20209584, na advies van ^{5.1 lid2h}. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is ^{5.1 lid2h}. Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 20 maart 2020
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 18 juni 2021;
 - b Bijlagen dierproeven
 - 3.4.4.1 Testing of GEMMs: Induction, progression and targeted treatment of skin lymphomas, zoals ontvangen op 18 juni 2021;
 - 3.4.4.2 Patient Derived Xenograft (PDX) models, zoals ontvangen op 18 juni 2021;
 - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 18 juni 2021;
 - d Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 27 mei 2021
 - e De aanvullingen op uw aanvraag, zoals ontvangen op 18 juni 2021.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief
3.4.4.1 Testing of GEMMs: Induction, progression and targeted treatment of skin lymphomas			
	Muizen (Mus musculus)	2.444	65,0% Matig 35,0% Licht
3.4.4.2 Patient Derived Xenograft (PDX) models			
	Muizen (Mus musculus) / immunodeficient mice (NSG)	1.720	90,0% Matig 10,0% Licht

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

Aanvraagnummer: AVD^{5.1 lid2h} 20209584

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^{5.1 lid2n} 20209584

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 lid2f 20209584

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.

Van: info@zbo-ccd.nl
Verzonden: dinsdag 24 augustus 2021 13:05
Aan: 5.1 lid2h
Onderwerp: Terugkoppeling over projectvergunningaanvraag AVD 5.1 lid2h 20209584

Geachte 5.1 lid2h ,

Op 20-03-2020 hebben wij een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het gaat om het project 'Mouse models of cutaneous lymphomas; from pathogenesis to therapeutic intervention' met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 20209584.

De CCD heeft de aanvrager aanvullende vragen gesteld. De aanvullingen hadden betrekking op het totaal aantal proefdieren en het cumulatief ongerief te berekenen, het toelichten van modellen, en de Niet Technische Samenvatting aan te passen op inconsistenties en terminologie te vereenvoudigen.

De CCD heeft besloten de vergunning toe te wijzen. De aanvrager en verantwoordelijk onderzoeker zijn hierover ingelicht. De beschikking is verstuurd op 23-8-2021.

Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld. Bij de beantwoording van de beoordelingsvragen verstrekt u over het algemeen een heldere onderbouwing. U geeft in het advies op heldere wijze de discussies weer die in de DEC hebben plaatsgevonden. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen. De CCD waardeert het zeer dat u helder en navolgbaar in uw advies laat zien hoe het advies met een meerderheidsstandpunt tot stand is gekomen, en wat daarbij de afwegingen waren. De CCD kon goed volgen hoe de discussie is verlopen.

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

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

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl