

Inventaris Wob-verzoek W15-11									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTS 2015146								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Niet-technische samenvatting	x							
3	Projectvoorstel				x		x	x	
4	Bijlagen beschrijving dierproeven				x		x	x	
5	DEC-advies				x		x	x	
6	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
7	Vervolgbrief				x		x	x	
8	Factuurinformatie				x		x	x	
9	Brief aanhouden registreren				x		x	x	
10	Brief aanhouden beoordelen				x		x	x	
11	Mail vragen 1-7-2015				x		x	x	
12	Mail aantallen 3-7-2015				x		x	x	
13	Mail DEC-advies				x		x	x	
14	Beschikking en vergunning				x		x	x	
15	Advies CCD		x						x



Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 10300 <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	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]
		KvK-nummer	4 1 0 5 5 6 2 9
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	Geert Grooteplein 10
		Postbus	9101
		Postcode en plaats	6500HB Nijmegen
		IBAN	NL90ABNA0231209983
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	UMC St Radboud
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED] <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	[REDACTED]
		Afdeling	[REDACTED]
		Telefoonnummer	[REDACTED]
		E-mailadres	[REDACTED]
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 Dhr. Mw.
- Functie
- Afdeling
- Telefoonnummer
- E-mailadres
- 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 15 . 07 . 2015
- Einddatum 15 . 07 . 2020
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Modeling childhood leukemia to improve therapy outcome in patients
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Onderzoek naar het ontstaan en een betere behandeling van kinderleukemie
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC RU DEC
- Postadres Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen
- E-mailadres

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 741,00 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
- DEC-advies, factuurinformatie

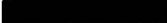
6 Ondertekening


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

Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondergetekende verklaart:

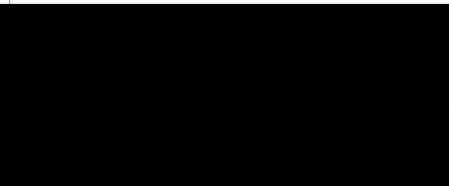
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
- dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan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

Naam 

Functie 

Plaats Nijmegen

Datum 15 - 06 - 2015

Handtekening 



**Form
Project proposal**

- This form should be used to write the project proposal of 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.zbo-ccd.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'. | 10300 |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment. | Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen |
| 1.3 | Provide the title of the project. | Modeling childhood leukemia to improve therapy outcome in patients |

2 Categories

- | | | |
|-----|---|---|
| 2.1 | Please tick each of the following boxes that applies to your project. | <input checked="" type="checkbox"/> Basic Research |
| | | <input checked="" type="checkbox"/> Translational or applied research |
| | | <input type="checkbox"/> Regulatory use of routine production |
| | | <input type="checkbox"/> Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare dier |
| | | <input type="checkbox"/> Research aimed at preserving the species subjected to procedures |
| | | <input type="checkbox"/> 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.
-

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common form of pediatric malignancies (1). Despite the fact that with current treatment protocols approximately 85% of all cases can be cured, a sustainable fraction of patients still relapses and succumbs to the disease (2). In addition, survivors of childhood cancer face severe treatment related morbidities, including cardiotoxicity and secondary malignancies (1,2). Together, this calls for improvement of current therapy schemes in order to improve survival while reducing toxicity. A currently implicated method of refinement is risk adjusted therapy. Children with ALL are stratified into risk groups based on diagnostic features (i.e. age and cytogenetics) as well as initial response to therapy (2). Furthermore, the characterization of the tumor genome has allowed the identification of genetic lesions that are predictive of outcome (3-5). Based on this profile, children with a predicted low risk of relapse are treated with a reduced intensity scheme while children suffering from a tumor with a high risk profile are treated with an high intensity scheme, that may include bone marrow transplantation, a treatment associated with high treatment related mortality.

Despite our increasing understanding of tumor genetics and its implications for risk prediction, with the exception of a few markers (like BCR-ABL1), current therapy protocols are not tailored based on the individual tumor properties (6,7). This is largely because it is currently unknown how mutations in the affected genes contribute to tumor development and in selected cases promote relapse formation. This will be addressed in our studies.

In a close collaboration between [REDACTED], [REDACTED], [REDACTED] and [REDACTED], we have studied tumor cell genetics and identified several genes that are predictive of poor outcome. For example, we and others have identified genetic defects and mutations in the tumor suppressor gene *IKZF1* as a very strong predictor of relapse in children with B cell precursor ALL (BCP-ALL) (8, 9). In addition, the analysis of a large set of patients has allowed the identification of genetic interactions that may contribute to tumor development and/or therapy failure. For example, co-occurrence of *BTG1* deletions (10) within specific subgroups (for example: characterized by an *IKZF1* deletion or defined by a BCR-ABL1-like expression profile) predicts an inferior survival outcome (6,11). We aim to acquire in-depth understanding on how these genetic lesions affect cell behavior and contribute to leukemogenesis and/or the development of therapy resistance, an essential property of relapse prone tumors. Although the biochemical characterization, combined with the modeling of these mutations in mutations in cell lines has aided in our understanding of leukemic cell biology, animal experiments are required to complement these studies due to technical and biological limitations of the in vitro work. For example, the genetic composition of currently available cell lines limits the use for studies on genetic interactions. In addition, the culture of mammalian hematopoietic cells, in particular leukemic cells remain challenging and is only feasible for a highly selected subset (tumor) cells. Furthermore, processes like clonal evolution and selection of relapse-prone tumor cells can only be addressed by in vivo studies.

Literature:

- (1) Inaba,H et al. Acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet*, 2013;381(9881): 1943-55.
- (2) Ching-Hon Pui et al. Pediatric acute lymphoblastic leukemia: Where are we going and how to we get there? *Blood* 2012;120:1165-1174.
- (3) Van Vlierberghe P, Ferrando A. The molecular basis of T cell acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest* 2012;122(10):3398-406.
- (4) Mullighan CG. Genomic characterization of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol* 2013;50(4):314-24.
- (5) Hogan LE, Meyer JA, Yang J, *et al.* Integrated genomic analysis of relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia reveals therapeutic strategies. *Blood* 2011;118(19):5218-26.
- (6) Roberts KG, Li Y, Payne-Turner D, *et al.* Targetable kinase-activating lesions in Ph-like acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2014;371(11):1005-15.

- (7) Pui CH et al. Biology, Risk stratification, and Therapy of Pediatric acute leukemias: An Update. JCO 2011,29 (5):551-565
- (8) Kuiper RP, Waanders E, van der Velden VH, et al. IKZF1 deletions predict relapse in uniformly treated pediatric precursor B-ALL. Leukemia 2010;24(7):1258-64.
- (9) Mullighan CG, Su X, Zhang J, et al. Deletion of IKZF1 and prognosis in acute lymphoblastic leukemia. N Engl J Med 2009;360(5):470-80.
- (10) van Galen JC, Kuiper RP, van Emst L, et al. BTG1 regulates glucocorticoid receptor autoinduction in acute lymphoblastic leukemia. Blood 2010;115(23):4810-9.
- (11) Tijchon E. et al. B-lineage transcription factors and cooperating gene lesions required for leukemia development. Leukemia 2013; 27(3) 541-52.

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?

We aim to obtain a detailed understanding of the genetic interactions between tumor suppressor genes and oncogenes and the molecular mechanisms by which our genes of interest contribute to the pathogenesis of childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL) as well as the outgrowth of drug-resistant clones in ALL. With this research project we would like to investigate a broader set of candidate genes that are implicated in pediatric ALL in a biological relevant model system to assess in which manner (combinations) of these genes contribute to leukemia outgrowth and chemotherapy resistance.

████████████████████ has elaborate experience with animal studies (18 approved DEC applications in the past 5 years) and has the appropriate infrastructure of experienced technicians, PhD students, postdocs and project leaders within the field of cancer biology to conduct the proposed research project. This project is part of an ongoing research effort aimed at investigating the molecular basis of pediatric leukemia and therapy resistance. Our previous studies have identified new genetic interactions between tumor suppressor genes that will have a significant impact in the field of leukemia biology, where we identified that Btg1

loss in combination with haploinsufficiency of *Ikzf1* leads to accelerated onset of leukemia in mice and promotes therapy resistance. We would like to further validate these findings using humanized mouse models, xenotransplantations and extend these studies to other candidate genes.

3.3 Relevance

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

Deeper understanding of genetic mutations that contribute to leukemia and therapy resistance will provide us a rationale for (i) a better identification of patients at risk of developing therapy resistance and to offer these patients tailored chemotherapy strategies in ALL using currently available therapy schemes and (ii) characterization of candidate target molecules for specific therapies as alternative treatment modalities. For example, data from our lab indicate that deletions in the *IKZF1* gene confer resistance towards glucocorticoid-induced apoptosis in normal and leukemic B cells. As glucocorticoids are keystone drugs in the treatment of ALL, knowledge about the initial treatment response would be of great value. We also have first indications that other mutations could have a direct impact on chemotherapy sensitivity and identification of novel genetic markers would help to identify patients who need stronger treatment protocols. Next to this, deeper understanding of the genetic background would also help to identify patients who will be cured even with lower doses of chemotherapy. Despite the fact that approx. 85% of all patients are cured from leukemia, life-long side effects due to the chemotherapy treatment remain a serious problem. Therefore, identifying patients that can be cured with milder chemotherapy regimens is of utmost importance.

In addition to the translational aspect of this work, these studies will aid significantly to our understanding of (tumor) cell biology, which may be translated to other fields of research. For a long time, clinical risk stratification was mainly based on major chromosomal aberrations: However, with the rise of next-generation sequencing during the last decade, we are now able to identify single gene deletions which could play an important role in cancer development. Our finding will therefore not only have a major impact in the field of leukemia research (scientific relevance), but may also improve quality of life for the cancer patient (social relevance).

3.4 Research Strategy

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

The proposed animal experiments will complement our studies where in vitro work faces its limitations. In this project we have divided our procedures into two experimental groups:

-Xenotransplantations will be used to study the properties of human cells (both manipulated normal cells as well as tumor material) in vivo.

Transplantations of human cells with (combinations of) genetic lesions of interest into mice will help us to identify genetic lesion which confer engraftment (and thereby survival) advantage in an in vivo context. Next to this, primary ALL samples, which barely grow in an in vitro setting, can be expanded by xenotransplantation into immunodeficient mice. These xenotransplantations will be performed with immunodeficient mice. In established xenotransplant models chemotherapy responses will be determined to investigate the impact of certain genetic lesions on therapy resistance.

-Genetically modified mouse models will be used to study the effects of induced genetic lesions in a defined genetic background. In a primary leukemia, it is hard to study the effect of (combinations of) specific genes as the complex genetic background is often poorly understood, and could mask the contribution of candidate genes towards disease development and therapy resistance. To eliminate this genetic noise, induction of genetic lesions in a murine model is the best way to study genetic aberrations in a defined genetic setting. Interesting (combinations of) genetic lesions will be studied in knockout and transgenic mice based on several criteria: Novel findings in the scientific community, results of in vitro experiments and the outcome of the xenotransplantations. The mouse models are therefore also highly suitable to investigate the impact of therapy, and assess which genetic defects contribute to therapy resistance.

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.

To study the contribution of genetic lesions to leukemia development and chemotherapy resistance, we make use of several approaches:

1. Xenotransplantations of (1.1) primary human ALL patients samples (1.2) genetically modified human hematopoietic stem cells/progenitors cells and induced pluripotent stem (iPS) cells, or (1.3) genetically modified human cell lines into immunodeficient mice.

A major hurdle in studying primary human ALL samples is the inability to grow and expand these cells in vitro. The current golden standard are xenotransplantations of human ALL samples into immunodeficient mice.

1.1 Over the last years, our lab created an ALL patient sample collection/library consisting of cells derived from primary leukemia/lymphoma patients. These include combinations of diagnosis – relapse samples of the same patient. Analysis of the tumor genome, performed both for diagnostic as well as research purposes will provide us with the essential information about the genetic context. We will use serial xenotransplantations to expand the number of cells for ex vivo analysis. In addition, we will study the in vivo behavior of these cells, including drug resistance analysis and clonal evolution analysis.

1.2 To study the effect of commonly found leukemia-associated genetic defects, we will transduce human hematopoietic stem cells and progenitor cells (isolated from bone marrow and/or cord blood) or iPS cells differentiated towards the hematopoietic lineage with lenti- or retroviruses encoding over expression of our genes of interest. Alternatively, we will use CRISPR/Cas9 based knockout or shRNA mediated knockdown to reduce expression of genes of interest, either alone or in combination with over expression of genes of interest. The transduced cells will be transplanted into immunocompromised mice and analyzed. This analysis will include (competitive) repopulation capacity, oncogenic potential (tumor incidence and latency) and sensitivity towards chemotherapeutic intervention, both in vivo and ex vivo.

1.3 Because for some studies, the use of primary human cells (normal or leukemic) is limited by technical challenges, we will address some questions by using human leukemia or lymphoma cell lines. Similar to the approach as addressed above in 1.2, will mimic mutational events by retro or lentivirally induced expression or knockdown/knockout of relevant (combinations of) genes. Alternatively or in addition, we will introduce genome-scale CRISPR gain-of-function or loss-of-function libraries to identify genes that are essential for the oncogenic potential and/or drug sensitivity of these cells. We will transplant these manipulated cells and/or non-manipulated control cells into immunocompromised mice and study the relevant phenotype of these cells. This analysis will include but will not be limited to (competitive) repopulation capacity, oncogenic potential (tumor incidence and latency) and sensitivity towards chemotherapeutic intervention.

2. Genetic modeling of genetic aberrations relevant for leukemia/lymphoma development in a murine model

To study and define the genetic interactions of candidate genes during leukemia development and chemotherapy resistance in a genetically defined model, the use of knockout mouse models is of great value.

2.1 For example, the integration of tumor genetics with survival data showed that the co-occurrence of hemizygous loss of both IKZF1 and BTG1 results in a significantly worse relapse-free and overall survival. How these and other genetic interactions translate into a different behavior of tumor cells is currently unknown. We have previously shown that these genetic interactions can be faithfully recapitulated in a murine background. The advantage of this approach over the use of human cells as described above, is the limited influence of the genetic diversity that is found in human samples. We propose the following experiments to study the effect of genetic interactions: To study the effect of the introduction leukemia/lymphoma associated lesions in a defined genetic background, we will breed mice with a specific genetic alteration (including but not limited to disruption of the *Btg1* and *Ikzf1* genes or expression of transgenic oncogenes like BCR-ABL1 or c-Myc). We will analyze the contribution of a single gene defect as well as a combination of defects by intercrossing of these mice. We will study the effect of (the interaction of) these lesions by monitoring time to leukemia development and in vivo and ex vivo characterization of tumor tissue (using for example flow cytometry, immunohistochemistry, gene expression analysis, assaying the sensitivity towards chemotherapeutic intervention). In addition, we will study the contribution of the induced genetic lesions to normal hematopoietic development. We will assay this using relevant assays, including but not limited to ex vivo analysis of cell surface marker expression, colony forming capacity and gene expression. Furthermore, we will evaluate cell intrinsic effects of these genetic lesion(s) by transplanting these cells (both pre-leukemic and tumor cells) into syngenic mice without the genetic lesion(s). As described above, we will study the effect of (the interaction of) these lesions by monitoring time to leukemia development and in vivo and ex vivo characterization of tumor tissue (using for example flow cytometry, immunohistochemistry, gene expression analysis, assaying the sensitivity towards chemotherapeutic intervention).

2.2 To study the effects of modulation of gene expression on cells that have a genetic defect (as described in 2.1), we will introduce mutational events by retro- or lentiviral induced expression or knockdown/knockout of relevant (combinations of) genes in hematopoietic cells isolated from mice that exhibit a genetic defect. Alternatively or in addition, we will introduce genome-scale CRISPR gain-of-function or loss-of-function libraries ex vivo into cells isolated from mice to identify genes that are essential for the oncogenic potential and/or drug sensitivity of these cells. We will transplant these manipulated cells and/or non-manipulated control cells into CD45.1 mice (and study the relevant phenotype of these cells. This analysis will include but will not be limited to (competitive) repopulation capacity, oncogenic potential (tumor incidence and latency) and sensitivity towards chemotherapeutic

intervention. Alternatively, we will assay cell behavior in vivo using relevant assays, including but not limited to analysis of cell surface marker expression, colony forming capacity, gene expression, and sensitivity towards drug induced cell death. The amount of mouse models that will be used will be determined by our scientific interest and financial support. In the past five years our research has been supported by several grants of [REDACTED] and [REDACTED]. Our estimate is that at any given time during the project between 3 to 6 different genetic mouse models will be investigated by our research group and about 30-60 xenotransplants will be followed in time. On average we expect that about 20% of the animals may succumb to leukemia in the genetic mouse models and about 50% in the xenotransplants.

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

Each of the proposed experiments is designed to address specific parts of the research questions and will be complementary to the other in vivo and in vitro experiments.

We will use xenotransplantations to study the effect of specific leukemia-associated genes on tumor cell behavior and therapy responses. Particularly the studies on clonal evolution that address the process of selection of subclones that are present in the primary tumor during in vivo tumor growth as well as during chemotherapeutic intervention cannot be performed in vitro. This approach will both require as well as benefit from the presence of the genetically diverse tumor landscape, both within a single tumor as well as between different tumors.

Particularly, to study the effect of individual (combinations of) mutations requires the use of a defined genetic background, as is available in the murine models that are described in section 2 of the research outline. This allows the analysis of the impact of isolated mutations on hematopoiesis, tumor development and therapy resistance, without the complications of genetic diversity. Together, the proposed animal experiments, supported by the various in vitro experiments and genetic analyses, will yield a better understanding on how combinations of genetic mutations contribute to tumor cell development and therapy resistance. Since many molecular pathways can be modified by currently available clinical grade small molecule compounds, acquired insight in tumor cell behavior may be rapidly translated into new therapeutic strategies in the clinic.

The outcome of each of the two parts of the application (xenotransplantation and genetic modeling) will complement each other and together will have a significant impact on our knowledge of childhood leukemia and chemotherapy responses. Through

ongoing advances of knowledge in the field of childhood leukemia we will integrate these new findings with our obtained results to achieve our main objective.

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	Xenotransplantations
2	Genetic modelling

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.zbo-ccd.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'.	10300				
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen				
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	<table border="1"><thead><tr><th>Serial number</th><th>Type of animal procedure</th></tr></thead><tbody><tr><td>1</td><td>Xenotransplantations</td></tr></tbody></table>	Serial number	Type of animal procedure	1	Xenotransplantations
Serial number	Type of animal procedure					
1	Xenotransplantations					

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.

Based on our current research interest and ongoing developments in the leukemia field for the next 5 years, we will xenotransplant primary human hematopoietic and iPS cells, primary ALL samples or leukemia cell lines with relevant genetic profile(s) into immunodeficient mice. The primary outcome parameters will be: (i) engraftment of primary human cells after transplantation as assessed by blood sampling and flow cytometry (human cell surface marker) and post-mortem tissue analyses (in vitro studies); (ii) leukemia development as evidenced by signs of illness, e.g. hunched posture, difficulties breathing, lack of physical activity; (iii) therapy response as measured by blood sampling and post-mortem tissue analyses. These parameters will provide sufficient information to address the objectives of our studies using primary human cells.

To keep the amount of animals as low as possible, in certain cases a small pilot experiment will be performed to assess the optimal amount of cells required to be injected for that type of xenotransplantation experiment to achieve optimal engraftment and in vivo outgrowth. Optimized cell counts will then be used in subsequent experiments. Furthermore, if sufficient information is available, statistics will be performed to assess the minimum amount of animals required to achieve required results.

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

For the animal procedures the following approaches will be taken:

1.1 Primary ALL samples: These cells, routinely frozen and stored in liquid nitrogen, will be thawed and prepared for intrafemoral (IF) or intravenous (IV) injection into immunodeficient mice. The amount of cells to be injected will vary between 100- 10E6 cells, depending on the type of ALL sample. The leukemic cells will be allowed to engraft for up to a period of 30 weeks. During this time period, blood will be sampled once a month to follow up the engraftment and the mice will be monitored for disease 2-3 times per week (weight loss, respiratory issues, behavior, etc.). Subsequently, mice with clear signs of illness (leukemia) will be euthanized and engrafted tumor cells will be isolated for further molecular and functional studies.

1.2. Human hematopoietic stem cells and progenitor cells (isolated from bone marrow and/or cord blood) or iPS cells differentiated towards the hematopoietic lineage will be transduced with lenti- or retroviruses encoding/targeting our genes of interest

(overexpression or shRNA/gRNA for loss of function). Subsequently, after validation of efficient viral transduction in the specific target cells, mice will be injected with the transduced cells and monitored as described in 1.1.

1.3 Human ALL cell lines will be transduced similar to the transduction procedure in 1.2 and these manipulated cell lines will be injected into immunodeficient mice and monitored as described in 1.1 and 1.2.

These approaches are standard techniques in the field of leukemia research and should provide us with the required information to address the main objective of our project. Primary outcome parameters for most of these transplanted cells will be leukemia disease in the absence or presence of additional chemotherapy treatment. In all cases mice with obvious signs of leukemia will be euthanized and affected organs will be removed for further cell biological and genetic studies. In general, transplanted mice will be followed for maximal 12 month for potential engraftment/disease development. The time period of engraftment highly depends on the leukemic subtype which was injected and the combinations of oncogenic drivers/tumor suppressors. Therefore, these parameters define the engraftment potential of a sample and there will be cases in which the time to engraftment is shorter or longer.

Radiation:

Hematopoietic stem cells and progenitor cells (isolated from bone marrow and/or cord blood) need physical space to grow in the bone marrow niche of a mouse. Therefore, all transplantations of normal bone marrow cells that have been virally transduced into murine hosts makes irradiation necessary for the cells to grow out.

Immunodeficient mice will only be lethally irradiated in case of transplanting primary hematopoietic stem cells, but not with primary human leukemia cells.

This means that only mice in 1.2 will undergo a prior irradiation to allow the (genetically manipulated) human hematopoietic stem cells and progenitor cells (isolated from bone marrow and/or cord blood) or iPS cells to repopulate the bone marrow of irradiated mice.

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

Based on current experience with designing these studies, we provided a valid estimate of the number of animals needed over a time period of 5 years. For each individual experiment, provided there is sufficient information, we will perform a power calculation to assess the minimal amount of animals required to reach statistical significance. For this purpose, we consult with a biostatistician before conducting an experiment to ensure that we employ the appropriate calculation and include the correct amount of animals to achieve the desired result. We will consult published literature and experienced colleagues in the field for advice for those experiments where we cannot perform any statistical methods to assess the minimum amount of animals. For some

experiments, a pilot study will be performed to determine the optimal number of cells to engraft in a mouse and to get an overview about the general engraftment capacity of the human cells.

B. The animals

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

The golden standard for xenotransplantation of human cells are immunodeficient mice, which display efficient engraftment capacity of normal hematopoietic and leukemic cells. These immunodeficient mice, such as NOD-scid IL2Rgamma-Null (NSG) mice, will be obtained from breeding pairs at the [REDACTED] or external commercial providers. The estimated number of immunodeficient mice for the proposed experiments is 1000 animals for the total period of 5 years.

[REDACTED] is planning to generate a primary ALL patient library representing high-risk and relapsed leukemia samples using xenotransplantation. We will transplant 3 mice per ALL sample of interest and will re-transplant the obtained ALL xenograft samples in a secondary transplant series (3 mice per secondary transplantation) in order to fully characterize engraftment capacity of these cells. We expect to transplant 50 leukemias of interest in the upcoming 5 years, leading to a total of $50 \times 9 \text{ animals} = 450$ mice necessary for xenotransplantations of primary ALL samples (1.1). To study manipulated HSCs in 1.2 and their leukemic events after introduction of oncogenic drivers (For example, BCR-ABL1 in combination with loss of BTG1 function), we will need to engraft 10 mice per genetic combination to fully study their transforming capacity. In this setting, there will be 4 experimental groups (control, BTG1 loss, BCR-ABL1 expression and combined BCR-ABL1/BTG1) each with 10 mice. In total, we expect that we will investigate at least 10 genetic interactions, with an estimated total number of 400 mice.

In 1.3 established cell lines mimicking the contribution of oncogenic drivers in leukemia will be transplanted into mice. After elaborate validation of their growth capacity and chemotherapy responses in vitro, cells carrying interesting genetic combinations will be transplanted into mice and treated in some cases with chemotherapy. In this initial screening procedure we expect to transplant a total of 30 mice (3-5 animals per cell line/condition). Subsequently, for validation of specific targets, we expect that 20 mice will be required for this purpose.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Immunodeficient mice	[REDACTED] / Commercial suppliers	1000	2-10 months

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.

1. Replacement:

A major hurdle in studying primary human ALL samples is the poor capacity to grow and expand these cells in vitro. To date the golden standard is xenotransplantation of human ALL samples into immunodeficient mice. Also, to study the development of leukemia in a physiologically relevant model, mice are the organism of choice as (1) their bone marrow provides a niche for human cells to grow and (2) the leukemic metastasis patterns in mice are similar to that of humans. To study the contribution of genetic lesions to leukemia development and chemotherapy resistance, we also make use of in vitro experiments which help to lower the amount of mice necessary to answer the research questions. However, several aspects of the cancer biology cannot yet be studied in tissue culture and therefore, murine models are crucial to understanding the impact of genetic lesions of interest on disease development in a living organism.

2. Reduction:

The estimated number of animals is based on our current experience with designing these studies. We consult with a biostatistician prior to conducting a study to ensure that we are using a sufficient number of animals to achieve the desired result. Based on developments in the scientific field during the next 5 years, and our own experience from in vitro experiments in human leukemic cell lines, we will xenotransplant primary patient samples with relevant genetic profiles into immunodeficient mice. Given the complex requirements for growth of these primary human cells, we are dependent on the use of immunodeficient mice to investigate the properties of these cells with respect to leukemia outgrowth and therapy resistance. For each specific genetic lesion, we will initially determine the lowest amount of cells capable of inducing leukemia formation in the wild-type (WT) control setting. Therefore, a pilot experiment will be performed with 4 mice injected with 100,000 cells. Given the strong penetrance of the leukemia phenotype under standard conditions (injection of 10E6 cells), 4 mice will be sufficient to assess time to leukemia. This experiment will provide insight into the amount of cells required to induce leukemia in the recipient mice using wild-type control cells from patients or control cell lines.

3. Refinement

Immunodeficient mice will be kept in a protected environment to reduce the risk of infection. They will be housed with appropriate litter, nesting material and nest boxes. Xenotransplantation and radiation treatments will cause some adverse effects. If animals get infections or become seriously ill, they will be euthanized. Mice will be monitored for signs of disease on a daily base by animal caretakers trained to recognize animal discomfort. In addition, as leukemia can be detected in the blood of a living animal by controlling blood samples for increased numbers of circulating tumor cells, prior to onset of clinical signs. Therefore, blood will be taken from mice 1-2 times a month to screen for early disease onset of leukemia.

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

Mice will be monitored for the first signs of leukemia on a daily base (weight loss, respiratory issues, behavior, etc.). Furthermore, mice will be housed under sterile conditions and will be monitored by trained facility members. Also, mice will preferentially be housed together with litter mates or at least other mice. Also, housing conditions provide nesting possibilities for the mice in the cage. As soon as any signs of disease or discomfort are detected (humane endpoints), mice will be euthanized to prevent more discomfort. In general for leukemia this will be within 1 week after the mice show detectable weight loss.

To prevent any effects on the environment, all cells used in the xenotransplantations are cultured and prepared under ML-II conditions, and the animals are housed in DM-II facilities.

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.

Not applicable

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.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Immunodeficient mice are prone to infections. In the experimental group, side effects of radiation or the injection procedure could lead to same discomfort. Xenotransplantation and subsequent engraftment of human leukemic cells leads to development of leukemia and secondary disease in the mice due to metastasis. Transport from the breeding facility to animal laboratory could lead to mild stress for the animals. We will try to avoid single housing of mice, which could also lead to mild stress.

In general, signs of discomfort include continued body weight loss, dehydration, anorexia, hypothermia and lethargy. Others indicators of discomfort in the animals are piloerection or hunched postures.

Explain why these effects may emerge.

Mice that are used for xenotransplantations are immunodeficient and therefore more susceptible to infections due to lack of immune cells. Injection of leukemic cells will lead to leukemic infiltration into organs, and the optional treatment with chemotherapeutic drugs may cause side effects.

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

Mice will be anesthetized during intrafemoral injections by isoflurane inhalation to prevent discomfort.

██████████ at ████████ under sterile conditions using the NSG protocol and daily monitoring of the mice by trained ████████ and ████████ personnel.

Next to this, leukemias can be detected in the living animal by examining blood samples for the presence of circulating cancer cells or changes in the cellular constituents of the blood. Increases in circulating tumor cells or changes in blood constituents can forecast the onset of clinical symptoms

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.

Our primary criterium is the development of signs of leukemia, defined by weight loss, respiratory problems, behavioral changes, changes in posture or fur or a bloated belly.

For the mice which do not show any signs of leukemia at the end of the monitoring period of 52 weeks, all mice of the experimental group will be sacrificed.

Next to this, diseases which are not related to the experimental procedure (Infection, disease to to inbred) are considered and are defined as human endpoints. In general, as soon as mice present with signs of discomfort that are considered to reach general humane endpoints, mice will be sacrificed.

In general, all mice will be euthanized when reaching scientific endpoints and/or humane endpoints.

Indicate the likely incidence.

Potentially, we expect the mice to show signs of leukemia after xenotransplantation. The frequency of leukemia (engraftment of human cells in the mouse) strongly depends on the aggressiveness of the tumor cells, which is defined by the genetic composition of the (combinations of) genetic lesions in the cells.

On average we expect that about 50% of the animals may develop leukemia in the xenotransplants.

K. Classification of severity of procedures

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

The injection of leukemic cells is considered to be a procedure of mild discomfort. In total, the development of leukemia (expected in 50% of the animals), Irradiation and the possible side effects of chemotherapy will lead to moderate discomfort.

For the xenotransplantation,

Group 1.1: No irradiation, 50% of 450 animals will develop leukemia= 225

Group 1.2: Irradiation= 400

Group 1.3 No irradiation, 50% of animals will develop leukemia= 50

Total amount of animals that will experience moderate discomfort: $675/1000 = 68\%$ (32% mild discomfort)

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

Hematopoietic cells (normal and leukemic) need to be isolated from lymphoid organs, like bone marrow and spleen. Therefore, euthanasia is inevitable.

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.zbo-ccd.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'.	10300				
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen				
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	<table border="1"><thead><tr><th>Serial number</th><th>Type of animal procedure</th></tr></thead><tbody><tr><td>2</td><td>Genetic modelling</td></tr></tbody></table>	Serial number	Type of animal procedure	2	Genetic modelling
Serial number	Type of animal procedure					
2	Genetic modelling					

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.

Based on our current research interest and ongoing developments in the leukemia field for the next 5 years, we will model interesting (combinations of) genetic lesions in a murine model system.

The primary outcome parameters will be: (i) leukemia development as evidenced by signs of illness, e.g. hunched posture, difficulties breathing, lack of physical activity; (ii) therapy response as measured by blood sampling and post-mortem tissue analyses. These parameters will provide sufficient information to address the objectives of our studies to understand the impact of (combinations of) genetic lesions on leukemia development and chemotherapy resistance.

To keep the amount of animals as low as possible, for every transgene mouse model, a small pilot experiment will be performed to assess the frequency and timepoint of leukemia onset and potential unexpected side effects of the genetic alterations. Furthermore, if sufficient information is available statistics will be performed to assess the minimum amount of animals required to achieve required results.

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

For this part of the proposal, the following procedures will be performed:

1.1 We will breed mice with a specific genetic alteration (including but not limited to Btg1KO and Ikzf1Neo mice or expression of transgenic oncogenes like BCR-ABL1 or c-Myc). We will analyze the contribution of a single gene defect as well as a combination of defects by intercrossing of these mice. We will study the effect of (the interaction of) these lesions by monitoring time to leukemia development and in vivo and ex vivo characterization of tumor tissue (using for example flow cytometry, immunohistochemistry, gene expression analysis, assaying the sensitivity towards chemotherapeutic intervention). In addition, we will study the contribution of the induced genetic lesions to normal hematopoietic development.

Mice from breedings with relevant genotypes at the age between 2-12 months will be euthanized by CO2 inhalation or cervical dislocation. Subsequently, lymphoid organs will be isolated and functionally analyzed in the laboratory for immunophenotype, chemotherapy responses, gene expression profiles and leukemic infiltration.

1.2 Murine hematopoietic progenitor cells isolated from WT mice or knockout mice will be harvested at the age of 2-4 month from euthanized mice (CO2 gas chamber or cervical dislocation). These cells will be transduced ex vivo with retro- or lentiviruses expressing genetic constructs of interest. Subsequently, after validation of viral transduction in the chosen cells, CD45.1 mice (B6.SJL-PtprcaPepcb/BoyCrl) will be injected intravenously with the transduced cells. Cells will be allowed to engraft for a period 20 weeks. During this time period, mice will be monitored for disease 2-3 times per week (weight loss, respiratory issues, behavior, etc.). Subsequently, mice will be euthanized and engrafted tumor cells will be isolated for further molecular and functional studies.

2. In vivo drug screening: Mice that develop spontaneous leukemia will be treated with chemotherapy. Chemotherapy will be injected at the appropriate site (eg. intravenous, intraperitoneal) and the intervals of induction treatment are depending on the chosen treatment. After a defined period, mice will be sacrificed and the total fraction of leukemic cells will be compared between control and treated animals.

These approaches are standard techniques in the field of leukemia research and should provide us with the required information to address the main objective of our project. Primary outcome parameters for most of these transgenic mice will be leukemia disease in the absence or presence of additional chemotherapy treatment. In all cases mice with obvious signs of leukemia will be euthanized and affected organs will be removed for further cell biological and genetic studies.

Radiation:

Hematopoietic stem cells and progenitor cells (isolated from bone marrow and/or cord blood) need physical space to grow in the bone marrow niche of a mouse. Therefore, all transplantations of normal bone marrow cells that have been virally transduced into murine hosts makes irradiation necessary for the cells to grow out.

In syngeneic settings, (mouse cells transplanted to mouse host) mice will be irradiated with a lethal dose to allow engraftment of primary hematopoietic progenitor cells mentioned in 1.2.

This means that only mice in 1.2 will undergo a prior irradiation to allow the engraftment of murine hematopoietic stem cells and progenitor cells (isolated from bone marrow) to repopulate the bone marrow of irradiated CD45.1 mice (B6.SJL-PtprcaPepcb/BoyCrl)

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

Based on current experience with designing these types of studies, we estimated the number of animals needed over a time period of 5 years . We will consult with a biostatistician before conducting each study to ensure that we are using the minimum number of animals to achieve the desired result. A power calculation will be performed for every genetically modified mouse model to predict how many mice are necessary to answer the reserach question. Additionally, a pilot studie will be performed for every new genetic background of a mouse model to evaluate their capacity for disease development and potential discomfort.

B. The animals

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

Mice are the organism of choice when studying leukemia development in a complex living being. Another advantage of using mouse models over human primary cells is the limited influence of the genetic diversity that is found in human samples. The age of 2-12 month is choosen as leukemia development at this early stage can be correlated with the genetic modification of the mice, whereas leukemia development at a later age could be due to unrelated age-related effects. Genetically modified mice, such as Btg1 knockout and Ikzf1 knockout mice, will be obtained from breeding pairs at the [REDACTED] or external collaborators or commercial providers. The estimated number of mice for the proposed experiments are 3000 animals for a total period of 5 years based on elaborate experience with animal studies (18 approved DEC applications) in our lab.

We expect to use 1000 mice for the maintenance of existing leukemia-prone genetic models and creation of novel mouse models (Interbreeding and retroviral/lentiviral transduction). The combinations of several genetic models need a elaborate breeding scheme including backcrosses to maintain genetic stability in tumor prone breedings.

Currently, we have 6 different genetic backgrounds (For example, Btg1^{-/-} , Btg1^{-/-} , Ikzf1^{+/-} knockouts and combinations of them), which we aim to study further for leukemia development and functional characterization of leukemic cells in vivo and in vitro.

These genetic compound mice will be maintained over the next 5 years with at least three to five additional knockout strains, also in combination with different oncogenes using viral transductions.

For the ex vivo characterization of lymphocytes isolated from wild-type (control) mice and genetically modified mice, we expect to use at least 80 mice (for both developmental phenotypes and chemotherapy screenings) for each genotype. We are aiming to screen isolated lymphocytes for their immunological phenotype (Colony Assays, Flow Cytometry, etc..) and their response towards chemotherapeutic agents commonly used in ALL treatment such as prednisolone, dexamethasone (both glucocorticoids, key stone drugs in ALL treatment) and asparaginase (amino acid depleting agent). For example, to study the genetic interaction between two oncogenic mutants such as BTG1 and IKZF1 knockout animals, we will have 4 different genotypes in one experimental setting (Control, Btg1-/-, Ikzf1+/- and compound Btg1-/-; Ikzf1+/- mice) which leads to 320 animals (4x80). To study a broad range of interactions (we expect to study 7 different interactions) we expect to need 320x6= 1920 mice over a time period of 5 years. All together, we expect to use 2000 mice for this type of experiments in the upcoming 5 years.

Based on the outcomes of the in vitro chemotherapy treatment of isolated cells, we are also planning to perform in vivo chemotherapy treatment on relevant genetically modified mice. The decision which treatment the mice will undergo is based on the observed phenotypes from our in vitro screening. For each chemotherapeutic drug, we want to study the early and late response of the mice towards the specific chemotherapy. For these types of experiments, we plan to use 20 mice for each experimental group. In total, this leads to an estimated number of 1000 mice for the in vivo chemotherapy experiments over a time period of 5 years.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Mice	Breeding facility [redacted] / commercial suppliers/outside scientific collaborators	4000	2-12 month

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.

1. Replacement:

To study genetic interactions between genes of interest, it is necessary to make use of a genetically defined mouse model. The advantage of this approach over the use of human cells is the limited influence of the genetic diversity that is found in human samples. To study the contribution of defined genetic lesions to leukemia development and chemotherapy resistance, we also make use of in vitro experiments which help to lower the amount of mice necessary to answer the research questions. However, several aspects of cancer biology cannot be studied in a petridish and therefore, a murine model is crucial to understanding the impact of genetic lesions on disease development.

2.Reduction:

The estimated number of animals is based on our current experience with designing these types of studies. A power calculation will be performed for each transgenic breeding to evaluate how many mice are minimally required to study leukemia development in order to obtain a statistically relevant result. In addition, we consult with a biostatistician before conducting a study to ensure that we are using the correct amount of animals to achieve the desired results.

3. Refinement:

Immune-deficient mice will be kept in a protected environment to reduce the risk of infection. They will be housed with appropriate litter, nesting material and nest boxes. Chemotherapy and radiation treatments may cause some adverse effects. Doses are calculated to minimize side effects within the scientific objectives. If animals get infections or become seriously ill they will be euthanized. Mice will be monitored for signs of disease on a daily basis by facility members trained to recognize animal discomfort.

Next to this, as leukemia can be detected in the blood of a living animal by controlling blood samples for increased numbers of circulating tumor cells prior to the onset of any clinical signs. Therefore, blood will be taken from mice 1-2 times a month to screen for early signs of leukemia.

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

Mice will be monitored for signs of leukemia 2-3 times per week (weight loss, respiratory issues, behavior, etc.). Mice will be housed under sterile conditions and will be monitored by trained facility members. Also, mice will preferentially be housed together with litter mates or at least other mice. Also, housing conditions provide nesting possibilities for the mice in the cage. As soon as any signs of disease or discomfort are detected (humane endpoint), mice will be euthanized to prevent further discomfort. To prevent any effects on the environment, all cells used in the xenotransplantations are cultured and prepared under ML-II conditions, and the animals are housed in DM-II facilities.

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.

Not applicable

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?

F. Accommodation and care

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.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Intercrossed double or even triple transgenic mice potentially could show a higher frequency of leukemia development due to a synergistic interaction of the transgenes. (For example, intercrossing mice from a *Ikzf1*Neo background with the *Btg1*KO line will lead to an *Ikzf1*+/-; *Btg1*-/- mouse, which we observed to develop leukemia earlier than in the wild type control group).

In the experimental group, side effects of chemotherapy treatment could lead to discomfort. Also, transport from the breeding facility to animal laboratory could lead to mild stress for the animals. We are trying to avoid single housing of mice which could also lead to mild stress.

Similarly, side effects of radiation or the injection procedure could lead to discomfort. Xenotransplantation and subsequent engraftment of human leukemic cells leads to development of leukemia and secondary disease in the mice due to metastasis .

In general, signs of discomfort of the animals include continued body weight loss, dehydration, anorexia, hypothermia and lethargy. Others indicators for discomfort of the animals are piloerection or hunched postures.

Explain why these effects may emerge.

Knockout of genes with tumor suppressor function or expression of oncogenes could lead to a higher incidence of leukemia and more aggressive tumor infiltration. Also, optional chemotherapy could have side effects due to toxicity of the therapeutic agent. For the overall potential disease of animals, the inbreeding of mice to obtain genotypes of interest could lead to a higher incidence of disease and developmental problems in the mice.

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

Mice will be monitored on a daily base for signs of leukemia development or side effects of chemotherapy and will be euthanized before severe discomfort develops.

Next to this, leukemias can be detected in the living animal by examining blood samples for the presence of circulating cancer cells or changes in the cellular constituents of the blood. Increases in circulating tumor cells or changes in blood constituents can forecast the onset of clinical symptoms and therefore, blood samples will be taken from mice 1-2 times a month.

Mice are anesthetized during intrafemoral injections by isoflurane inhalation to prevent discomfort.

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.

Primary criterium is the development of signs of leukemia defined by weight loss, respiratory problems, behavioral changes, changes in posture or fur or a bloated belly.

For the mice that do not show any signs of leukemia at the end of the monitoring period of 52 weeks, all mice of the experimental group will be sacrificed.

Next to this, diseases which are not related to the experimental procedure (Infection, disease to to inbreed) are considered and are defined as human endpoints. In general, as soon as mice are observed to show signs of discomfort which are considered to reach general humane endpoints, mice will be sacrificed.

In general, all mice will be euthanized at signs of disease or discomfort (humane endpoint) or reaching scientific endpoint for healthy mice.

Indicate the likely incidence.

As mentioned before, mice with introduced genetic combinations have a higher chance of developing disease, especially when compound phenotypes are created, increasing the incidence and speed of onset of leukemia.

On average we expect that about 20% of the animals may succumb to leukemia in the genetic mouse models.

K. Classification of severity of procedures

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

The development of leukemia will lead to moderate discomfort. The frequency of leukemia development is different between genotypes as certain combinations of genetic alterations will lead to accelerated leukemia onset (For example, our lab observed Btg1-/-;lkzf1+/- mice to have an earlier leukemia onset than a wild-type control group). On average, we expect approximately 20% of the animals to develop a leukemia during the experiments.

For the genetic modelling,

Group 1.1: No irradiation, 20% of 1000 animals will develop leukemia = 200

Group 1.2: Irradiation = 1920

Group 2: No irradiation, 20% of 1000 animals will develop leukemia = 200

Total amount of animals that will experience moderate discomfort: 2320/4000 = 58% (42% mild discomfort)

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

Lymphocytes derived from bone marrow and other lymphoid organs need to be isolated, and therefore, euthanization is inevitable.

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

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer 2015-0050
2. Titel van het project: Modeling childhood leukemia to improve therapy outcome in patients.
3. Titel van de NTS: Onderzoek naar het ontstaan en een betere behandeling van kinderleukemie.
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
 - Naam DEC: RUDEC
 - Telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED] bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9.00 tot 15.00 uur
 - Mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject:
 - ontvangen door DEC: 27-03-2015
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken: 13-04-2015
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van 20-04-2015 tot 18-05-2015
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 18-05-2015
 - advies aan CCD: 15-06-2015
7. Eventueel horen van aanvrager
 - Datum
 - Plaats
 - Aantal aanwezige DEC-leden
 - Aanwezige (namens) aanvrager
 - Strekking van de vraag / vragen
 - Strekking van het (de) antwoord(en)
 - Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag
8. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum: 20-04-2015
 - Strekking van de vragen: De niet-technische samenvatting is te lang en bevat nog veel ingewikkelde termen. De onderzoekers worden verzocht de niet-technische samenvatting aan te passen conform de richtlijnen van de CCD. De onderbouwing van de aantallen dieren die de onderzoekers willen gebruiken ontbreekt. De onderzoekers worden verzocht dit toe te lichten met behulp van het voorgestelde experimentele design. Uit de gegeven toelichting op de 3V's blijkt dat een aantal dieren zal worden bestraald, maar dit ontbreekt in de beschrijving van de voorgestelde dierproef. De onderzoekers worden verzocht dit in overeenstemming met elkaar te brengen. Voorts worden de onderzoekers verzocht te verduidelijken op grond van welke toename van ongerief de dieren uit de proef genomen zullen worden, en met welke frequentie de dieren gecheckt zullen worden op toename van

ongerief. Andere vragen betreffen kleine, soms slechts tekstuele, wijzigingen of onduidelijkheden in de vergunningaanvraag.

- Datum antwoord: 18-05-2015
 - Strekking van de antwoorden: De niet-technische samenvatting is nu aangepast. De aantallen dieren zijn nu beter onderbouwd, en de bestraling is toegevoegd aan de beschrijving van de dierproef. De onderzoekers hebben duidelijker omschreven hoe vaak zij de dieren zullen checken en bij welke toename van ongerief de dieren zullen worden gedood.
 - De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.
9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC)
- Aard expertise
 - Deskundigheid expert
 - Datum verzoek
 - Strekking van het verzoek
 - Datum expert advies
 - Expert advies

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig.
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.

C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:
 - uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling, namelijk 'to obtain a detailed understanding of the genetic interactions between tumor suppressor genes and oncogenes and the molecular mechanisms by which our genes of interest contribute to the pathogenesis of childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL) as well as the outgrowth of drug-resistant clones in ALL'. Het wordt ingeschat als een substantieel belang. De te behalen onderzoeksresultaten zullen meer inzicht verschaffen in de manier waarop tumor suppressor genen en oncogenen bijdragen aan de groei van leukemische cellen en aan resistentie voor chemotherapie. Deze resultaten kunnen op termijn leiden tot de ontwikkeling van effectievere therapie op maat voor kinderen met leukemie, waardoor een hoger percentage kinderen zal genezen en zij bovendien op latere leeftijd minder last van bijwerkingen van deze behandeling zullen ondervinden.
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Deze groep heeft veel ervaring in dit onderzoeksveld en met de voorgestelde dierproeven. De gekozen aanpak leidt tot betrouwbare uitspraken over het effect van de expressie van tumor suppressor genen en oncogenen op de groei van leukemische cellen en op resistentie voor chemotherapie.
5. Er is geen sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden

of behandeling van de dieren.

6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het welzijn van de dieren wordt aangetast door angst, pijn, en stress als gevolg van de volgende handelingen en omstandigheden: transport van de dieren van de foklocatie naar het dierenlaboratorium, injecties intraveneus of intrafemoraal (onder verdoving) met humane tumorcellen; bestraling met een letale dosis straling waarna de dieren een transplantatie met humane hematopoietische stamcellen of leukemische cellen ontvangen, ontwikkeling van leukemie, en chemotherapie. De cumulatieve aantasting van het welzijn wordt geclassificeerd als matig voor de dieren die bestraald worden (45% van de dieren), chemotherapie ondergaan (5% van de dieren) of leukemie ontwikkelen (30% van de dieren) en licht voor de overige dieren (40% van de dieren).
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**. De doelstelling van het project kan niet gerealiseerd worden zonder proefdieren of door gebruik van minder complexe diersoorten. De leukemische cellen groeien niet of nauwelijks in weefselkweek, waardoor er muizen nodig zijn om voldoende tumorcellen te genereren voor het beschreven onderzoek.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd. De DEC is het eens met het beschreven onderzoeksmodel en de onderbouwing van het aantal benodigde dieren. De DEC is van oordeel dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 5000 muizen.
9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven. De experimentele handelingen bij de dieren zullen worden uitgevoerd door hierin getrainde onderzoekers, waardoor de stress voor de dieren zoveel mogelijk wordt beperkt. De dieren worden twee à drie maal per week gechecked op ziekteverschijnselen, en hun bloed wordt 1 à 2 maal per maand gecontroleerd op leukemische cellen. Op die manier kunnen zieke dieren in een vroeg stadium van leukemie op humane wijze gedood worden om onnodig lijden van de dieren te voorkomen. De DEC is ervan overtuigd dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.
Negatieve effecten op het milieu worden voorkomen door adequate huisvesting van de dieren en voorzorgsmaatregelen bij het hanteren van onderzoeksmateriaal.
10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project, zelfstandig leesbaar, beknopt en begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

Op basis van de onder C genoemde overwegingen komt de DEC tot de volgende ethische afweging. Bij de dierproeven wordt adequaat invulling gegeven aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en/of verfijning van dierproeven. Het ongerief voor 40% van de dieren is licht, en voor 60% van de dieren matig.

Tegenover de nadelige gevolgen voor de dieren staat dat met dit onderzoek belangrijke inzichten kunnen worden verkregen in de manier waarop tumor suppressor genen en oncogenen bijdragen aan de groei van leukemische cellen en aan resistentie voor chemotherapie. Het is aannemelijk dat dit inzicht kan bijdragen aan het ontwikkelen van effectievere therapie op maat voor kinderen met leukemie, waardoor een hoger percentage kinderen zal genezen en zij bovendien op latere leeftijd minder last van bijwerkingen van deze behandeling zullen ondervinden. De DEC acht het belang van

die doelstelling substantieel, de concrete doelstellingen zijn haalbaar en kunnen niet zonder dieren worden behaald. De beoogde kennisvermeerdering en mogelijke gezondheidswinst zijn voldoende groot dat naar het oordeel van de commissie de nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren, in de vorm van angst, pijn of stress, ethisch aanvaardbaar zijn.

E. Advies

1. Advies aan de CCD
 - De DEC adviseert de vergunning te verlenen
2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen

Postbus Postbus 9101
6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD103002015146

Bijlagen

2

Datum 17-06-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 15 juni 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD103002015146. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.zbo-ccd.nl. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10300
Naam instelling of organisatie: Radboud Universiteit Nijmegen
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 41055629
Postbus: Postbus 9101 [REDACTED]
Postcode en plaats: 6500 HC NIJMEGEN
IBAN: NL90ABNA0231209983
Tenaamstelling van het rekeningnummer: UMC St. Radboud

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

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

Gegevens gemachtigde

KvK-nummer: 41055629
BSN: [REDACTED]
Naam: [REDACTED]
Postbus: Postbus 9101
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN
Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Nee

Over uw aanvraag

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

Over uw project

Geplande startdatum: 15 juli 2015
Geplande einddatum: 15 juli 2020
Titel project: Modeling childhood leukemia to improve therapy outcome in patients
Titel niet-technische samenvatting: Onderzoek naar het ontstaan en een betere behandeling van kinderleukemie
Naam DEC: RU DEC
Postadres DEC: Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen [REDACTED]
E-mailadres DEC: [REDACTED]

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 741,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen:

- Projectvoorstel
- Beschrijving Dierproeven
- Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen:

- Melding Machtiging
- DEC-advies

Ondertekening

Naam:



Functie:



Plaats:

Nijmegen

Datum:

15 juni 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen

Postbus Postbus 9101
6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD103002015146

Bijlagen

2

Datum 17-06-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 17 juni 2015

Vervaldatum: 17 juli 2015

Factuurnummer: 201570146

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvegrunning dierproeven Betreft aanvraag AVD103002015146	€ 741,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL28RBOS 056.99.96.066 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen



Postbus Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD103002015146

Datum

Betreft Vervolg Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 

Op 15 juni 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project Modeling childhood leukemia to improve therapy outcome in patients met aanvraagnummer AVD103002015146. Uw aanvraag wordt in behandeling genomen. In deze brief leest u wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Wanneer een beslissing

Wij nemen uiterlijk 10 augustus 2015 een beslissing. Omdat een DEC-advies is meegestuurd met de aanvraag, streven wij ernaar om de aanvraag binnen 20 werkdagen te beslissen. Als wij nog informatie nodig hebben, kan dit later worden. Voor een complexe aanvraag staat een langere termijn. In beide gevallen ontvangt u daarover bericht. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Geert Groteplein 10
Postbus 9101
6500 HB Nijmegen

Radboud universitair medisch centrum

Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen

Geert Groteplein 10

www.radboudumc.nl

KvK 41055629/4

Datum
15 juni 2015

Onderwerp
Factuurinformatie Projectaanvraag

Geachte CCD,

Hierbij sturen wij u de administratieve gegevens behorend bij de ingediende projectaanvraag. Wij verzoeken u de factuur te versturen naar [redacted] als gemachtigde van de vergunninghouder. Hiervoor AUB het bij u bekend e-mailadres gebruiken [redacted]

Om verwerking door de financiële afdeling mogelijk te maken verzoeken wij u tevens **op de factuur** de volgende gegevens te vermelden:

Factuuradres: Radboudumc
[redacted]
Postbus 9101
6500HB, Nijmegen

Kostenplaats en kostensoort: [redacted]
CDL projectnummer: [redacted]
Verantwoordelijk onderzoeker: [redacted]

Bij voorbaat dank.

Met vriendelijke groeten

[redacted]



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Geert Groteplein 10
6500 BH Nijmegen

**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl

T 0900-28 000 28 (10 ct /min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
103002015146

Uw referentie

Bijlagen

Datum 25-06-2015

Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte heer/mevrouw,

Op 17-06-2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'onderzoek naar het ontstaan en een betere behandeling van kinderleukemie met aanvraagnummer 103002015146. Uw aanvraag is helaas niet compleet. In deze brief 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 te kunnen beoordelen:

Aanvraagformulier niet volledig

Het aanvraagformulier is niet volledig ingevuld. Hierbij ontvangt u een kopie van het aanvraagformulier retour waarop u het gevraagde kan aanvullen.

U heeft voor de bijlage dierproeven bij onderdeel H. de laatste vraag niet beantwoord:

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

Dit dient voor beide experimenten en voor alle soorten situaties waar het aan de orde is duidelijk te zijn.

Graag ontvangen wij het volledig ingevulde formulier van u terug.

Opsturen binnen veertien dagen

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via NetFTP. Wanneer wij de aanvullende informatie niet binnen de gestelde termijn hebben ontvangen, kunnen wij uw aanvraag buiten behandeling stellen.

Wanneer een beslissing

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat uw aanvraag compleet is. In geval van een complexe aanvraag kan deze termijn met maximaal vijftien werkdagen verlengd worden. U krijgt bericht als de beslisperiode van uw aanvraag vanwege complexiteit wordt verlengd. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Datum

25-06-2015

Onze referentieAanvraagnummer
AVD103002015146**Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlage:

- formulier Melding Bijlagen via de post



Melding

Bijlagen via de post

- U wilt één of meerdere bijlagen naar ons versturen? Voeg *altijd* deze Melding Bijlagen toe. Wij weten dan welke documenten van u zijn en hoeveel documenten u opstuurt.
- Meer informatie vindt u op www.centralecommissiedierproeven.nl
- Of bel met ons: 0900 28 000 28 (10 ct/min).

1 Uw gegevens

1.1 Vul de gegevens in.

Naam aanvrager		
Postcode		Huisnummer

1.2 Bij welke aanvraag hoort de bijlage?

Het aanvraagnummer staat in de brief of de ontvangstbevestiging.

Aanvraagnummer	
----------------	--

2 Bijlagen

2.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Vul de naam of omschrijving van de bijlage in.

<input type="checkbox"/>	
<input type="checkbox"/>	
<input type="checkbox"/>	

3 Ondertekening

3.1 Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:

Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Naam		
Datum	-	- 20
Handtekening		



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Geert Groteplein 10
Postbus 9101
6500 HB Nijmegen

**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD103002015146

Uw referentie
uw ref

Bijlagen
<aantal>

Datum 29-06-2015

Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte heer/mevrouw,

Op 15 juni 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'Modeling childhood leukemia to improve therapy outcome in patients' met aanvraagnummer 103002015146. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Wij hebben hierover maandag 29 juni telefonisch contact gehad met de DEC en met u waardoor een aantal vragen zijn opgelost. De nog openstaande vragen hebben wij in deze brief opgesteld. Wij hebben afgesproken dat het streven is om de aanvraag nog met de eerstvolgende CCD-vergadering mee te laten gaan. Daarvoor moeten wij donderdagochtend de antwoorden kunnen verwerken. U kunt de antwoorden op de vragen in een apart op te tellen document toesturen, het verwerken in de projectaanvraag is niet nodig.

Welke informatie nog nodig

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

Het onderzoek is onderverdeeld in een aantal te nemen stappen.

1: Gebruik geslachten: Gebruikt u dieren van beide geslachten of gaat u selectief om met het gebruik van manlijke en vrouwelijke dieren? Zo ja, met welke onderbouwing?

2: Ter attendering, toestemming databank: U bent van plan een weefselbank aan te spreken met kankercellen van kinderen die terugval hebben gehad en de humane cellen in levende muizen te laten groeien en vermeerderen. Voor experimenten met humaan materiaal moet de donor toestemming geven. Onderzoek zoals dit, waarbij van xenotransplantatie sprake is gaat veel verder dan regulier onderzoek. Daarnaast is het een gevoelig onderwerp omdat het gaat om kanker kinderen. Voor dergelijk onderzoek is het mogelijk dat voor het kunnen uitvoeren van de experimenten extra procedures op gebied van medisch

ethische toetsing van de humane kant, en om te waarborgen dat er sprake is van informed consent. Heeft u zich voldoende verdiept in de bovengenoemde implicaties voor het gebruik van humaan materiaal?

Datum
29-06-2015

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD103002015146

3: Opbouw van het onderzoek: U heeft twee experimenten als bijlage toegevoegd. Voor ieder experiment geldt dat u het heeft opgesplitst in een aantal onderdelen waarvan de samenhang niet helemaal duidelijk is. Kunt u de onderzoeksstrategie per proef verhelderen die aangeeft wat de samenhang tussen de proefonderdelen is en wat beslismomenten zijn in de studie?

4: Aantal dieren voor experiment 1: De gegeven berekening komt neer op $450 + 400 + 30 + 20 = 900$ dieren. U geeft aan dat u in totaal 1000 dieren nodig heeft. Daarnaast staat bij het ongerief ook een ander aantal. Daar staat dat voor onderdeel 1.3 50% van de dieren matig ongerief heeft, wat volgens u neerkomt op 50 dieren. Dat betekent dat er in dat deel van de proef niet 50 maar 100 dieren gebruikt worden met een totaal van 950 dieren. Controleer de berekeningen en de schattingen voor beide onderdelen van de aanvraag. Pas zo nodig een en ander aan en beargumenteer hoe u komt op de gegeven groeps groottes.

5: Aantal dieren bij experiment 2: Het is niet duidelijk welke aantallen dieren nu gebruikt worden voor onderdelen 1.1 tm 1.3. Dit is van belang omdat de behandeling die u de dieren geeft behoorlijk verschilt. U geeft aan dat daarnaast veel dieren apart nodig zijn voor het verkrijgen van de juiste GGO dieren. Dit is niet eerder in de tekst beschreven. Specificeer daarbij het aantal dieren per behandeling. Voor 1.2 bijvoorbeeld maakt u gebruik van twee groepen dieren met andere behandelingen. Geef ook de onderbouwing voor de groeps groottes.

6: Voor onderdeel ex vivo karakterisering van muizen geeft u eerst aan dat er 1920 dieren nodig zijn en in de zin erna 2000. Waar komt het verschil van 80 dieren vandaan? Indien het aantal van 1920 niet klopt, geef dan ook een correcte nieuwe onderbouwing.

7: U schrijft bij de onderbouwing van de aantallen ex vivo 80 dieren per genotype. U geeft daarbij aan dat u daarvan weer verschillende screenings en onderzoeken wilt doen. U geeft daarbij een aantal voorbeelden die eerder niet genoemd zijn in het onderzoek. Geef een nadere onderbouwing van de noodzaak van het gebruiken groeps grootte en een onderbouwing hoe u aan het totaal aantal benodigde dieren komt.

8: Gebruik GGO dieren: U heeft telefonisch reeds aangegeven dat het creëren van GGO lijnen niet onder de vergunning valt. Onduidelijk is nog hoeveel en welke GGO lijnen u aankoopt, en welke u zelf kweekt tbv het project. Valt het aanhouden van de foklijnen buiten het project om ook onder de aangevraagde vergunning?

Indien er foklijnen zijn waarvan niet is vastgesteld dat er geen ongerief is, dan moet dit toegevoegd worden als apart projectonderdeel of als apart project voor het aanhouden van GGO dieren.

Datum
29-06-2015

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD103002015146

Opsturen binnen veertien dagen

Officieel heeft u de tijd om de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief terug te sturen. U kunt dit aanleveren via NetFTP. Stuur u het per post op, gebruik dan het formulier dat u bij deze brief krijgt.

Zoals besproken delen wij u het volgende nog mede: Als wij de ontbrekende informatie donderdagochtend aanstaande (2 juli) nog kunnen verwerken, kunnen wij uw aanvraag in de eerstvolgende CCD-vergadering tot besluitvorming laten komen. Anders wordt uw aanvraag in de eerstvolgende vergadering in augustus behandeld.

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.

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlage:

- formulier Melding Bijlagen via de post



Melding

Bijlagen via de post

- U wilt één of meerdere bijlagen naar ons versturen? Voeg *altijd* deze Melding Bijlagen toe. Wij weten dan welke documenten van u zijn en hoeveel documenten u opstuurt.
- Meer informatie vindt u op www.centralecommissiedierproeven.nl
- Of bel met ons: 0900 28 000 28 (10 ct/min).

1 Uw gegevens

- 1.1 Vul de gegevens in.
- | | | |
|----------------|--|------------|
| Naam aanvrager | | |
| Postcode | | Huisnummer |
- 1.2 Bij welke aanvraag hoort de bijlage?
Het aanvraagnummer staat in de brief of de ontvangstbevestiging.
- | | |
|----------------|--|
| Aanvraagnummer | |
|----------------|--|

2 Bijlagen

- 2.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
Vul de naam of omschrijving van de bijlage in.
- | | |
|--------------------------|--|
| <input type="checkbox"/> | |
| <input type="checkbox"/> | |
| <input type="checkbox"/> | |

3 Ondertekening

- 3.1 Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:
- | | | |
|--------------|---|------|
| Naam | | |
| Datum | - | - 20 |
| Handtekening | | |
- Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

[REDACTED]

Van: [REDACTED]
Verzonden: woensdag 1 juli 2015 15:46
Aan: ZBO-CCD
Onderwerp: FW: openstaande vragen projectaanvraag dierproeven
Bijlagen: ANSWERS CCD (2).docx

Categorieën: Dossierhouder: [REDACTED]

Omdat onze server soms niet om kan gaan met mail-to accounts
stuur ik u nog een keer de file.

Met groet

[REDACTED]

[REDACTED]
P.O.Box 9101, 6500 HB Nijmegen, The Netherlands

[REDACTED]
www.radboudumc.nl

Van: [REDACTED]
Verzonden: woensdag 1 juli 2015 15:43
Aan: 'ZBO-CCD'
CC: [REDACTED]
Onderwerp: RE: openstaande vragen projectaanvraag dierproeven

Geachte heer [REDACTED]

In het begeleidende word document vindt u ons antwoord op
de door u gestelde vragen. Ik hoop dat we hiermee u vragen
volledig en naar tevredenheid hebben kunnen beantwoorden.
Mocht u morgen nog vragen hebben kunt u mij altijd bellen
op onderstaand (mobiele) nummer.

Met vriendelijke groet

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

Van: ZBO-CCD [<mailto:ZBO-CCD@minez.nl>]

Verzonden: dinsdag 30 juni 2015 9:33

Aan: [REDACTED]

Onderwerp: openstaande vragen projectaanvraag dierproeven

Geachte mijnheer van [REDACTED]

Zoals telefonisch besproken stuur ik u hierbij de nog openstaande vragen in de bijgesloten brief.

Ik heb donderdagochtend tijd gereserveerd zodat we de aanvraag volgende week in de CCD vergadering kunnen behandelen.

Mocht dat onverhoopt niet lukken, dan is de eerstvolgende mogelijkheid om de aanvraag te behandelen op 07 augustus.

Als u nog vragen heeft kunt u deze aan mij stellen per mail naar dit emailadres of ons algemene telefoonnummer (zie website). Ik ben persoonlijk te bereiken op onderstaande telefoonnummer.

Ter volledigheid moet ik mededelen dat de antwoorden op de vorige brief noodzakelijk zijn omdat de aanvraag niet compleet is als deze niet volledig is ingevuld. Als de aanvraag niet compleet is, kan er besluitvorming plaatsvinden.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven www.zbo-ccd.nl

.....
Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag
.....

T: [REDACTED]

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.

Het Radboudumc staat geregistreerd bij de Kamer van Koophandel in het handelsregister onder nummer 41055629. The Radboud university medical center is listed in the Commercial Register of the Chamber of Commerce under file number 41055629.

[REDACTED]

Van: [REDACTED]
Verzonden: vrijdag 3 juli 2015 10:39
Aan: ZBO-CCD
CC: [REDACTED]
Onderwerp: RE: Vraag over aantallen bij uw aanvraag voor AVD2015146

Geachte [REDACTED]

U heeft terecht geconstateerd dat er een foutje zit in de berekeningen van het aantal muizen per graft. Dat zouden er, volgens het beschreven protocol 12 zijn i.p.v. 9.

Omdat we (deze week) de eerste resultaten hebben van onze xenograft pilots waarin we voor de twee eerste leukemieën een succesvolle engraftment zien in alle zes (2x3) muizen, denk ik dat het verantwoord is om het aantal secondary recipients (hertransplantatie) terug te brengen tot 2 muizen. De berekening wordt dan $3 + (3 \times 2) = 9$ muizen per leukemie. De totale aantallen kunnen op deze manier ongewijzigd blijven.

Ik hoop u hiermee voldoende geïnformeerd te hebben.

Met vriendelijke groet

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]
P.O.Box 9101, 6500 HB Nijmegen, The Netherlands

[REDACTED]
www.radboudumc.nl

Van: ZBO-CCD [<mailto:ZBO-CCD@minez.nl>]
Verzonden: vrijdag 3 juli 2015 10:03
Aan: [REDACTED]
Onderwerp: Vraag over aantallen bij uw aanvraag voor AVD2015146

Geachte mijnheer [REDACTED]

Het advies is klaar en wordt op dit moment door het kwaliteitssysteem gevoerd ter finalisering. Daaruit is nog een vraag in de collegiale toets naar voren gekomen. Ik kon u telefonisch niet bereiken dus ik doe het per mail.

Het gaat om de aantallen dieren in proef 1.

Er staat dat er als basis drie dieren genomen worden om weefsel te vermeerderen en dat weefsel wordt verder gebruikt in drie nieuwe dieren.

Mijn collega interpreteerde dat het dan gaat om groepen van 6 dieren, of als het weefsel per muis in drie nieuwe dieren wordt gebruikt om 12 ($3 + 9 = 12$) dieren.

U geeft aan dat u uitgaat van 9X 50 dieren. Kunt u daar de correcte uitleg bij geven?

Ik hoop dat het nog lukt om deze vraag vandaag nog beantwoord te krijgen. Vanmiddag worden de stukken verzonden naar de CCD.

Met vriendelijke groet,

[Redacted]

[Redacted]

Centrale Commissie Dierproeven www.zbo-ccd.nl

.....
Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag
.....

T: [Redacted]
[Redacted]

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.

Het Radboudumc staat geregistreerd bij de Kamer van Koophandel in het handelsregister onder nummer 41055629. The Radboud university medical center is listed in the Commercial Register of the Chamber of Commerce under file number 41055629.

[REDACTED]

Van: [REDACTED]
Verzonden: vrijdag 3 juli 2015 12:04
Aan: ZBO-CCD
Onderwerp: RE: DEC advies bij aanvraag 2015146 leukemie

Categorieën: Dossierhouder: [REDACTED]

Beste [REDACTED]

Er zijn geen DEC-leden betrokken bij dit project, dus alle DEC-leden zijn betrokken bij de advisering.

Door de formulering in het format DEC-advies was ik in de veronderstelling dat punt B.4. alleen toegevoegd moest worden indien er betrokkenheid van DEC-leden was, en weggelaten moest worden wanneer er geen betrokkenheid was.

Vriendelijke groeten,

[REDACTED]

Van: ZBO-CCD [<mailto:ZBO-CCD@minez.nl>]
Verzonden: vrijdag 3 juli 2015 11:57
Aan: [REDACTED]
Onderwerp: DEC advies bij aanvraag 2015146 leukemie

Beste [REDACTED]

We zagen dat in het DEC advies niet was ingevuld of er DEC leden mogelijk betrokken waren (punt 4). Kan dit nog worden verhelderd?

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven www.zbo-ccd.nl

.....
Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag
.....

T: [REDACTED]

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.

Het Radboudumc staat geregistreerd bij de Kamer van Koophandel in het handelsregister onder nummer 41055629. The Radboud university medical center is listed in the Commercial Register of the Chamber of Commerce under file number 41055629.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Geert Groteplein 10
Postbus 9101
6500 HB Nijmegen

**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl

T 0900-28 000 28 (10 ct /min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD103002015146

Uw referentie

Datum 21-07-2015
Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Bijlagen
1

Geachte heer,

Op 15-06-2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'Modeling childhood leukemia to improve therapy outcome in patients' met aanvraagnummer 103002015146. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 01-07-2015 en 03-07-2015 heeft u uw aanvraag, naar aanleiding van vragen door het Secretariaat gewijzigd.

Beslissing

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

U kunt met uw project 'Modeling childhood leukemia to improve therapy outcome in patients' starten. De vergunning wordt afgegeven vanaf dagtekening van deze brief tot en met 15-07-2020.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie RUDEC gevoegd d.d. 15-06-2015. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a lid 3 van de wet. Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving liggen ten grondslag aan dit besluit. Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie, maar wijken op twee punten af. Ten eerste dient beter omschreven te worden wat het stappenplan is zodat de samenhang van de verschillende projectonderdelen blijkt en de go-nogo momenten duidelijk worden. Dit moet met de IVD afgestemd worden die ook toeziet op de naleving. Ten tweede is het gebruik of fok van GGO dieren in de aanvraag onvoldoende beschreven en niet beoordeelbaar. De vergunning op het punt van gebruik van GGO-dieren wordt daarom beperkt tot het fokken of houden van reeds bestaande lijnen zonder ongerief óf foklijnen die onder een andere vergunning zijn gebracht als niet vast staat dat er geen sprake is van ongerief (volgens de criteria die daarvoor gelden). Fokken of houden van GGO-dieren waarvan niet vast staat dat er geen sprake is van ongerief, valt dus niet onder deze vergunning.

Verder nemen wij het advies van de commissie over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

Datum
21-07-2015

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD103002015146

Bezwaar

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen.

Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

Bij het indienen van een bezwaarschrift vragen we u in ieder geval de datum van de beslissing waartegen u bezwaar maakt en het aanvraagnummer te vermelden. U vindt deze gegevens in het colofon.

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

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

De Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



mr. drs. H.M. van der Gaag-Halbertsma
plv Algemeen Secretaris

Dit besluit is genomen met inachtneming van het Besluit mandaat, volmacht en machtiging van de Centrale Commissie Dierproeven CCD 2014 zoals de Centrale Commissie Dierproeven heeft vastgesteld op 19 december 2014, ref 2014-04 en is gepubliceerd in de Staatscourant van 2 januari 2015, Nr. 163

Bijlagen

- Vergunning

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



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
Adres: Geert Groteplein 10
Postcode en woonplaats: 6500 HB Nijmegen
Deelnemersnummer: 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak vanaf dagtekening van deze brief tot en met 15-07-2020, voor het project 'Modeling childhood leukemia to improve therapy outcome in patients' met aanvraagnummer AVD103002015146, volgens advies van Dierexperimentencommissie RUDEC. Hierbij is afgeweken van het DEC-advies om twee redenen: Het stappenplan en de go-nogo momenten in het project behoeven nog verduidelijking, en het gebruik van GGO dieren in het project is onvoldoende beschreven en niet beoordeelbaar.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 15-06-2015
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 15-06-2015;
 - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 15-06-2015;
 - c. Advies van Dierexperimentencommissie, ontvangen op 15-06-2015
 - d. De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 01-07-2015 en 03-07-2015.

Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst	Voorwaarden
Proef 1:	Muis	950	Matig	Ja zie voorwaarden 1 en 2
Proef 2:	Muis	3920	matig	Ja zie voorwaarden 1 en 2

Voorwaarden

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

1. Er dient beter omschreven te worden wat het stappenplan is zodat de samenhang van de verschillende projectonderdelen blijkt en de go-nogo momenten duidelijk worden. Dit moet met de IVD afgestemd worden die ook toeziet op de naleving.
2. Het gebruik of fok van GGO dieren is in de aanvraag onvoldoende beschreven en niet beoordeelbaar. De vergunning op het punt van gebruik van GGO-dieren wordt daarom beperkt tot het fokken of houden van reeds bestaande lijnen zonder ongerief óf foklijnen die onder een andere vergunning zijn gebracht als niet vast staat dat er geen sprake is van ongerief (volgens de criteria die daarvoor gelden). Het fokken of houden van GGO-dieren waarvan niet vast staat dat er geen sprake is ongerief, valt dus niet onder deze vergunning.

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

Datum
21-07-2015

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD103002015146

dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

In alle dierproeven worden in principe zowel mannelijke als vrouwelijke dieren in evenredige aantallen gebruikt. Zo doende wordt voorkomen dat surplusdieren in voorraad moeten worden gedood. Hiervan kan alleen gemotiveerd worden afgeweken met toestemming van de CCD. De aanvrager mag de uitkomsten van de eerste onderzoeken waarbij beide geslachten gebruikt worden, rapporteren aan de CCD. De uitkomst van deze eerste onderzoeken kan voor de CCD aanleiding geven om bovenstaande voorwaarde van gelijk gebruik van beide geslachten, bij deze projectvergunning te wijzigen of in te trekken.

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

Volgens artikel 10c van de Wet op de dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g. Uit artikel 10b volgt dat de dierproeven zijn ingedeeld in de categorieën terminaal, licht, matig of ernstig. Als er wijzigingen in een dierproef plaatsvinden, moeten deze gemeld worden aan de Centrale Commissie Dierproeven. Hebben de wijzigingen negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn, dan moet volgens artikel 10a5 de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.

Artikel 10b schrijft voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister van Economische Zaken een ontheffing is verleend.

Verzorging

De fokker, leverancier en gebruiker moeten volgens artikel 13f van de wet over voldoende personeel beschikken en ervoor zorgen dat de dieren behoorlijk worden verzorgd, behandeld en gehuisvest. Er moeten ook personen zijn die toezicht houden op het welzijn en de verzorging van de dieren in de inrichting, personeel dat met de dieren omgaat moet toegang hebben tot informatie over de in de inrichting gehuisveste soorten en personeel moet voldoende geschoold en bekwaam zijn. Ook moeten er personen zijn die een eind kunnen maken aan onnodige pijn, lijden, angst of blijvende schade die tijdens een dierproef bij een dier wordt veroorzaakt. Daarnaast zijn er personen die zorgen dat een project volgens deze vergunning wordt uitgevoerd en als dat niet mogelijk is zorgen dat er passende maatregelen worden getroffen.

In artikel 9 staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn.

In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.

Voordat een dierproef die onderdeel uitmaakt van dit project start, moet volgens artikel 10a3 van de wet de uitvoering afgestemd worden met de instantie voor dierenwelzijn.

Pijnbestrijding en verdoving

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdoving wordt uitgevoerd tenzij dat niet mogelijk is, dan wel bij het verrichten van een dierproef worden pijnstillers toegediend of andere goede methoden gebruikt die de pijn, het lijden, de angst of de blijvende schade bij het dier tot een minimum beperken. Een dierproef die bij het dier gepaard gaat met zwaar letsel dat hevige pijn kan veroorzaken, wordt niet zonder verdoving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdoving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdoving onverenigbaar is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

Einde van een dierproef

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

Datum
21-07-2015

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD103002015146

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

Volgens artikel 13b moet de dood als eindpunt van een dierproef zoveel mogelijk worden vermeden en vervangen door in een vroege fase vaststelbare, humane eindpunten. Als de dood als eindpunt onvermijdelijk is, moeten er zo weinig mogelijk dieren sterven en het lijden zo veel mogelijk beperkt blijven.

Uit artikel 13c 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 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.

DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer 2015-0050
2. Titel van het project: Modeling childhood leukemia to improve therapy outcome in patients.
3. Titel van de NTS: Onderzoek naar het ontstaan en een betere behandeling van kinderleukemie.
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
 - Naam DEC: RUDEC
 - Telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED] bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9.00 tot 15.00 uur
 - Mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject:
 - ontvangen door DEC: 27-03-2015
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken: 13-04-2015
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van 20-04-2015 tot 18-05-2015
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 18-05-2015
 - advies aan CCD: 15-06-2015
7. Eventueel horen van aanvrager
 - Datum
 - Plaats
 - Aantal aanwezige DEC-leden
 - Aanwezige (namens) aanvrager
 - Strekking van de vraag / vragen
 - Strekking van het (de) antwoord(en)
 - Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag
8. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum: 20-04-2015
 - Strekking van de vragen: De niet-technische samenvatting is te lang en bevat nog veel ingewikkelde termen. De onderzoekers worden verzocht de niet-technische samenvatting aan te passen conform de richtlijnen van de CCD. De onderbouwing van de aantallen dieren die de onderzoekers willen gebruiken ontbreekt. De onderzoekers worden verzocht dit toe te lichten met behulp van het voorgestelde experimentele design. Uit de gegeven toelichting op de 3V's blijkt dat een aantal dieren zal worden bestraald, maar dit ontbreekt in de beschrijving van de voorgestelde dierproef. De onderzoekers worden verzocht dit in overeenstemming met elkaar te brengen. Voorts worden de onderzoekers verzocht te verduidelijken op grond van welke toename van ongerief de dieren uit de proef genomen zullen worden, en met welke frequentie de dieren gecheckt zullen worden op toename van

ongerief. Andere vragen betreffen kleine, soms slechts tekstuele, wijzigingen of onduidelijkheden in de vergunningaanvraag.

- Datum antwoord: 18-05-2015
 - Strekking van de antwoorden: De niet-technische samenvatting is nu aangepast. De aantallen dieren zijn nu beter onderbouwd, en de bestraling is toegevoegd aan de beschrijving van de dierproef. De onderzoekers hebben duidelijker omschreven hoe vaak zij de dieren zullen checken en bij welke toename van ongerief de dieren zullen worden gedood.
 - De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.
9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC)
- Aard expertise
 - Deskundigheid expert
 - Datum verzoek
 - Strekking van het verzoek
 - Datum expert advies
 - Expert advies

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig.
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.

C. Beoordeling (Inhoud):

1. Het project is:
 - uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling, namelijk 'to obtain a detailed understanding of the genetic interactions between tumor suppressor genes and oncogenes and the molecular mechanisms by which our genes of interest contribute to the pathogenesis of childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL) as well as the outgrowth of drug-resistant clones in ALL'. Het wordt ingeschat als een substantieel belang. De te behalen onderzoeksresultaten zullen meer inzicht verschaffen in de manier waarop tumor suppressor genen en oncogenen bijdragen aan de groei van leukemische cellen en aan resistentie voor chemotherapie. Deze resultaten kunnen op termijn leiden tot de ontwikkeling van effectievere therapie op maat voor kinderen met leukemie, waardoor een hoger percentage kinderen zal genezen en zij bovendien op latere leeftijd minder last van bijwerkingen van deze behandeling zullen ondervinden.
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Deze groep heeft veel ervaring in dit onderzoeksveld en met de voorgestelde dierproeven. De gekozen aanpak leidt tot betrouwbare uitspraken over het effect van de expressie van tumor suppressor genen en oncogenen op de groei van leukemische cellen en op resistentie voor chemotherapie.
5. Er is geen sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden

of behandeling van de dieren.

6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het welzijn van de dieren wordt aangetast door angst, pijn, en stress als gevolg van de volgende handelingen en omstandigheden: transport van de dieren van de foklocatie naar het dierenlaboratorium, injecties intraveneus of intrafemoraal (onder verdoving) met humane tumorcellen; bestraling met een letale dosis straling waarna de dieren een transplantatie met humane hematopoietische stamcellen of leukemische cellen ontvangen, ontwikkeling van leukemie, en chemotherapie. De cumulatieve aantasting van het welzijn wordt geclassificeerd als matig voor de dieren die bestraald worden (45% van de dieren), chemotherapie ondergaan (5% van de dieren) of leukemie ontwikkelen (30% van de dieren) en licht voor de overige dieren (40% van de dieren).
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**. De doelstelling van het project kan niet gerealiseerd worden zonder proefdieren of door gebruik van minder complexe diersoorten. De leukemische cellen groeien niet of nauwelijks in weefselkweek, waardoor er muizen nodig zijn om voldoende tumorcellen te genereren voor het beschreven onderzoek.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd. De DEC is het eens met het beschreven onderzoeksmodel en de onderbouwing van het aantal benodigde dieren. De DEC is van oordeel dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 5000 muizen.
9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven. De experimentele handelingen bij de dieren zullen worden uitgevoerd door hierin getrainde onderzoekers, waardoor de stress voor de dieren zoveel mogelijk wordt beperkt. De dieren worden twee à drie maal per week gechecked op ziekteverschijnselen, en hun bloed wordt 1 à 2 maal per maand gecontroleerd op leukemische cellen. Op die manier kunnen zieke dieren in een vroeg stadium van leukemie op humane wijze gedood worden om onnodig lijden van de dieren te voorkomen. De DEC is ervan overtuigd dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.
Negatieve effecten op het milieu worden voorkomen door adequate huisvesting van de dieren en voorzorgsmaatregelen bij het hanteren van onderzoeksmateriaal.
10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project, zelfstandig leesbaar, beknopt en begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

Op basis van de onder C genoemde overwegingen komt de DEC tot de volgende ethische afweging. Bij de dierproeven wordt adequaat invulling gegeven aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en/of verfijning van dierproeven. Het ongerief voor 40% van de dieren is licht, en voor 60% van de dieren matig.

Tegenover de nadelige gevolgen voor de dieren staat dat met dit onderzoek belangrijke inzichten kunnen worden verkregen in de manier waarop tumor suppressor genen en oncogenen bijdragen aan de groei van leukemische cellen en aan resistentie voor chemotherapie. Het is aannemelijk dat dit inzicht kan bijdragen aan het ontwikkelen van effectievere therapie op maat voor kinderen met leukemie, waardoor een hoger percentage kinderen zal genezen en zij bovendien op latere leeftijd minder last van bijwerkingen van deze behandeling zullen ondervinden. De DEC acht het belang van

die doelstelling substantieel, de concrete doelstellingen zijn haalbaar en kunnen niet zonder dieren worden behaald. De beoogde kennisvermeerdering en mogelijke gezondheidswinst zijn voldoende groot dat naar het oordeel van de commissie de nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren, in de vorm van angst, pijn of stress, ethisch aanvaardbaar zijn.

E. Advies

1. Advies aan de CCD
 - De DEC adviseert de vergunning te verlenen
2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.