

[illegible]

06 AUG 2015

Centrale Commissie Dierproeven



06 AUG 2015

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>	☒ Ja > Vul uw deelnemernummer in 11400 ☐ Nee > U kunt geen aanvraag doen																								
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">Naam instelling of organisatie</td> <td colspan="2">Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUMC) Amsterdam</td> </tr> <tr> <td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td> <td colspan="2" style="background-color: black;"></td> </tr> <tr> <td>KvK-nummer</td> <td>53815211</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Straat en huisnummer</td> <td>de Boelelaan</td> <td>1117</td> </tr> <tr> <td>Postbus</td> <td colspan="2"></td> </tr> <tr> <td>Postcode en plaats</td> <td>1081HV</td> <td>Amsterdam</td> </tr> <tr> <td>IBAN</td> <td colspan="2" style="background-color: black;"></td> </tr> <tr> <td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td> <td colspan="2" style="background-color: black;"></td> </tr> </table>	Naam instelling of organisatie	Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUMC) Amsterdam		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde			KvK-nummer	53815211		Straat en huisnummer	de Boelelaan	1117	Postbus			Postcode en plaats	1081HV	Amsterdam	IBAN			Tenaamstelling van het rekeningnummer		
Naam instelling of organisatie	Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUMC) Amsterdam																									
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde																										
KvK-nummer	53815211																									
Straat en huisnummer	de Boelelaan	1117																								
Postbus																										
Postcode en plaats	1081HV	Amsterdam																								
IBAN																										
Tenaamstelling van het rekeningnummer																										
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">Postbus</td> <td colspan="2"></td> </tr> <tr> <td>Postcode en plaats</td> <td>1081HV</td> <td>Amsterdam</td> </tr> <tr> <td>IBAN</td> <td colspan="2" style="background-color: black;"></td> </tr> <tr> <td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td> <td colspan="2" style="background-color: black;"></td> </tr> </table>	Postbus			Postcode en plaats	1081HV	Amsterdam	IBAN			Tenaamstelling van het rekeningnummer														
Postbus																										
Postcode en plaats	1081HV	Amsterdam																								
IBAN																										
Tenaamstelling van het rekeningnummer																										
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">(Titel) Naam en voorletters</td> <td style="width: 50%; text-align: right;"> ☒ Dhr. ☐ Mw. </td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td style="background-color: black;"></td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td style="background-color: black;"></td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> <td style="background-color: black;"></td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td style="background-color: black;"></td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters	☒ Dhr. ☐ Mw.	Functie		Afdeling		Telefoonnummer		E-mailadres															
(Titel) Naam en voorletters	☒ Dhr. ☐ Mw.																									
Functie																										
Afdeling																										
Telefoonnummer																										
E-mailadres																										
1.5	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">(Titel) Naam en voorletters</td> <td style="width: 50%; text-align: right;"> ☒ Dhr. ☐ Mw. </td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td style="background-color: black;"></td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td style="background-color: black;"></td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> <td style="background-color: black;"></td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td style="background-color: black;"></td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters	☒ Dhr. ☐ Mw.	Functie		Afdeling		Telefoonnummer		E-mailadres															
(Titel) Naam en voorletters	☒ Dhr. ☐ 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 <i>Melding Machtiging mee met deze aanvraag</i> |
| ☐ 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 | 1 - 9 - 2015 |
| Einddatum | 31 - 8 - 2020 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- | |
|--|
| Pathofysiologie en therapie ontwikkeling voor hematologische maligniteiten (leukemie, myeloom, myelodysplasie, myelofibroze) |
|--|
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- | |
|--|
| Pathofysiologie en therapie ontwikkeling voor hematologische maligniteiten (leukemie, myeloom, myelodysplasie, myelofibroze) |
|--|
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|--|
| Naam DEC | DEC-VU-VUMC |
| Postadres | Van der Boechorststraat 1, [REDACTED]
1081 BT Amsterdam The Netherlands |
| E-mailadres | [REDACTED] |



Format

Niet-technische samenvatting

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

1 Algemene gegevens

1.1 Titel van het project	Pathofysiologie en therapie ontwikkeling voor hematologische maligniteiten (leukemie, myeloom, myelodysplasie, myelofibrose)
1.2 Looptijd van het project	5 jaar
1.3 Trefwoorden (maximaal 5)	Gehumaniseerd muizenmodel, hematologische tumoren (van patiënten), biobank van geëxpandeerde patiëntenmateriaal

2 Categorie van het project

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

3 Projectbeschrijving

3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)	Achtergrond/wetenschappelijke vraagstelling Bij de behandeling van beenmergkanker, zoals acute leukemie en multipel myeloom blijkt het percentage genezen patiënten nauwelijks toe te nemen en schommelt dit al vele jaren rond 50% bij leukemie en rond 10% bij multipel myeloom. Hoewel patiënten in eerste instantie goed reageren op therapie, blijkt er vaak een klein restant aan tumorcellen te zijn dat de behandeling heeft overleefd en waarvan uit de ziekte weer kan terugkeren. Deze tumorcellen blijken veelal ongevoelig (resistent) te zijn geworden voor therapie. De oorzaak hiervoor kan liggen in veranderde genetische kenmerken van de tumorcellen. Soms waren deze veranderingen al vanaf het begin aanwezig in een klein aantal tumorcellen, soms ontstaan deze tijdens en vaak dóór de
---	---

therapie. In dit project maken wij gebruik van een eerder door ons ontwikkelde methode waarbij we in muizen, onder de huid, tumorcellen die van de patiënten zelf afkomstig zijn, kunnen laten uitgroeien. Daarbij hebben we geconstateerd dat de tumorcellen hun kenmerkende groei-eigenschappen én het patroon van gevoeligheid of resistentie voor therapie, behouden.

Voor dit doel gebruiken we muizen met een verzwakt immuunsysteem. Het is echter wel essentieel om eerst een drager (█) genoemd) die met stamcellen is bezaait, onder de huid (subcutaan) te implanteren. Dit groeit in een aantal weken uit tot een knobbelje weefsel met daarin bot/beenmergachtige structuren van humane origine. Wanneer hierin vervolgens van patiënten afkomstige tumorcellen in geïnjecteerd worden, fungeert dit als een voedingsbodem voor de tumorcellen en kunnen de cellen uitgroeien tot tumoren.

De doelstelling van dit project is om beenmerg of bloedmonsters van de leukemie of myeloompatiënten (die afgenomen worden ofwel vóór therapie (bij diagnose) en ná chemotherapie (als de ziekte terugkeert) in muizen te laten uitgroeien tot tumoren. Na euthanasie van de muizen worden de tumoren verwijderd en uitgebreid geanalyseerd en gekarakteriseerd. Tevens worden de tumorcellen ingevroren ten behoeve van het aanleggen van een zogenaamde biobank van hematologische tumoren.

3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?

Wetenschappelijk belang:

De bij de patiënten afgenomen beenmerg-/bloedmonsters leveren lang niet altijd voldoende tumorcellen op voor aanvullend onderzoek en wanneer de behandeling eenmaal is gestart, zijn er bij de patiënten geen "oorspronkelijke" cellen van het "diagnose-stadium" meer aanwezig. Middels de biobank krijgen we de beschikking over een grote hoeveelheid oorspronkelijk (patiënten) tumor materiaal van de verschillende typen leukemie en multipel myeloom (en verschillende stadia van de ziekte), zónder dat we daarvoor opnieuw tumorcellen bij muizen hoeven te laten uitgroeien. Deze biobank fungeert als bron van volledig gekarakteriseerde patiënten tumorcellen waarmee selectief, specifieke in vitro en in vivo experimenten uitgevoerd kunnen worden. In een ander onderdeel van het onderzoeksprogramma worden deze tumorcellen weer gebruikt voor onderzoek dat gericht is op therapie-ontwikkeling. Zodoende draagt dit project bij aan het verkrijgen van een verbeterd inzicht in de specifieke (genetische) kenmerken van therapie-resistente hematologische tumoren, (dus de "zwakke plekken in de verdediging" van de tumorcellen). Hierdoor wordt duidelijk waarop nieuwe immuno-chemotherapie bij patiënten met deze specifieke kenmerken, moet worden afgestemd.

Maatschappelijk belang:

Van de circa 1200 personen per jaar in Nederland, die een beenmergkanker ontwikkelen, geneest minder dan de helft. De reden is veelal therapieresistentie. Dit project vormt het startpunt voor aanvullende studies die op hun beurt een belangrijke bijdragen kunnen gaan leveren aan het verkrijgen van betere behandelingsmogelijkheden, door het ontwikkelen en uittesten van nieuwe chemotherapie met of zonder immuuntherapie. Deze behandelingen worden in het hier beschreven █ de preklinische fase op hun effectiviteit getest, met het doel deze ook klinisch en op de tumorspecifieke kenmerken ("de zwakke plekken") te gaan toepassen bij leukemie- en myeloompatiënten.

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

Er wordt alleen met muizen gewerkt. Tijdens de looptijd van het project van 5 jaar worden in totaal 2100 muizen gebruikt.

3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?

Bij de muizen die voor dit project worden gebruikt zullen er subcutaan tumoren gaan groeien. Deze ontstaan vanuit subcutaan geïnjecteerde tumorcellen die afkomstig zijn van leukemie - of myeloom patiënten. De groei van tumoren wordt gevolgd m.b.v. schuifmaat metingen. Vóórdat er ongerief optreedt wordt het experiment beëindigd door middel van euthanasie.

3.5 Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?

Ongerief: matig

3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?

Aan het eind van het experiment worden de dieren op humane wijze gedood, teneinde weefsels voor verder onderzoek te kunnen verkrijgen.



4 Drie V's

4.1 **Vervanging**

Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.

Vanwege de eerder gebleken onmogelijkheid om leukemie/myeloom patiënten-materiaal met behoud van specifieke kenmerken, *in vitro* te laten uitgroeien, is het ook niet mogelijk om *in vitro* de specifieke (groei-)eigenschappen van de tumorcellen van patiënten te bestuderen en, in een latere fase van het onderzoek, ook niet om *in vitro* nieuwe chemo-immuno-combinatie therapieën uit te testen.

4.2 **Vermindering**

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

In het voorafgaande onderzoek is gebleken dat het mogelijk is om met 3 muizen per patiëntmonster voldoende materiaal te verkrijgen voor verder onderzoek én voor opslag in de diepvries biobank voor toekomstige experimenten.

4.3 **Verfijning**

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

We hebben gekozen voor muizen met een verzwakt immuunsysteem omdat hierin tumorcellen van patiënten kunnen uitgroeien. Daarvoor is het wel essentieel dat we eerst subcutaan bij deze muizen "humane beenmergachtige structuren" laten uitgroeien. In het "model" dat in voorafgaand onderzoek door ons is ontwikkeld blijft de groei van de tumorcellen veelal beperkt tot de subcutane locatie waarin de tumorcellen zijn geïnjecteerd. Wij zien weinig uitgroeï van tumorcellen in muizenorganen (bijv. lever, milt, beenmerg) waardoor er, ten opzichte van andere leukemiemodellen, minder ongerief optreedt.

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

Wij werken volgens de code-of-practice kankeronderzoek. Waar mogelijk worden handelingen uitgevoerd onder narcose; indien mogelijk, wordt een antagonist toegediend; postoperatieve pijnbestrijding wordt toegepast; meting en registratie van de grootte van de tumoren wordt gebruikt om het humane eindpunt tijdig te kunnen vaststellen; indien relevant wordt het lichaamsgewicht gebruikt om een eventueel HEP te kunnen bepalen; aan het eind van het experiment worden de dieren gedood volgens de richtlijn 2010/63/EU.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beeoordeling achteraf

Andere opmerkingen



Bijlage

Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11400				
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUMC), Amsterdam.				
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in. <i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>	<table><thead><tr><th>Volgnummer</th><th>Type dierproef</th></tr></thead><tbody><tr><td>1</td><td>Pathofysiologie van humane primaire hematologisch tumoren die groeien in een [REDACTED] [REDACTED] t.b.v. karakterisering en biobanking (A1) en veranderingen in het bot metabolisme en de stromafunctie in de [REDACTED]</td></tr></tbody></table>	Volgnummer	Type dierproef	1	Pathofysiologie van humane primaire hematologisch tumoren die groeien in een [REDACTED] [REDACTED] t.b.v. karakterisering en biobanking (A1) en veranderingen in het bot metabolisme en de stromafunctie in de [REDACTED]
Volgnummer	Type dierproef					
1	Pathofysiologie van humane primaire hematologisch tumoren die groeien in een [REDACTED] [REDACTED] t.b.v. karakterisering en biobanking (A1) en veranderingen in het bot metabolisme en de stromafunctie in de [REDACTED]					

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Het hier beschreven type dierproef wordt in het onderzoeksproject voor de volgende doeleinden gebruikt: Ten eerste voor het laten uitgroeien van primaire tumorcellen afkomstig uit bloed of beenmergmonsters van patiënten met verschillende vormen van hematologische maligniteiten (o.a. leukemie en myeloom) [REDACTED] in muizen; Ten tweede, voor onderzoek naar de veranderingen die optreden in de "[REDACTED]" van deze patiënten (daar waar de tumorcellen zich in het beenmerg bevinden), met betrekking tot botvormende capaciteit van stromale cellen in de niche. Ten derde, onderzoek naar de (genetische en functionele) veranderingen die er optreden in stromale cellen als gevolg van specifieke interacties tussen (normale) stromale cellen en de hematologische tumorcellen of als gevolg van interacties tussen maligne stromale cellen met normale hematopoietische stamcellen (HSC).

Voor alle drie deze doelstellingen wordt nagenoeg dezelfde (dier-)proefopzet gebruikt. Dit betreft de methode om bij muizen, een bot-stroma-beenmergachtige structuur **van humane origine** te laten uitgroeien. [REDACTED] genoemd is uniek vanwege het feit dat wanneer primair materiaal van hematologische tumoren (d.w.z. direct van patiënten afkomstig) hierin geïnjecteerd wordt, dat de gecreëerde humane omgeving de uitgroei van deze primaire tumorcellen ondersteunt. Dit blijkt het geval voor zowel acute myeloïde leukemie (AML), multipel myeloom (ziekte van Kahler), myelodysplastisch syndroom (MDS), myelofibrose (MF), en voor naar het beenmerg metastaserende lymfomen en/of solide tumoren (borst-prostaat kanker). Verder leent het [REDACTED] zich uitstekend om veranderingen die er optreden in de stromale cellen te onderzoeken die verantwoordelijk zijn voor het in stand houden van de bot/beenmerg/stroma omgeving in de "niche".

A1. De keuze voor dit model voor het karakteriseren van primaire hematologische tumoren is gebaseerd op de volgende argumenten:

- 1 Voor het translationeel hematologische onderzoek is het van groot belang om experimenten te kunnen verrichten met primair patiënten materiaal, waardoor de resultaten direct terug gekoppeld kunnen worden naar de individuele patiënt en zijn therapie; resultaten van het onderzoek hebben meer relevantie wanneer er primair materiaal is getest dan wanneer er cellijnen worden gebruikt. (Desalniettemin worden er voor specifieke experimentele vraagstellingen ook wel met cellijnen in dit project gewerkt).
- 2 M.b.v. het [REDACTED] is het mogelijk om de vaak kleine monsters (met weinig celopbrengst) die bij patiënten afgenomen (kunnen) worden enorm te expanderen ten behoeve van aanvullend onderzoek en voor opslag in de tumor biobank, die bedoeld is voor toekomstig en retrospectief onderzoek (dat geldt voor zowel diagnose monsters maar ook remissie en relapse monsters).
- 3 Heel belangrijk is het feit dat de tumorcellen van patiënten in hun oorspronkelijke en natuurlijke omgeving kunnen groeien en uit eerder onderzoek van ons is gebleken dat de eigenschappen van groei, en ook het patroon van chemo-gevoeligheid maar ook van chemo-resistentie daarin behouden blijft.
- 4 Door de tumorcellen genetisch te markeren met merker genen zoals bijvoorbeeld genen die coderen voor het luciferase gen of fluorescerende eiwitten kan, indien gewenst, de groei met imaging technieken (kwantitatief) worden gemonitored.

Primaire uitkomstparameters (A1)

- 1 na het injecteren van de tumorcellen in de [REDACTED] is de belangrijkste parameter: "tumor groei ja of nee"
- 2 vervolgens worden de groeiende tumor gemeten m.b.v. een schuifmaat: niet alleen om groeisnelheid te bepalen (i), maar mede om op basis van tumorvolume het moment van bereiken van het humane eindpunt te kunnen bepalen en het experiment te kunnen stoppen (ii) en voor het vullen van een biobank (iii).
- 3 uitgebreide analyse van de tumoren, genetisch (whole exome sequencing), met FACS, immuno-histochemie van de tumor in situ, eventueel met CyTOF analyse. Tevens wordt het stroma van de [REDACTED] opgekweekt om te analyseren wat het hebben van interactie met tumorcellen aan genexpressie veranderingen heeft teweeg gebracht. Daarnaast wordt onderzocht wat het gevolg is voor normale hematopoietische stamcellen als deze contact hebben met maligne stroma. Al deze analyses zijn reeds door onze beproefde methoden die routinematig worden uitgevoerd.

A2. De keuze voor dit model voor het onderzoek aan (a) botmetabolisme en (b) stromafunctie in de [REDACTED] is gebaseerd op het volgende:

Het [REDACTED] leent zich bij uitstek voor bot metabolisme (vorming alsmede afbraak) studies en met het type dierproef waar we in dit kader gebruik van maken, kunnen we het proces van osteolyse en osteogenese bij de groei van tumoren volgen. Osteolyse is een van de grote problemen bij multipel myeloom, en middelen om dit te voorkomen zijn zeer gewenst. Ook na effectieve therapie wordt er, hoewel er osteoblasten aanwezig zijn, geen herstel van de botvorming gezien. Door analyse van het MM stroma in het [REDACTED] proberen we daar de oorzaak van te achterhalen en door genetische manipulatie van normale stromale cellen deze verstoorde functie in het [REDACTED] te reproduceren om vervolgens agentia/medicatie toe te dienen die botvorming weer zou kunnen aanzetten.

Ad A2a. De parameter/assay voor het bestuderen van **botvorming** is op zich vrij eenvoudig; stromale cellen vanuit verschillende bronnen (zoals MM beenmerg, of genetisch gemodificeerde normale stromale cellen (om het maligne stroma te simuleren), worden [REDACTED] (soms met tussentijdse medicatie om genexpressie te beïnvloeden) met als **belangrijkste parameter: botvorming/bot afbraak**.

Ad A2b. Voor het onderzoek aan het **stroma** van de [REDACTED] worden stromale cellen geïsoleerd en uitgezaaid op de [REDACTED] en in het [REDACTED] getest.

1. daarbij wordt onderzocht welke functionele veranderingen in de stromale cellen ontstaan als deze in contact komen met multipel myeloom of leukemie tumorcellen, met als doel genen te identificeren die de verstoorde botvorming en verstoorde hematopoïese kunnen verklaren en daardoor een target voor therapie zijn.
2. om de rol van specifieke genen in deze processen te bestuderen worden genen in stromale cellen uitgeschakeld of tot over-expressie gebracht en het effect daarvan op de groei van de tumorcellen (MM en AML), in het [REDACTED] onderzocht.
3. Bij myelodysplastische syndroom (MDS) is één van de vragen of er vanuit stromale cellen uit MDS beenmerg een maligniteit (leukemie/sarcoom) kan ontstaan? Of ontstaat die uit, door MDS stroma-geïnduceerde transformatie uit (wat wij gaan onderzoeken geïnjecteerde) normale HSC's, een leukemie? En welke gen veranderingen, waarmee we dit kunnen verklaren, liggen daar dan aan ten grondslag?
4. Bij myelofibrose (MF) patiënten zijn de vragen: -groeien de stromale cellen van MF patiënten BM uit naar fibrotische niche i.p.v. van naar een normale bot/niche? Treedt er een verandering op in genexpressie van geïnjecteerde (normale) (HSC) bij contact met dit MF stroma?. Transformeren MF-HSC normaal stroma zodat dit pathologisch weefsel wordt? Of transformeert MF stroma normale stamcellen naar leukemie stamcellen.

Voor beide ziektebeelden zijn de **belangrijkste vragen/parameters**.

- ontstaat er leukemie? ontwikkelt zich een tumor? welke gen-veranderingen liggen ten grondslag aan de pathogenese van deze ziekten?

Primaire uitkomstparameters (A2)

- 1 is er tumor uitgroei ja of nee (bij experimenten met "interactie" tussen normaal stroma en maligne cellen of maligne stroma met normale cellen)
- 2 als tweede parameter meting van subcutane tumoren met schuifmaat (om groeisnelheid te bepalen) ter voorkómen van het bereiken van het humane eindpunt.

- 3 als laboratorium parameters, worden de tumoren uitgebreid geanalyseerd, genetisch (whole exome sequencing, WES, gen expressie profilering (GEP), met FACS, immuno-histochemie van de tumor in situ, eventueel met CyTOF analyse van cel suspensies. Tevens zal het stroma van de [REDACTED] worden opgekweekt om te analyseren wat het hebben van interactie met tumorcellen aan genexpressie voor veranderingen heeft teweeg gebracht. Al deze analyses zijn reeds eerder door ons beproefde en toegepast en deze kunnen intussen routinematig worden uitgevoerd.
- 4 voor specifieke experimenten kunnen de cellen met merkgenen worden gemarkeerd (luciferase/GFP of bijvoorbeeld mCherry) en de uitgroei van de gemarkeerde cellen kan dan met bioluminescentie/fluorescentie gevolgd worden; het experiment kan dan gestopt worden op basis van een maximaal signaal (dat gecorreleerd is aan tumorgroei). Dit gebeurt niet standaard omdat we in de regel de uitgroei van "ongestoorde" tumorcellen willen kunnen bestuderen. Het valt niet uit te sluiten dat genetische markering leidt tot selectie. Soms is dat wel acceptabel, soms ook niet; dit hangt af van het beoogde doel van het betreffende experiment.

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

Fase [REDACTED]

1 [REDACTED]

Fase II Injectie met tumorcellen (of normale hematopietische stamcellen in [REDACTED])

- 1 één dag voor injectie met cellen krijgen de dieren een lage dosis totale lichaamsbestraling (1.5Gy X-ray equivalent); dit bevordert een tumor-take in sterke mate.
- 2 onder narcose krijgen de dieren of (i) een transcutane injectie van tumorcellen/ stamcellen; (ii) of ten behoeve van specifieke homings experimenten, een intra cardiale injectie van tumorcellen/stamcellen, of, niet onder narcose maar gefixeerd in een constrainer, een intraveneuze injectie. (nb bij intra cardiale injectie wordt voorkomen dat een groot gedeelte van de tumorcellen al direct in het vaatbed van de longen wordt weggevangen waardoor een specifiek homingsgedrag negatief zou worden beïnvloed.
- 3 de dieren worden geobserveerd voor tumor uitgroei; onze ervaring is dat dit van 4 tot 12 maanden kan duren want, evenals bij patiënten, groeien deze tumoren lang niet altijd snel, zeker niet in aanvang.
- 4 bloedafname: 1x per maand; in eindfase 2 x per maand (enkele druppels, veel minder dan 10% van bloedvolume)
- 5 visuele inspectie voor tumorgroei, elke twee weken, bij tekenen van groei, starten met schuifmaatmeting van de tumoren en het wegen van de dieren.
- 6 voor sommige experimenten waarin de uitgroei van luciferase-gemarkeerde tumorcellen gevolgd moet worden (met name bij de experimenten waarin de stromale cellen in de niche genetisch zijn gemanipuleerd) ondergaan de dieren een bioluminescentie imaging (1x per maand, in eindfase maximaal 1 x per week), die onder isofluraan narcose wordt uitgevoerd in de Phi-imager[®] van Biospace. Hierin verblijven de dieren kort (± 15 minuten) waar ze op een verwarmde tafel gemonitord worden ten behoeve van het maken van een BLI opname (om tumorgroei/afname kwantitatief te kunnen bepalen), nadat ze een injectie met luciferine (substraat voor luciferase) i.p. toegediend hebben gekregen.

n.b.:

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

Een belangrijke overweging bij het inschatten van het aantal dieren dat voor dit onderdeel van het project nodig is, is het gegeven dat van elk van de hoofdtypen hematologische tumoren (te weten AL, MM en MDS en MF) er op grond van overeenkomstige FAB classificatie, (die overigens meer en meer vervangen wordt door genetische classificering) genetisch afwijkende patronen of van FACS-immunofenotype, er verscheidene subgroepen onderscheiden kunnen worden. Om een goed overzicht te krijgen van de karakteristieken van elk van de patiëntengroepen en om een goede representatie van elk van de subtypen in de biobank te krijgen, moeten er per subtype een groot aantal patiënten worden onderzocht. In totaal komen per jaar, alleen al in Nederland, circa 1000 nieuwe patiënten bij (over alle typen hematologische tumoren bij elkaar). Ons streven is om daarvan per jaar gemiddeld 50 patiënten monsters te testen op uitgroei, verdeeld over acute leukemie (AL), multiple myeloom (MM), en de myeloproliferatieve neoplasie (MDS en MF) en de verkregen tumorcellen daarvan aan onze biobank toe te voegen. Onze ervaring is dat de kans dat de tumorcellen van patiënten in het [REDACTED] uitgroeien, is voor AL heel groot ($>95\%$), voor MM iets minder $\pm 60-70\%$; voor MDS $> 50\%$ en voor MF hebben we nog niet voldoende ervaring. Per muis kunnen er maximaal 6 tumoren uitgroeien, maar dat aantal wordt niet altijd gehaald; de uitgroei kan lang duren (tot soms wel 12 maanden) en in de wetenschap dat we onderweg nauwelijks dieren verliezen komen we op een aantal van 3 dieren per patiënt. Ook wanneer er dieren worden gevolgd met bioluminescentie imaging is het aantal van 3 dieren ([REDACTED], niet geheel onafhankelijk uiteraard) een goed aantal gebleken om met statistische voldoende significantie en power, experimenten te kunnen evalueren.

B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levensstadia. Onderbouw deze keuzes.

- Diersoort: muizen, volwassen (vanaf leeftijd 8-9 weken)
Sekse: vrouwelijke dieren. De reden dat alleen vrouwelijke dieren gebruikt worden bij deze experimenten is omdat in het verleden, bij herhaling, is gebleken dat mannelijke dieren na de operatie solitair gehuisvest moesten worden (om de huidwond/hechting te laten herstellen) en als ze meteen of later bij elkaar worden gezet resulteert dit direct ernstige onderlinge gevechten. In het verleden leidde dit óf al in de eerste fase van het experiment óf op een later moment in het experiment tot uitval. Daarbij geeft (langdurige) solitaire huisvesting langdurig ongerief. Dit alles is te vermijden door alleen vrouwelijke dieren voor deze experimenten te gebruiken. Bij het type experimenten dat wij uitvoeren is nooit gebleken dat de sekse van de dieren invloed heeft op de resultaten van het onderzoek. Wij realiseren ons dat dit bij de fok een overschot aan mannelijke dieren oplevert. Deze worden bij de speendatum afgevoerd; er wordt echter wel met een gericht oog gekeken naar mogelijkheden om de mannelijke dieren voor andere studies te gebruiken.
- Stam: RAG2GC-KO
- Herkomst: eigen fok
- Keuze voor deze dieren: omdat deze muizen een immuun defect hebben, beschikken ze niet over T, B of NK cellen, maar wel over myeloïde cellen en macrofagen. Daardoor accepteren ze humane cellen en stoten deze niet af (geldt voor zowel stromale-, endotheel- en tumorcellen) maar ondanks de immuun deficiëntie zijn het zeer sterke muizen, waarbij we zeer weinig uitval zien in experimenten.
- Onderdeel A1: bio-banking
Met gemiddeld 50 te onderzoeken patiënten monsters per jaar, met 3 muizen per monster komt het aantal muizen voor de duur van het project (5 jaar, 150 per jaar) op 750.
- Onderdeel A2: botmetabolisme en stroma functie
A2a. Voor experimenten in het kader van bot metabolisme verwachten we gemiddeld 10 experimenten per jaar uit te voeren en met 6 dieren per experiment) komt het aantal voor de duur van het project (5 jaar, 60 per jaar) op 300 muizen.
A2b. Voor experimenten in het kader van stroma functie/leukemogenese verwachten we gemiddeld 20 experimenten per jaar uit te voeren; met 6 dieren per experiment komt het aantal voor de duur van het project (5 jaar, 120 per jaar) op 600 muizen.
Om deze aantallen dieren te kunnen produceren in de eigen fok zijn 90 muizen per jaar nodig (man en vrouw samen) dus 450 voor de duur van het project van 5 jaar
Voor onderdeel A van het project komt het totaal aantal dieren **2100** voor de looptijd van het project van 5 jaar
De muizen kunnen vanaf een leeftijd van ongeveer 8-10 weken ingezet worden voor de experimenten

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☒ Nee, ga door met vraag D.

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

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

☐ Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging

Voor dit project is het kunnen werken met primair patiënten materiaal essentieel. Na vele tientallen jaren van onderzoek is de situatie nog altijd zo dat van patiënten afkomstige leukemie/myeloom cellen nauwelijks of geen uitgroei vertonen in in vitro kweekomstandigheden. Dit geldt met name voor multipel myeloom cellen; deze groeien nooit uit in vitro. Maar ook voor acute leukemie wordt gerapporteerd dat slechts een beperkt aantal monsters uitgroeien (en dan slechts in co-cultures met ondersteunend stroma). Maar of er in die situaties ook leukemische stamcellen uitgroeien (wat uiteraard een voorwaarde is) wordt ernstig betwijfeld. Het lijkt erop dat de groei beperkt blijft tot de meer uitgerijpte stadia van de leukemiecelpopulatie. Dat past ook wel bij de waarneming dat de gedifferentieerde cellen ook bij patiënten buiten het beenmerg (dus stroma-onafhankelijk) kunnen groeien. Onze ervaring is dat in de gehumaniseerde [REDACTED] zowel de leukemische stamcellen, evenals de rijpere stadia van leukemiecelpopulatie uitgroeien. Dat sluit ook aan bij onze ervaring bij experimenten waarin we zien dat na oncogen-activatie in normale humane hematopoietische stamcellen (HSC) leukemische transformatie naar acute myeloïde leukemie in een muizenbeenmerg omgeving níét plaatsvindt, althans er is geen uitgroei van myeloïde leukemie, maar er ontwikkelen zich uitsluitend acute lymfatische leukemiën. Blijkbaar "ontbreekt" er iets essentieels in de muizen beenmerg/stroma omgeving wat wel aanwezig is in de gehumaniseerde [REDACTED]

Verder is het zo dat experimenten in het kader van botvorming niet in vitro uitgevoerd kunnen worden omdat depositie van bot in vitro niet plaatsvindt. Dit sluit ook de mogelijkheid uit om experimenten m.b.t. osteolyse en het tegengaan daarvan uit te voeren. In het [REDACTED] zijn experimenten m.b.t. zowel botvorming als osteolyse uitvoerbaar. Ook het genetisch aanpassen van de stroma omgeving en het bestuderen van de invloed daarvan op de uitgroei van primair patiënten materiaal is niet in vitro uitvoerbaar. Op grond van bovenstaande argumenten is de conclusie dat er voor dit type in vivo experimenten geen vervanging mogelijk is.

Vermindering

Door het plaatsen van 6 [REDACTED] in één muis (met 3 muizen per experiment voor onderdeel A van het project: karakterisering/biobanking en botmetabolisme) kunnen er per muis meerdere waarnemingen worden gedaan met betrekking tot uitgroei van tumoren en botvorming. Tegelijkertijd kunnen er binnen hetzelfde experiment, in voldoende mate tumorcellen worden geëxpandeerd voor bio banking van materiaal ten behoeve van vervolgonderzoek.

Verfijning:

Primaire myeloom monsters groeien niet in muizen weefsels, ook niet in muizenbot, daarom geeft het laten uitgroeien van primair myeloma materiaal in een subcutaan aanwezige [REDACTED] omgeving voor de dieren minimaal ongerief. Ook de uitgroei van tumoren van acute leukemie en de andere typen beenmergtumor in dit project, myelodysplasie en myelofibrose op een subcutane locatie geeft minder ongerief dan wanneer de tumoren in de organen c.q. botten van de muizen groeien (wat na een intraveneuze injectie wel kan gebeuren) omdat dit gepaard kan gaan met orgaanvergroting van bijvoorbeeld milt, lever, ovaria) en dat dan wel meer ongerief kan geven. Het gebruik van het [REDACTED] kan als verfijning worden aangemerkt.

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

Op alle relevante momenten in het experiment wordt actie ondernomen om pijn, lijden of angst te verminderen door:

- het plaatsen van de [REDACTED] geschiedt terwijl de dieren onder narcose zijn; direct na de operatie wordt een antagonist toegediend, gecombineerd met pijnstilling en de dieren komen bij op een warmtemat. De eerste dagen na de implantatie worden de hechtingen gecontroleerd totdat geconstateerd wordt dat de operatiewond is genezen;
- de injectie van tumorcellen [REDACTED] c.q. intra-cardiaal) geschiedt onder narcose;
- het meten van de tumoren geschiedt doorgaans met twee personen zodat dit snel en efficiënt kan plaatsvinden;
- bloedafname is door middel van handfixatie en wangprik, hetgeen als een van de minst belastende methoden wordt beschouwd.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

Deze dierproeven zijn niet eerder uitgevoerd. De patiënten samples die wij in de experimenten testen zijn uniek en worden niet ook elders getest. Het gehumaniseerde [REDACTED] model zelf is uniek en er is nogal wat specifieke ervaring voor nodig om dit met succes toe te passen. Die is in onze groep aanwezig, aangezien we dit model zelf ontwikkeld hebben. Op enkele laboratoria in het buitenland wordt het model ook gebruikt, maar dat is dan in samenwerking met ons en de onderzoeken zijn op elkaar afstemd zodat er geen onnodige duplicaties voorkomen.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

☒ Nee

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

gf

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

☒ Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

☐ Nee > Ga verder met vraag I.

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

☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

Pijn zou kunnen optreden als gevolg van de operatie waarbij via maximaal drie huid-incisies subcutaan [REDACTED] worden geïmplant. Deze procedure geschiedt onder narcose en wordt al vele jaren, met goede ervaringen, door ons toegepast. Na de operatie en als de huid is gehecht wordt er, indien van toepassing, een antagonist toegediend, met post-operatieve pijnstilling. Tijdens het herstel van de operatie staan de dieren op een verwarmde mat.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Uitgroei van tumoren bij de [REDACTED] subcutaan

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Uitgroei van tumoren bij de [REDACTED] subcutaan

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

Op de plaatsen waar de [REDACTED] zijn geïmplant en waarin de tumorcellen zijn geïnjecteerd of naar toe zijn gemigreerd, is de verwachting dat er tumoren zullen gaan groeien. Dit is ook het doel van het experiment. Het patroon van uitgroei van tumoren in en bij de [REDACTED] (mogelijk vanaf week 4, meestal later), is niet goed te voorspellen omdat elke patiënt anders kan zijn (in feite anders is). In muizenweefsels groeien patiënten leukemie - myeloom cellen niet.

In de eerste periode is er een twee-wekelijks visuele inspectie. Zodra er tumorgroei zichtbaar wordt (als "bobbeltje"), gaan onderzoekers afhankelijk van snelheid van groei eenmaal per 1 á 2 weken de tumoren opmeten.

J. Humane eindpunten

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

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

☒ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Hiervoor hanteren we het volume van de tumoren. In de loop van het experiment zullen er naar verwachting tumoren ontstaan bij de [REDACTED] Zodra tumoren duidelijk groter worden, worden de afmetingen daarvan met een schuifmaat bepaald.

Humaan Eind Punt:

Tumor volume mag maximaal, met correctie voor de [REDACTED] en huid 1,3 cm³ bedragen. De formule die gehanteerd wordt voor volume berekening is $\text{volume} = \pi \times 6(L \times B \times H)$ referentie Tomayko, M. M., & Reynolds, C. P. (1989).

Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. Cancer Chemother and Pharmacol 24(3), 148-154).

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

Door goed te monitoren en tijdig actie te ondernemen kan voorkomen worden dat de dieren om redenen van het bereiken van het humane eindpunt gedood moeten worden.

K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

Ongerief: **matig**".

Einde experiment

L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

☐ Nee

☒ Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

Zodra de dieren een tumor hebben ontwikkeld die voldoende tumorcellen bevat om in te kunnen analyseren en op te slaan in de biobank is het einddoel van het experiment bereikt en geslaagd.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

☐ Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

☒ Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11400				
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUMC), Amsterdam				
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in. <i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>	<table><tr><th>Volgnummer</th><th>Type dierproef</th></tr><tr><td>2</td><td>Therapie ontwikkeling in het hu [REDACTED] muis model; chemotherapie en/of immuno-chemo-combinatietherapie in relatie tot resistentie, clonale evolutie/"clonale getijden"</td></tr></table>	Volgnummer	Type dierproef	2	Therapie ontwikkeling in het hu [REDACTED] muis model; chemotherapie en/of immuno-chemo-combinatietherapie in relatie tot resistentie, clonale evolutie/"clonale getijden"
Volgnummer	Type dierproef					
2	Therapie ontwikkeling in het hu [REDACTED] muis model; chemotherapie en/of immuno-chemo-combinatietherapie in relatie tot resistentie, clonale evolutie/"clonale getijden"					

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

In dit type dierproef ligt de focus op het testen en ontwikkelen van nieuwe behandelingsmogelijkheden voor klinische toepassing bij patiënten met hematologische maligniteiten. Er wordt onderzoek gedaan naar de oorzaken en de kenmerken van therapie resistentie en hoe deze te doorbreken is door óf een alternatieve chemotherapie, óf door behandeling met monoclonale antilichamen óf met cellulaire immuuntherapie óf met een combinatie van deze. Wat in dit opzicht speciaal door ons onderzocht wordt is in hoeverre het type behandeling invloed heeft op de multilokalen samenstelling waardoor de meeste tumorcelpopulaties bij de patiënten door gekenmerkt worden en in hoeverre de "clonale getijden" zich voordoen (of mogelijk onderdrukt worden, door de toegepaste therapie (zie ook de bijlagen: Schematisch overzicht "Principe van de behandeling").

De **keuze** voor het [REDACTED] bij dit onderdeel van het project is met name gebaseerd op het gegeven dat in dit model tumorcellen van patiënten van onze doelgroep (acute leukemie, multipel myeloom, myelodysplasie en myelofibrose, engraften en uitgroeien, én waarbij de tumorcellen dezelfde kenmerken behouden als die in de patiënten ook hadden. Dit biedt de mogelijkheid om de oorspronkelijke tumorcelpopulaties in hun "natuurlijke omgeving" te testen. (zie ook de bijlagen: artikel in Biotechniek, 2013).

Globale aanpak bij de experimenten met chemotherapie:

Muizen krijgen subcutaan met stamcellen [REDACTED] geplaatst.

Enige tijd later (na minimaal 6- 8 weken) worden van de patiënt afkomstige tumorcellen hierin geïnjecteerd.

De uitgroei van tumoren wordt gevolgd door regelmatig visuele inspectie en door bloedanalyse.

Als er tumorgroei geconstateerd wordt, of volgens een vooraf bepaald schema, krijgen de dieren een therapie toegediend, dit kan zijn eerst een "standaard therapie", in het Engels "standard-of-care, SoC" (die in beginsel bestaat uit dezelfde medicatie als waar de cellen in de patiënt aan waren blootgesteld), gevolgd door een experimentele therapie. Deze kan zijn: (i) chemotherapie; (ii) immuuntherapie met monoclonale antilichamen; (iii) cellulaire immuuntherapie of (iv) combinatie immuun en/of chemotherapie. De (combinatie) therapieën die in het [REDACTED] worden getest, zijn qua opzet vergelijkbaar met wat op een later moment klinisch zal worden toegepast.

Primaire uitkomstparameters

- 1 de meest relevante parameter is remming van tumorgroei, in eerste instantie door de chemotherapie (Standard of Care (SoC)) en hoe deze verder wordt gereduceerd door de aanvullende (experimentele) therapie d.m.v. het meten van subcutane tumoren met schuifmaat (om groeisnelheid te bepalen) en mede om zodoende vóór het bereiken van het humane eindpunt het experiment te kunnen stoppen
- 2 als laboratorium parameters, worden de tumoren post mortem, uitgebreid geanalyseerd, genetisch (whole exome sequencing), met FACS, immunohistochemie van de tumor in situ, eventueel met Stof analyse. Tevens kan het stroma van de [REDACTED] worden opgekweekt om te analyseren wat het hebben van interactie met tumorcellen aan genexpressie veranderingen heeft teweeg gebracht. Al deze analyses zijn reeds door onze beproefde methoden, die routinematig worden uitgevoerd.
- 3 voor specifieke experimenten kunnen de tumorcellen met merker-genen worden gemarkeerd (luciferase/GFP of bijvoorbeeld mCherry) en de uitgroei van de gemarkeerde cellen kan dan met bioluminescentie/fluorescentie gevolgd worden; het experiment kan dan gestopt worden op basis van een maximaal signaal (dat gecorreleerd is aan tumorgroei/tumor grootte). De experimenten worden niet standaard met gemarkeerde cellen uitgevoerd, omdat we in de regel de uitgroei van "niet-gemanipuleerde" tumorcellen willen kunnen bestuderen. Het valt niet uit te sluiten dat genetische markering tevens leidt tot selectie. Soms is dat wel acceptabel, soms ook niet; dit hangt af van het beoogde doel van het betreffende experiment.
De experimenten worden uitgevoerd met immuun-deficiënte muizen (RAG2GC KO) omdat deze humane cellen niet afstoten en zich bewezen hebben voor dit type onderzoek.

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

Fase I:

1. terwijl muizen onder narcose zijn worden ze eerst geschoren en daarna worden er maximaal drie incisies gemaakt, in de huid, op het midden van de rug
2. aan weerszijden wordt een "subcutane pocket" gemaakt waarin met stromale stamcellen [REDACTED] (2x3 mm) worden geschoven (max 6 per muis).
3. de huid wordt gehecht en indien relevant wordt een narcose antagonist in combinatie met post-operatieve pijnstilling toegediend.

Fase II.

4. als voorbereiding op de injectie van tumorcellen krijgen de dieren 1 dag van tevoren een totale lichaamsbestraling met een lage dosis (1,5 Gy) X-ray equivalent. Dit bevordert het "aanslaan" en de uitgroei van de tumor; hierna worden de dieren 2-wekelijks geobserveerd voor tumor uitgroei en zodra er tekenen zijn van groei, wordt met de schuifmaat de grootte/groei daarvan bepaald; in het geval dat de tumorcellen gemarkeerd zijn met luciferase/fluorescerende eiwitten, wordt optical imaging gebruikt om de tumorgroei en response te monitoren.
5. vanaf 4 - 8 weken na injectie van tumorcellen krijgen de dieren chemotherapie; afhankelijk van het middel wordt dit meer of minder frequent toegediend, volgens bekende injectie routes; bij voorkeur i.p. of subcutaan en volgens doseringen en schema's die in de literatuur als effectieve en getolereerde doseringen zijn beschreven. De doseringen die worden toegediend zijn sublethaal: d.w.z. de maximaal getolereerde dosis (MTD) of lager.
6. de dieren krijgen ofwel de SoC behandeling gevolgd door een experimentele therapie (ofwel chemotherapie, of immunotherapie met monoclonale antilichamen, of cellulaire immunotherapie, of combinaties van deze).

Behandelingen met chemotherapie/immunotherapie en de onderbouwing daarvan

De behandeling die wordt toegediend verschilt per type tumor; zo is de standaardtherapie voor muizen waarin **Acute Leukemie (AL)** groeit, de combinatie van cytosine arabinoside (Ara-C) en doxorubicine (Doxo, volgens een schema van 5 dagen Ara-C + 3 dagen doxorubicine (referentie Wunderlich Blood. 2013 21;121(12). Tijdens de therapie wordt de algehele conditie van de dieren beoordeeld en het lichaamsgewicht wordt bepaald als indicatie voor de gezondheidstoestand van het dier.

- Muizen waarin **multipel myeloom (MM)** groeit krijgen ook dezelfde medicatie als patiënten krijgen toegediend; bij MM kan dat nogal variëren en dat kan zijn melphalan, dexamethason, cyclofosfamide, lenalinomide, pomalidomide of bortezomib (respectievelijk alkyliserende agentia, IMiDs (immunomodulerende drugs) of proteasoom remmers)
- Muizen waarin tumorcellen van **myelodysplasie (MDS)** patiënten groeien krijgen een behandeling met methyltransferase remmers, zoals decytabine (dacogen)
- Bij **myelofibrose (MF)** patiënten is de behandeling afhankelijk van het ziekteverloop. Momenteel worden MF patiënten steeds vaker met specifieke JAK-2 kinase remmers behandeld. Deze behandeling is, weliswaar tijdelijk, zeer effectief, maar niet genezend. MF evolueert frequent naar een AML die dan, ook in onze muizen, met AML schema behandeld gaat worden (Ara-C en Doxorubicine 5+3), waarna experimentele therapie volgt.

In het vervolgtraject krijgen de muizen experimentele therapie toegediend, die erop gericht is om de resistente tumorcellen in de fase van Minimale Residuele Tumorload (MRT) te elimineren. De experimentele therapeutica die worden onderzocht in het [REDACTED] bevinden zich in een translationeel ontwikkeltraject en waarvoor geldt dat bij bewezen effectiviteit in het [REDACTED] dit er aan kan bijdragen om deze middelen voor patiënten beschikbaar te krijgen. Therapeutica die op dit moment op ons programma staan zijn o.a. compounds die uit in vitro screeningsprogramma's als veelbelovend te voorschijn komen (in totaal werden 180,000 compounds gescreend waarvan uiteindelijk enkele tientallen geselecteerd worden voor in vivo testen), telomeraseremmers, nieuw geïdentificeerde monoclonale antilichamen tegen tumorspecifiek antigenen, en soms genetisch aangepaste immuuncompetente cellen (waaronder bijvoorbeeld CAR-T, CTL, NK of CAR-NK, etc).

De monoclonale antilichamen worden 1 x per week, of 1 x per 2 weken toegediend (hangt af van de halfwaardetijd in

bloed); chemotherapeutica die op specifieke targets in de tumorcellen aangrijpen (zoals bijvoorbeeld kinase remmers of epigenetische effecten hebben) worden in het algemeen in één of meer cycli van 5 dagen éénmaal daags toegediend via intraperitoneale injecties. Bij cellulaire immuuntherapie worden de cellen via intraveneuze injecties toegediend. In alle gevallen worden de MTD dosering of lager toegepast; lethale doseringen worden niet toegediend.

De groei van de tumorcellen wordt zowel bij de controledieren als de behandelde dieren gemonitord (visuele inspectie, schuifmaatmetingen en bloedmonsteranalyse). Zodra een tumor duidelijk is gegroeid of na een aanvankelijke reactie op de toegediende therapie weer is gaan groeien volgt euthanasie en worden de tumoren, met verschillende analysetechnieken in het laboratorium onderzocht. Euthanasie wordt toegepast zodra het bereiken van een humane eindpunt zich aankondigt (in dit geval een maximaal tumorvolume van $\pm 1,3 \text{ cm}^3$). Daarna wordt er tumormateriaal en muizenweefsels verzameld om daarin (i) de aanwezigheid en de verhouding van de verschillende (sub-) clones in te bepalen,, (ii) het genexpressie patroon wordt bepaald (whole exoom sequentie analyse); (iii) er wordt gekeken met CytoF analyse naar celoppervlak kenmerken en (iv) en met CyToF welke van de bekende intracellulaire signaleringsroutes actief zijn. Hierbij zullen de analyse resultaten van de tumorcellen van de behandelde dieren vergeleken worden met die van de controle dieren. Uit al deze gegevens verwachten we te kunnen analyseren op basis waarvan de tumorcellen resistent zijn voor de toegediende therapie, of we er wel of niet in geslaagd zijn om deze te doorbreken en of de immuuntherapie met antilichamen en/of cellulaire therapie effectief is bij chemo-resistente tumorcellen.

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

Bij het bepalen van het aantal dieren dat er voor de hier beschreven experimenten nodig is hebben we de volgende overwegingen. We beschouwen een therapie "effectief" als er een afname is van meer dan 40% in tumorload, maar een effectieve therapie kan ook leiden tot een afname tot beneden 1% of zelfs daaronder. (nb om leukemie te genezen moet er bij patiënten meer dan 10^{11} tumorcellen (11 decaden) en bij een muis met redelijk grote tumoren al snel 10^9 tumorcellen (9 decaden) worden geëlimineerd; (1 % is 2 decaden, 0,01% is 4 decaden).

Een statistische power analyse vooraf, leert ons dat om dergelijke grote verschillen met voldoende "power" te kunnen waarnemen er niet veel dieren per groep nodig zijn; 4 dieren is daarvoor genoeg. Bovendien hebben de dieren op maximaal 6 plaatsen een [REDACTED] met tumor, hetgeen (hoewel niet geheel onafhankelijk) tot 24 waarnemingen per experimentele groep mogelijk maakt. Aan de andere kant moge het duidelijk zijn dat als een tumor resistent is voor een bepaalde behandeling er geen verschil tussen de groepen verwacht wordt; ook hiervoor zijn niet veel dieren per groep nodig en kan ook in die gevallen met 4 dieren per groep worden volstaan.

Ook wanneer dieren worden gevolgd met bioluminescentie imaging is het aantal van 4 dieren een goed aantal gebleken om met voldoende statistische significantie en power experimenten te kunnen evalueren. Met BLI kunnen de tumoren in de afzonderlijke [REDACTED] worden gemeten hetgeen het aantal meetpunten per dier/groep maximaal 24 brengt, hetgeen de power van het analyse resultaat doet toenemen.

Bij toepassing van BLI om tumor response te meten is het effect zelfs over een range van 3-4 decaden prima te volgen (factor duizend tot 10-duizend tumorgroei vanaf threshold van $\pm 50,000 \text{ luc+}$ cellen per [REDACTED]).

Voor het inschatten van het aantal dieren per experiment groep is een poweranalyse uitgevoerd met het programma StatMate 2.0 (onderdeel van GraphPad Prism), bijgevoegd (zie bijlagen).

B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levensstadia. Onderbouw deze keuzes.

Diersoort: muizen, volwassen (vanaf leeftijd 8-9 weken)

Sekse: vrouwelijke dieren. De reden dat alleen vrouwelijke dieren gebruikt worden bij deze experimenten is omdat in het verleden, bij herhaling, is gebleken dat mannelijke dieren na de operatie solitair gehuisvest moesten worden (om de huidwond/hechting te laten herstellen) en als ze meteen of later bij elkaar worden gezet resulteert dit direct ernstige onderlinge gevechten. In het verleden leidde dit óf al in de eerste fase van het experiment óf op een later moment in het experiment tot uitval. Daarbij geeft (langdurige) solitaire huisvesting langdurig ongerief. Dit alles is te vermijden door alleen vrouwelijke dieren voor deze experimenten te gebruiken. Bij het type experimenten dat wij uitvoeren is nooit gebleken dat de sekse van de dieren invloed heeft op de resultaten van het onderzoek. Wij realiseren ons dat dit bij de fok een overschot aan mannelijke dieren oplevert. Deze worden bij de speendatum afgevoerd; er wordt echter wel met een gericht oog gekeken naar mogelijkheden om de mannelijke dieren voor andere studies te gebruiken.

Herkomst: eigen fok

Stam: RAG2GC-KO

Keuze voor deze dieren: omdat deze muizen een immuun defect hebben, beschikken ze niet over T, B of NK cellen, maar wel over myeloïde cellen en macrofagen. Daardoor accepteren ze humane cellen en stoten deze niet af (geldt voor zowel stromale-, endotheel- en tumorcellen) maar ondanks de immuun deficiëntie zijn het zeer sterke muizen, waarbij we zeer weinig uitval zien in experimenten.

Aantallen dieren:

Voor deel B van het project (dierproef type 2) zullen er per jaar gemiddeld 25 experimenten worden uitgevoerd, verdeeld over de verschillende hematologische tumortypen, chemotherapie experimenten, immunotherapie experimenten en combinaties daarvan. Per experimentele groep worden 4 muizen gebruikt; het aantal experimentele groepen per experiment loopt uiteen van 2 tot 8 (afhankelijk van het aantal variabelen dat binnen 1 experiment getest wordt); maar

met een gemiddeld aantal van 4 groepen per experiment leidt dit tot gemiddeld 400 muizen per jaar en tot een totaal van 2000 muizen voor de looptijd van dit project van 5 jaar. Om deze aantallen dieren te kunnen produceren in de eigen fok zijn 110 muizen per jaar nodig (man en vrouw samen) dus 550 voor de duur van het project van 5 jaar.
Het totaal aantal dieren voor deel B van het project komt op **2550** dieren voor de looptijd van dit project van 5 jaar.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☒ Nee, ga door met vraag D.

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

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

☐ Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging

Op de eerste plaats is het voor de experimenten die in dit deel van het project beschreven zijn, essentieel om te kunnen werken met primair patiënten materiaal. Zoals al bij het type 1 dierproef is betoogd is het niet mogelijk om primaire cellen van patiënten in vitro te laten groeien. Daarvoor is het [REDACTED] wel uitermate geschikt voor gebleken. Nu is het wel zo dat het ontwikkelen van nieuwe therapeutica voor de behandeling van hematologische tumoren start met een in vitro traject waarbij aan de hand van in vitro experimenten nieuwe middelen (chemotherapeutica, monoclonale antilichamen of tumor specifieke immuun competente cellen) worden gezocht, gemaakt of ontwikkeld, met de bedoeling om deze klinisch te gaan toepassen. Maar het in vitro creëren van de condities waarin de tumorcellen zich in vivo bevinden (bot+stroma+bloedvaten) is technisch (nog) niet mogelijk. Toch is dat van groot belang omdat het in de laatste jaren duidelijk is geworden dat fenomenen zoals ontstaan van resistentie van de tumorcellen voor chemotherapie en ook voor immuuntherapie, voor een belangrijk gedeelte mede door omgevingsfactoren wordt bepaald. Dit betreft dan (voor de hematologische tumoren) de beenmerg-stroma-bloedvat omgeving waarin de tumorcellen zich bevinden en waar de chemotherapie en immuuntherapie effectief moeten zijn. Hier bevinden zich ook de plaatsen waar de tumorcellen "ontsnappen" aan de therapie en resistent worden.

Het in vitro scheppen van deze condities is vooralsnog niet mogelijk; natuurlijk kunnen tumorcellen samen met stroma worden gekweekt, soms zelfs in 3-D systemen, maar het "levend" houden van primaire cellen in dergelijke systemen is (tot op heden) niet mogelijk gebleken. Hier wordt uiteraard wel onderzoek aan gedaan. Ook wijzelf zijn bezig met het ontwikkelen van een 3-D in vitro systeem, en tegelijk met het uitvoeren van experimenten in ons in vivo model proberen we dit 3-D systeem te valideren; want alleen een gevalideerd systeem is een reëel proefdier-vervangend model systeem. Zolang het nog niet zover is, is het in [REDACTED] model dat wij ontwikkeld hebben, voorlopig het meest geschikte model om therapie-resistentie en het doorbreken daarvan te onderzoeken, omdat het condities oplevert die meest dicht in de buurt komen van de tumoromgeving bij patiënten.

De kracht van het door ons gebruikte [REDACTED] is dat tumorcellen getest kunnen worden terwijl deze zich in vergelijkbare omstandigheden bevinden als waarin ze bij patiënten aanwezig zijn. Daar komt bij, dat bepaalde vormen van immuuntherapie, zoals antilichaam therapie en cellulaire therapie vragen om een intact organisme (complement-effector cellen-bloedcirculatie) waarin de omgevingscomponent zoals endotheel, stroma, bot etc. aanwezig zijn. Op grond van bovenstaande argumenten is conclusie dat er voor dit type in vivo experimenten geen vervanging mogelijk is.

Vermindering

Het gebruik van het [REDACTED] voor de experimenten die gericht zijn op therapieontwikkeling leidt ertoe dat er minder dieren nodig zijn om toch met voldoende power data te kunnen verkrijgen om de effecten van de toegediende therapie te kunnen evalueren. De reden hiervoor is dat door het plaatsen van meerdere [REDACTED] per muis (maximaal 6), het aantal waarnemingen dat gedaan kan worden met 4 dieren per groep ([REDACTED] voldoende statische power om relevante verschillen tussen de experimentele groepen te kunnen vaststellen. In andere muizenmodel experimenten waar met één intraveneuze injectie van leukemiecellen per muis wordt gewerkt zou het aantal dieren per groep aanzienlijk groter moeten zijn (omdat er maar 1 data punt per muis beschikbaar komt) om met dezelfde power relevante verschillen tussen de groepen te kunnen vaststellen.

Verfijning:

In standaard tumor diermodellen wordt vaak gewerkt met muizen tumoren, of met humane cellijnen in immuundeficiëntie muizen omdat primaire cellen doorgaans niet in muizen uitgroeien. Daardoor wordt het moeilijker om de vertaalslag naar de patiënt te maken. Doordat onze experimenten gedaan worden in een gehumaniseerde omgeving, waarin de cellen van individuele patiënten getest kunnen worden, kunnen de resultaten daarvan veel directer vertaald worden naar klinische toepassing

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

Op alle relevante momenten in het experiment wordt actie ondernomen om pijn, lijden of angst te verminderen of tot een minimum te beperken, met name:

- het plaatsen van de [REDACTED] geschiedt terwijl de dieren onder narcose zijn; direct na de operatie wordt een antagonist toegediend, gecombineerd met pijnstilling en de dieren komen bij op een warmtemat. De eerste dagen na de implantatie worden de hechtingen gecontroleerd totdat geconstateerd wordt dat de operatiewond is genezen;
- de injectie van tumorcellen geschiedt onder narcose;
- het meten van de tumoren met een schuifmaat, geschiedt doorgaans met twee personen zodat dit snel en efficiënt kan plaatsvinden; er is een duidelijk HEP gedefinieerd
- bloedafname is door middel van wangprik met handfixatie, hetgeen als een van de minst belastende methoden wordt beschouwd
- bij experimenten die met optical imaging worden vervolgd worden de dieren onder isofluraan narcose, liggend op een verwarmd plateau, gemeten
- bij euthanasie worden de dieren met koolzuurgas gedood en worden de [REDACTED] met de tumoren en overige weefsels verzameld voor verder onderzoek.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

Het gehumaniseerde [REDACTED] model is door ons zelf ontwikkeld en er is nogal wat specifieke ervaring voor nodig om dit met succes toe te gebruiken. Die ervaring is ruimschoots in onze groep aanwezig. Op enkele laboratoria (een in Nederland en twee laboratoria in het buitenland) wordt het model ook gebruikt, maar dat is dan in samenwerking met ons en de onderzoeken zijn op elkaar afstemd, zodat er geen onnodige duplicaties voorkomen. Deze dierproeven zijn niet eerder uitgevoerd. De patiënten samples die wij in de experimenten testen zijn uniek en worden niet ook elders getest. In ons programma worden weliswaar vergelijkbare experimenten uitgevoerd, maar dit betreft dan altijd óf een nieuwe patiënt die getest wordt, óf er wordt een nieuw middel in dezelfde proefopzet getest. Tussen patiënten bestaan er veel overeenkomsten maar ook veel verschillen. Om deze beide te kunnen definiëren moeten er toch behoorlijk veel patiënten getest worden. Van de toch grote aantallen patiënten bij wie de ziekte zich openbaart testen wij nog een beperkt aantal, maar wel zoveel dat we tot duidelijke conclusies kunnen komen, met betrekking tot de doelstellingen van de verschillende experimenten.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

☒ Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

☒ Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

☐ Nee > Ga verder met vraag I.

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

☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

Pijn zou kunnen optreden als gevolg van de operatie waarbij via max. drie huid-incisies subcutaan [REDACTED] worden geïmplant. Deze geschiedt onder narcose en wordt al vele jaren, met goede ervaringen, door ons toegepast. Na de operatie en als de huid is gehecht wordt er indien van toepassing een narcose antagonist toegediend; in combinatie met postoperatieve pijnbestrijding. Tijdens het herstel van de operatie staan de dieren op een verwarmde mat.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Bij de dieren die voor experimenten worden ingezet voor studies groeien de humane tumorcellen vrijwel uitsluitend in de gehumaniseerde [REDACTED]. De muizen hebben dus subcutane tumoren, maar geen groei van tumorcellen in de muizenorganen, en daardoor geeft dit geen aanvullend ongerief.

De dieren krijgen gedurende een bepaalde periode chemotherapie. Dit verschilt per experiment type, maar kan enkele weken duren.

Aangezien chemotherapie ook bij de patiënt ongerief geeft, geeft dit ook bij de muizen ongerief. Bij immuuntherapie zal dit (omdat dit geen bijwerkingen kent) veel minder het geval zijn dan bij cytostatica behandeling.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Het ontstaan van tumoren is het beoogde/verwachte resultaat van het experimenten die worden gedaan. Deze tumoren groeien/ontstaan alleen op die plaatsen waar de [REDACTED] zijn geïmplant of waarin tumorcellen zijn geïnjecteerd of waar ze naar toe migreren. Uitgroei van tumoren in muizenweefsels komt bij multipel myeloom niet voor en als er groei is van leukemie tumoren kan groei elders plaatsvinden, is meestal beperkt tot voornamelijk beenmerg en soms milt; en meestal alleen tijdens eindstadium van de ziekte.

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

Het patroon van uitgroei van tumoren in en bij de [REDACTED] (zelden vóór week 4, meestal later), is niet goed te voorspellen, omdat elke patiënt anders is (kan zijn). In de eerste periode is er een tweewekelijkse visuele inspectie. Zodra er tumorgroei zichtbaar wordt (als "bobbeltje"), gaan onderzoekers afhankelijk van snelheid van groei 1 maal per 2 weken de tumoren opmeten (in latere fase elke week) om tijdig te kunnen ingrijpen als de tumoren te groot dreigen te worden. Daarvoor is als humaan eindpunt (tumor volume) gedefinieerd. In experimenten waarin met luciferase gemarkeerde tumorcellen wordt gewerkt, wordt de groei van de tumorcellen met bioluminescentie imaging gevolgd.

J. Humane eindpunten

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

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

☒ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Hiervoor hanteren we het volume van de tumoren. In de loop van het experiment zullen er naar verwachting tumoren ontstaan bij de [REDACTED]. Zodra tumoren duidelijk groter worden, worden afmeting met schuifmaat bepalen. Humaan Eind Punt: Tumor volume mag maximaal 1 cm³ cc worden (met correctie voor de [REDACTED] en huid van 1,3 cm³); de formule die gehanteerd wordt voor volume berekening is $\text{volume} = \pi \times 6 (L \times B \times H)$ referentie Tomayko, M. M., & Reynolds, C. P. (1989). Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 24(3), 148–154)

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

Door goed te monitoren en tijdig actie te ondernemen kan voorkomen worden dat de dieren om redenen van het bereiken van het humane eindpunt gedood moeten worden.

K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

Ongerief: "matig"

Einde experiment

L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

☐ Nee

☒ Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

Aan het einde van het experiment worden de dieren gedood om post mortem de tumoren die in de [REDACTED] zijn gegroeid te kunnen analyseren.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

☐ Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

☒ Ja

Poweranalyse voor studies in het kader van onderdeel B.

Chemotherapie en/of immuno-chemo combinatietherapie in relatie tot resistentie, clonale evolutie/"clonale getijden" (dierexperiment type 2).

Uitgangspunt:

Het doel is om met de toegediende chemo- of immuno- of combinatie therapie een relevante reductie in tumorgroei te realiseren ten opzichte van de tumorload in de controle dieren. Die reductie moet minimaal 40% bedragen*.

Hiervoor is een analyse is ingevoerd m.b.v. GraphPad StatMate 2.0a, onderdeel van GraphPad prism software.

Your choices:

Test chosen: Sample size for unpaired t test

Expected SD of each group = 20

Significance level (alpha) = 0.05 (two-tailed)

You requested a detailed explanation for N = 4 and 80% power.

Assume that the true difference between means is 46.81. Now imagine that you perform many experiments, with N = 4 per group in each experiment. Due to random sampling, you won't find that the difference between means equals 46.81 in every experiment. Instead, you'll find that the difference between means will be greater than 46.81 in about half the experiments, and less than 46.81 in the other half.

In 80 % (the power) of those experiments, the P value will be less than 0.05 (two-tailed) so the results will be deemed 'statistically significant'. In the remaining 20 % of the experiments, the difference between means will be deemed "not statistically significant", so you will have made a Type II (beta) error.

Summary: A sample size of 4 in each group has a 80 % power to detect a difference between means of 46.81 with a significance level (alpha) of 0.05 (two-tailed).

Alternative explanation using confidence interval:

If you perform many experiments with N = 4 in each group, you expect that in 80 % of these experiments (the power) the width of the 95 % confidence interval for the difference between means will extend 46.81 or less in each direction. In the remaining 20 % of the experiments, you will expect the 95 % confidence interval to be wider than that.

Table of tradeoffs:

For any combination of sample size (N) and power, this table shows the difference between means that can be detected.

N per group	Power		
	90%	85%	80%
2	100.13	92.56	86.54
3	67.34	62.25	58.20
4	54.16	50.07	46.81
6	41.51	38.37	35.87
8	34.94	32.29	30.20
12	27.78	25.68	24.01
16	23.75	21.96	20.53
24	19.16	17.71	16.56

Conclusie:

Opzet experiment met 4 dieren (met [REDACTED]) per groep:

Een reductie in tumorgroei van 40% is waarneembaar.

Als we kijken naar individuele [REDACTED] [REDACTED], 24 in totaal) als waarneming dan is een verschil van 18 % nog met 80% power vast te stellen.

*: Onze eerdere studies hebben laten zien dat een 40% reductie bij therapie gevoelige tumoren goed haalbaar is (soms is de afname nog heel veel groter); bij therapie resistente tumoren zal de afname (per definitie) veel minder zijn, maar dat is met 4 dieren (met max [REDACTED]) goed aantoonbaar.



Format

Projectvoorstel dierproeven

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

1 Algemene gegevens

- | | |
|--|---|
| 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in. | 11400 |
| 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in. | Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUMC) Amsterdam |
| 1.3 Vul de titel van het project in. | Pathofysiologie en therapie ontwikkeling voor hematologische maligniteiten (leukemie, myeloom, myelodysplasie, myelofibrose) |

2 Categorie van het project

- | | |
|--|---|
| 2.1 In welke categorie valt het project.

<i>U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.</i> | ☒ Fundamenteel onderzoek |
| | ☒ Translationeel of toegepast onderzoek |
| | ☐ Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie |
| | ☐ Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de |
| | ☐ Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort |
| | ☐ Hoger onderwijs of opleiding |
| | ☐ Forensisch onderzoek |
| | ☐ Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven |

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

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

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

Achtergrond.

De hematologische tumoren van het beenmerg zoals acute leukemie (AL), het multipel myeloom (MM, oftewel ziekte van Kahler), en de myeloproliferatieve neoplasie (MPN) myelodysplasie (MDS) en myelofibrose (MF) zijn moeilijk te genezen ziekten, waaraan nog altijd meer dan 50% van de acute leukemie patiënten en meer dan 90 % van de myeloma patiënten binnen een periode van 2 tot 5 jaar na het ontdekken van de ziekte, zal overlijden. Bij de myeloproliferatieve neoplasias (MDS en MF) treedt er na een kortere of langere periode van een verstoorde bloedcelproductie vaak een evolutie of transformatie op naar een acute leukemie. De behandeling die de patiënten krijgen hangt af van velerlei factoren; zo speelt het type tumor en de genetische afwijkingen waardoor deze gekenmerkt worden een rol, maar ook het stadium van ziekte waarin de patiënt zich bevindt, leeftijd en conditie van de patiënt enzovoorts. In het algemeen geldt, dat patiënten met hematologische tumoren behandeld worden met chemotherapie, soms gecombineerd of gevolgd door een stamceltransplantatie (hetzij autoloog, hetzij allogeen) en daarna meestal opnieuw chemotherapie, hoewel sinds kort monoclonale antilichaam therapie in opkomst is. Kenmerkend is echter dat bij de patiënten waarbij de ziekte blijft terugkeren ($\pm$ 50% van de AML, 90% van de MM), de tumorcellen een resistentie voor de chemotherapie hebben ontwikkeld.

Om deze therapie resistentie te kunnen doorbreken, moet er een beter inzicht komen wat exact de kenmerken zijn van de resistentie (sub-)populaties tumorcellen die in de therapie resistente patiënten aanwezig zijn. Daarnaast is er een dringende behoefte aan meer selectief (patiënt-specifiek) werkende cytostatica terwijl ook nieuwe vormen van immunotherapie ontwikkeld en getest worden moeten op hun effectiviteit, zowel als monotherapie als in combinatie therapie. Door de complexiteit van het ziektebeeld en de beoogde behandeling is het essentieel om hiervoor geschikte diervormen te kunnen inzetten.

Keuze van het diervorm

Voor de translatie van de onderzoeksresultaten naar een behandeling patiënten, biedt het enorme voordelen als het onderzoek is uitgevoerd met tumorcellen die van de patiënt zelf afkomstig zijn. Als deze dan ook nog eens getest zijn in de context waarin deze cellen zich bij de patiënt bevinden; i.e. de micro-omgeving in het beenmerg, geeft dat een extra relevantie. Het beenmerg is namelijk de locatie waar de tumor ontstaat, waar de groei van de tumorcellen wordt gereguleerd door interactie met de stromale omgeving en door de afgescheiden groeifactoren in de zogenaamde **stroma**. Dit is ook de locatie waar de tumorcellen door de chemotherapie en immunotherapie bereikt moeten kunnen worden, én het is ook de locatie waar de resistentie voor de therapie zich ontwikkelt en waar uiteindelijk de relapse van de ziekte zijn oorsprong kent.

Als daarin vervolgens tumorcellen van de patiënten worden geïnjecteerd, komen ze als het ware in hun eigen "tumor-bed" terecht en dat leidt tot uitgroei van alle typen beenmergtumoren zoals AML, MM, MDS en MF zoals we intussen hebben kunnen vaststellen.

Dit **diervorm** vormt de basis voor alle experimenten die in dit project worden voorgesteld. Het biedt de mogelijkheid om de genetische en fenotypische kenmerken van de tumorcellen, het bijbehorende groeigedrag en de evolutie van de tumorcelpopulatie(s), onder invloed chemo-immunotherapie bij de verschillende hematologisch maligniteiten te onderzoeken, maar daarnaast ook de mogelijkheden om nieuwe vormen van chemotherapie en immunotherapie te ontwikkelen of de effectiviteit van nieuwe chemotherapeutica bij therapie resistentie te testen en onderzoeken naar het doorbreken hiervan uit te kunnen voeren. Omdat steeds duidelijker wordt dat de stromale omgeving in de **stroma** in belangrijke mate bijdraagt aan het ontsnappen aan de therapie alsmede het ontstaan van therapie resistentie, is het ook van groot belang dat de stromale component in het onderzoek betrokken kan worden. Het **diervorm** biedt uitgelezen mogelijkheden om al het voorgenomen onderzoek m.b.t. de pathofysiologie van en de therapie-ontwikkeling voor de hematologische tumoren in uit voeren.

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

- In het geval het project gericht is op één of meer onderzoeksdoelen: op welke vra(a)g(en) dient dit project antwoord(en) te verschaffen?
- In geval het een ander dan een onderzoeksdoel betreft: in welke concrete behoefte voorziet dit project?

Algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

Het experimentele onderzoeksprogramma dat in dit project aan de orde komt bestaat uit twee, sterk samenhangende delen. Ten eerste een deel waarin de experimenten gericht zijn op het ontrafelen van de pathofysiologie van humane beenmergtumoren door meer inzicht te krijgen in de genetische en fenotypische kenmerken van tumorcellen van acute leukemie, multipel myeloom, myelodysplasie, myelofibrose in relatie tot groei-eigenschappen en therapie resistentie. Op de tweede plaats experimenten die erop zijn gericht om nieuwe chemo-therapeutica, nieuwe monoclonale antilichamen en nieuwe cellulaire immuuntherapiën in het preklinisch ontwikkeltraject te testen op hun effectiviteit op primaire tumorcellen, om ze daarna zo snel mogelijk naar klinische toepassing te brengen.

Centraal in deze experimenten staat een eerder door ons ontwikkeld gehumaniseerd muismodel waarin primaire tumorcellen van patiënten kunnen uitgroeien in een humane "beenmergachtige" omgeving, die we in muizen kunnen generen. Dat gehumaniseerde model kunnen we gebruiken voor de bestudering van de pathofysiologie en voor therapie ontwikkeling ten behoeve van deze patiënten met hematologische tumoren. Daarbij ligt de speciale nadruk op tumor-stroma interacties, op het identificeren en doorbreken van therapie resistentie, beide in het kader van "klonale evolutie/klonale getijden*" aangezien die momenteel een barrière blijkt te vormen om werkelijke vooruitgang te kunnen boeken bij de behandeling van leukemie, multipel myeloom en aanverwante beenmerg tumoren. (*Met klonale getijden wordt bedoeld, het opkomen en onder invloed van therapie weer verdwijnen maar mogelijk later weer het terugkomen van de verschillende tumorsubpopulaties met kenmerken (bijvoorbeeld specifieke veranderingen in het DNA of op het celoppervlak).

In de bijlagen is schematisch een overzicht gegeven van het "Principe van de behandeling van leukemie".

Deel A.

Pathofysiologie van humane primaire hematologisch tumoren, die groeien in een [REDACTED] t.b.v. karakterisering en biobanking en voor bestudering van veranderingen in het botmetabolisme en de stromafunctie in de [REDACTED]

1. Genetische en fenotypische karakterisering van hematologische tumoren zowel vóór als nadat deze [REDACTED] in muizen zijn uitgegroeid
2. Onderzoek naar de rol van stroma in de hematopoietische niche m.b.t. veranderingen in het botmetabolisme en stroma functie, gekenmerkt door veranderende gen-expressie, -receptorexpressie, -cytokine secretie, inductie van tumorvorming, door de specifieke interacties tussen (normale) stromale cellen/endotheel cellen en de hematologische tumorcellen of tussen maligne stromale cellen met normale hematopoietische stamcellen (HSC).

Deel B.

Therapie ontwikkeling in het [REDACTED] Chemotherapie en/of immuno-chemo combinatietherapie in relatie tot resistentie, clonale evolutie/"clonale getijden"

1. Het uittesten van nieuwe cytostatica die zich nog in het preklinische traject bevinden en die als "veelbelovend" te voorschijn zijn komen in grootschalige in vitro screenings* programma's, en dit in relatie tot het voorkómen van het optreden van "clonale getijden". (*in vitro screening is bedoeld om dié middelen te identificeren waarvan verwacht mag worden dat ze in in vivo anti-tumor effect zullen hebben maar dat moet dan wel in geschikte diermodellen experimenteel worden vastgesteld. In dit kader hebben wij bijvoorbeeld in vitro een eerste screen gedaan met 180.000 compounds waarvan er, na een tweede in vitro selectieprocedure, slechts tientallen kandidaten zijn overgebleven die voor in vivo testen in aanmerking komen).
2. het uittesten van de toegevoegde waarde van immunotherapie met monoclonale antilichamen als monotherapie of in combinatie met chemotherapie en/of cellulaire immuuntherapie, (ook hier geldt dat er een in vitro screening traject aan vooraf gaat om de meest veelbelovend antilichamen te identificeren die in aanmerking komen voor verdere in vivo experimenten).
3. onderzoek met nieuwe vormen van cellulaire immuuntherapie gebaseerd op CAR-T-cellen, CTL of NK-cellen of andere immuuncompetente cellen of combinaties, met of zonder chemotherapie en/of immuunmodulatie.

Ad A1. Genetische en fenotypische karakterisering van de hematologische tumoren en het hematopoietische stroma. De hematologische maligniteiten worden historisch ingedeeld aan de hand van morfologisch kenmerken (FAB classificatie). Het is in de laatste jaren echter duidelijk geworden dat er op basis van specifieke veranderingen in het DNA (chromosomale translocaties) een betere opsplitsing gemaakt kan worden waardoor er binnen elk ziektebeeld (AML, MM, MDS, MF) meerder subtypen kunnen worden onderscheiden, ieder met hun eigen prognostisch profiel en waarop keuzes voor bepaalde behandelingen op zouden kunnen worden gebaseerd. Wij willen onderzoeken of er bij een bepaald genetisch of fenotypische profiel een correlatie bestaat tussen de specifieke genetische afwijkingen en het patroon van groei en het ontwikkelen van (chemo-en of immuno-) resistentie.

Ad A2. Bestudering van de rol van het hematopoietische stroma in de [REDACTED] bij de tumorgroei, een verstoorde botmetabolisme en therapie-resistentie.

Uit onze lopende onderzoeken blijkt dat er ook in de hematopoietische microomgeving (in het beenmerg) typerende veranderingen optreden als gevolg van specifieke interacties tussen het stroma van het (tumor)beenmerg en het type tumor dat daarin aanwezig is. Dit geldt vooral voor de genetisch verschillende subtypen van het multipel myeloom, maar ook voor myelodysplasie en myelofibrose; voor acute leukemie is dat vooralsnog niet zo duidelijk. Bij myeloma leidt de interactie met het stroma ook tot een negatief effect op de botgroei met blijvende schade aan het herstelvermogen van het botweefsel, ook na succesvolle therapie. Ook voor dit type onderzoek blijkt het gehumaniseerde muismodel geschikt want we hebben eerder gevonden dat, nadat er in vivo contact is geweest tussen de tumorcellen en stroma, dat er typerende veranderingen in zijn opgetreden. Om te kunnen onderzoeken of deze tumorspecifieke veranderingen de ontsporing van stroma of tumorcel kunnen verklaren, worden dezelfde afwijkingen in normale stromale cellen aangebracht en vervolgens wordt er in het [REDACTED] onderzocht wat voor gevolgen dit heeft voor tumorgroei. Dat is één van de manieren om inzicht te krijgen in de pathofysiologie van deze vormen van beenmergkanker en om nieuwe "targets" voor therapie te vinden.

Ad B. Therapie ontwikkeling: chemotherapie en immunotherapie als monotherapie of als combinatietherapie in relatie tot resistentie, klonale evolutie/clonale "getijden"

Recent zijn er technologieën ontwikkeld die het mogelijk maken om ook kleine subpopulaties tumorcellen in het leukemische beenmerg op te sporen (i.c. whole genome/exome sequencing en flow cytometrie) waarmee bewijzen zijn gevonden voor de gelijktijdige aanwezigheid van meerdere genetische en/of fenotypisch verschillende subpopulaties tumorcellen in het beenmerg van patiënten. Deze worden ook wel met "klonen" aangeduid en zijn mogelijk geëvolueerd vanuit die éne ooit ontspoorde cel, door bijvoorbeeld genomische instabiliteit, door invloeden in de hematopoietische microomgeving of ze zijn ontstaan door therapie-geïnduceerde DNA veranderingen waardoor de tumorcellen resistentie hebben ontwikkeld. Wat in de kliniek wordt waargenomen is dat er in de tijd schommelingen zijn in de relatieve samenstelling van de subpopulaties waarbij er klonen opkomen en soms tijdelijk weer verdwijnen om door andere subklonen vervangen te worden afhankelijk van het type (chemo) therapie die wordt toegediend. Dit verschijnsel wordt wel "clonal tides" ("klonale getijden") genoemd en leidt uiteindelijk tot meerdere en steeds meer resistentie tumorcelopulaties. Eén van de doelstellingen van dit project is het onderzoeken van de relatie tussen de klonale getijden en de genetisch kenmerken van de subpopulaties en te onderzoeken wat er gebeurt als er een specifiek daarop gerichte combinatietherapie wordt toegepast. Deze kan bestaan uit combinatie chemotherapie, immunotherapie met monoclonale antilichamen (mAbs) of met cellulaire immunotherapie of combinaties hiervan.

Een aantal voorbeelden van specifieke vragen die we in het onderzoeksproject willen gaan onderzoeken, en die deels via dierexperimenten bestudeerd gaan worden zijn:

- hoe heterogeen is de tumorcelpopulatie in de diagnose monsters, dus voorafgaande aan de therapie, m.a.w. hoeveel subgroepen (klonen) zijn er aanwezig en in welke verhouding en welke zijn transplanteerbaar in het muizenmodel?
 - hoe onderscheiden de verschillende klonen zich ten opzichte van elkaar, i.e., wat is hun genetische en fenotypische profiel?
 - hoe verandert deze onder invloed van de toegediende chemotherapie (resultierend in de "klonale getijden"); m.a.w. in hoeverre waren de resistente klonen reeds aanwezig bij aanvang van de therapie (dus in het uitgangsmateriaal), in hoeverre zijn ze door de gegeven behandeling uitgeselecteerd,
 - zijn er overeenkomsten tussen patiënten? m.a.w. komen bepaalde genetische veranderingen bij meerdere patiënten binnen een subgroep voor?
 - zijn deze afwijkingen te koppelen met het resistentie profiel en de toegepaste therapie?
 - kunnen we, uiteindelijk, op grond van reeds bij diagnose vastgestelde afwijkingen in de tumorcellen, al bij aanvang van de therapie een betere keuze maken m.b.t. het "optimale" medicijn voor de betreffende patiënt? Ook wel aangeduid met "personalized treatment"?
 - bij het onderdeel immunotherapie zullen niet alleen nieuw ontwikkelde monoclonale antilichamen die tegen bekende of nieuw gevonden tumorcel targets gericht zijn worden getest, maar ook T cellen met d.m.v. biotechnologie geconstrueerde chimere antigen receptoren (CAR-T [REDACTED])
- [REDACTED]
- De nieuwe behandelingsstrategieën die in dit project bestudeert worden voor de behandeling van patiënten met leukemie, myeloom en aanverwante tumoren, verkeren op dit moment nog in het ontwikkelingsstadium. De condities waaronder ze het beste kunnen worden toegepast zijn nog lang niet uitgekristalliseerd. Verder preklinisch onderzoek is noodzakelijk om de juiste keuzes te kunnen maken bij de vertaling naar de behandeling van de patiënt. In dat beslistraject spelen de uitkomsten de dierexperimenten die in dit project uitgevoerd gaan worden, een mede bepalende rol.

Haalbaarheid van het project.

- De instelling waar dit onderzoek plaatsvindt heeft een groot en gevarieerd leukemiepatiënten aanbod (zowel AML, MM, MDS en MF) en speelt een zeer actieve, soms centrale rol bij nationale en internationale onderzoeksprogramma's op dit terrein. Dit geeft de garantie dat er voldoende klinisch materiaal beschikbaar is, om het onderzoek te kunnen uitvoeren. Verder is er binnen de afdeling hematologie van het VUMC ook de structuur aanwezig om de onderzoeksresultaten direct naar klinische fase I/II studies te vertalen.
- De doelstellingen, zoals die in dit project zijn geformuleerd, zijn niet nieuw, want het project is een voortzetting van een al geruime tijd lopende onderzoekslijn die sinds 2009 op basis van het [REDACTED] model steeds verder wordt uitgebouwd. Er is daarom uitgebreide ervaring met het uitvoeren van het type experimenten in het [REDACTED] model, zoals die in dit project worden voorgesteld.
- Met betrekking tot doelstelling (A1), de "Karakterisatie en biobanking van verschillende typen tumoren" ...is onze ervaring dat het "engraftment succes percentage" in het [REDACTED] met >95% voor acute leukemie en met 60-70% voor multipel myeloom, zeer hoog is, waardoor de meeste experimenten met succes afgerond zullen kunnen worden. (Overigens geeft het "niet aanslaan" van een tumor ook informatie over de aard van het betreffende type leukemie). Ook is gebleken dat de leukemie stamcel zich in de humane niche kan vestigen en delen en ook in aantal toeneemt maar daarnaast ook uitrijpt tot mature leukemiecellen (zoals dat bij patiënten ook gebeurt), maar ook is gebleken dat in de muizenweefsels alleen de meer mature leukemiecel zich blijkt te kunnen handhaven. Voor de fenotypische analyse (celoppervlakte markers) van de monsters zijn er geen problemen aangezien het laboratorium waar het onderzoek plaatsvindt [REDACTED] Voor de genetische

analyse is er in huis een faciliteit beschikbaar en daarnaast hebben wij op dit terrein internationale samenwerkingen met gerenomeerde instituten.

- Doelstelling (A2), bestudering van de veranderingen in het bot metabolisme en in de stromale component van de [REDACTED] is voor ons een standaardprocedure. Het genetisch modificeren van stromale cellen en tumorcellen en het moduleren van genexpressie wordt al met succes door ons toegepast.
- Doelstelling (B1), via doorlopende internationale samenwerkingsprojecten komen er voldoende stoffen (cytostatica) beschikbaar die in het hu [REDACTED] model op resistente patiënten monsters of bepaalde cellijnen getest kunnen worden. Op dit terrein is er structurele samenwerking tussen farmaceutische industrie en de hematologische kliniek en de preklinisch onderzoekers; daardoor is een goede toegang tot nieuwe antilichamen/cytostatica. Binnen de onderzoeksgroep is expertise in [REDACTED]
- [REDACTED]
- Door de nauwe betrokkenheid van klinisch hematologen en de op translationeel onderzoek gerichte instelling van de projectgroep is de translatie van nieuwe kennis naar klinische fase I/II studies gegarandeerd.
- De projectgroep (op dit moment bestaande uit [REDACTED], 3 onafhankelijke maar goed samenwerkend groepsleiders (PI's), 4 PhD studenten, 6 analisten (voor een deel ook biotechnisch geschoold) beschikt over voldoende [REDACTED] om de voorgestelde experimenten binnen dit project uit te kunnen voeren.
- [REDACTED]
- De [REDACTED]

3.3 Belang

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

Wetenschappelijk belang:

De resultaten van het onderzoek zullen in belangrijke mate kunnen bijdragen aan een verbeterd inzicht in de ziekteprocessen zoals die zich bij de verschillende hematologische tumoren voordoen (AML, MM, MF, MDS) en waardoor ook duidelijk wordt waarop nieuwe therapieën het beste gericht kunnen worden. De uitkomsten van dit onderzoek kunnen een belangrijke bijdrage gaan leveren aan de introductie van deze nieuwe vormen van therapie zoals: (i) [REDACTED]

Maatschappelijk belang:

Per jaar worden alleen al in Nederland circa 1000 nieuwe patiënten diagnostiseerd met leukemie, multipel myeloom, myelodysplasie of myelofibrose. De kans op genezing is voor AML patiënten ongeveer 50%, van de myeloom patiënten $\pm$ 10%. De laatste jaren zijn er wel nieuwe middelen ontwikkeld die enige verlenging van de overlevingsduur hebben gebracht, maar het percentage genezen patiënten neemt nauwelijks toe. Alle patiënten krijgen gedurende een aantal achtereenvolgende jaren een steeds intensievere chemotherapie behandeling (soms nog aangevuld met een risicovolle stamcel transplantatie) die desondanks voor de meeste patiënten uiteindelijk resulteert

in therapie resistentie. Het is onze stellige overtuiging dat het soort onderzoek zoals wij dat in dit project willen ondernemen een belangrijk bijdrage leveren om de patiënten in een zo vroeg mogelijk stadium de meest effectieve (en minst belastende) therapie te kunnen bieden. Doordat er een nauwe samenwerking bestaat tussen de kliniek (hematologen) en prekliniek (onderzoekers) op dit project kunnen de resultaten van het onderzoek direct vertaald worden in phase I-II studies. Hierdoor kunnen de nieuw verkregen inzichten direct bij patiënten worden toegepast om daarmee hun kansen op verdere verlenging van de remissieduur en op uiteindelijke genezing te doen toenemen.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

De algemene opzet van het project is geënt op de vraagstellingen die er bestaan bij de behandeling van patiënten met hematologische tumoren (AML, MM, MDS, MF). Daarbij wordt een heel traject doorlopen, vanaf de diagnose, eerste behandeling met remissie-inductie chemotherapie, soms gevolgd door een (allogene) stamceltransplantatie met een aanvullende immuuntherapie (donor lymfocyten infusie), en in geval van een relapse aanvullende chemotherapie (zie het bijgevoegde schematische overzicht "Principe van de behandeling van hematologische tumoren".) Door allerlei ontwikkelingen komt er een steeds groter aanbod van experimentele chemotherapeutica, immunotherapie met antilichamen en/of cellulaire immunotherapie. Bij welke van deze therapieën de patiënt het meeste baat zal hebben is onduidelijk omdat de meeste van deze therapieën zich nog in het ontwikkelingsstadium bevinden. De condities waaronder ze het beste kunnen worden toegepast zijn nog lang niet uitgekristalliseerd.

In dit project proberen we meer duidelijkheid te krijgen hoe effectief de nieuwe therapieën zouden kunnen zijn en hoe ze het beste gecombineerd kunnen worden toegepast. De specifieke vraagstelling wordt zodanig geformuleerd dat deze in het door ons hiervoor ontwikkelde gehumaniseerde diermodel getest kan worden. De uitkomsten van het onderzoek worden dan vertaald in een aanpassing van klinische behandelprotocollen.

De strategie in dit project is om tumorcellen van patiënten te laten uitgroeien in een gehumaniseerd omgeving in de muis waarbij ze getest worden terwijl zich bevinden in hun natuurlijke omgeving, maar dan in humane omgeving die in de muis wordt gecreëerd.

Het diagnose beenmergmongsters wordt onderzocht nadat de tumorcellen in de gehumaniseerde [REDACTED] zijn uitgegroeid; de stromafunctie van het patiëntenbeenmerg kan worden getest, gemanipuleerd en de effecten op de groei bestudeerd.

Door in de [REDACTED] de tumorcellen te laten uitgroeien tot tumoren kunnen ze getest worden op hun gevoeligheid voor chemo en immunotherapie.

[REDACTED] in de praktijk werkt kan de volgende, eerder uitgevoerde studie, als voorbeeld dienen. Bij een klinische fase I/II studie van multipel myeloom patiënten met een antilichaam tegen CD38 (dat hoog tot expressie komt op MM cellen), werd na aanvankelijk een prima response, waargenomen dat de in de patient resterende MM cellen nog maar een laag niveau van CD38 expressie vertoonden; waardoor deze tumorcellen blijkbaar aan de therapie konden ontsnappen. Nu hadden we op basis van in vitro studies aanwijzingen dat toevoeging van het middel ATRA (dat bij acute promyelocyten leukemie zeer goed werkt) het niveau van CD38 expressie op de MM cellen weer omhoog bracht en in vitro weer gevoelig voor anti CD38. Maar om dit zonder meer aan MM patiënten toe te dienen werd niet verantwoord geacht; het zou ook de proliferatie van MM cellen kunnen stimuleren. Daarom werd in [REDACTED] - [REDACTED] muizen met daarin patiënt MM cellen getest of het combineren van antiCD38 met ATRA een verhoogde response zou kunnen geven op patiënten MM cellen terwijl deze zich in de context van een humane beenmergomgeving (in de [REDACTED] - [REDACTED] muis) bevonden. En inderdaad, de combinatie resulteerde in een veel sterkere afname van de tumoren ten opzichte van de controle groepen. Mede op basis van deze studie is er intussen een fase - I studieprotocol ontwikkeld met de ATRA-anti CD38 combinatie, dat binnenkort in de kliniek van start zal gaan. In het huidige project wordt een soortgelijke opzet gekozen om nieuwe chemotherapeutica, nieuwe monoclonale antilichaamtherapie en nieuwe cellulaire therapieën, zoals bijvoorbeeld met CAR T cellen en NK cellen, in het preklinische traject bij de verschillende vormen van hematologische tumoren op hun effectiviteit te onderzoeken en vervolgens, bij bewezen potentie, [REDACTED].

3.4.2 Geef een overzicht op hoofdlijnen van de verschillende onderdelen van het project en de daarbij gebruikte type(n) dierproef of dierproeven.

Onderdelen van de experimenten in het project op hoofdlijnen:

Deel A:

- Het verkrijgen van inzicht in genetische en fenotypische kenmerken van de tumorcelpopulatie om op basis daarvan patient-specifieke ("personalized") behandeling te kunnen gaan ontwikkelen
- Het verkrijgen van inzicht van de invloed van een veranderde/dysfunctionele stromale omgeving m.b.t. genexpressie, botmetabolisme en therapie-resistentie en wederzijdse beïnvloeding/interactie tussen stroma en de tumorcellen.

Voor deze experimenten worden dierproef type 1 uitgevoerd.

Titel : "Pathofysiologie van humane primaire hematologisch tumoren die groeien in een [REDACTED] [REDACTED] t.b.v. karakterisering en biobanking (A) en veranderingen in het bot metabolisme en de stromafunctie in de [REDACTED] (B)"

Ad A1:

Stap 1: het genereren van zogenaamde [REDACTED]

[REDACTED]. Om de groei van de tumorcellen te "beïnvloeden" worden soms ook genetisch aangepaste stromacellen uitgezaaid. Stap 2: in deze [REDACTED] worden tumorcellen geïnjecteerd die uitgroeien tot tumoren, dit duurt 4-max 12 maanden en deze worden regelmatig gemonitord (caliper metingen). Tumoren en stroma worden na euthanasie geïsoleerd en onderzocht. Kenmerk van deze dierproef: ongestoorde uitgroei in [REDACTED] muizen, analyse post mortum. Stap 3 (in een deel van de experimenten). Wanneer de tumorcellen zijn gemarkeerd met luciferase of fluorescerende eiwitten, wordt met bioluminescentie imaging (onder narcose) de groei van de tumor gevolgd.

Ad A2:

Stap 1: stromale stamcellen, die zijn opgekweekt uit normaal donorbeenmerg of uit tumorbeenmerg, worden op [REDACTED]. Na circa 2-4 maanden worden de [REDACTED] geïsoleerd en het stroma wordt geanalyseerd voor genexpressie en voor botvorming. Bij een aantal experimenten zullen biologisch actieve stoffen (compounds) worden toegediend waarvan verondersteld wordt (op grond van in vitro screening studies) dat deze het "defect" in botaanmaak kunnen herstellen/beïnvloeden. Kenmerk van deze dierproef: voor een deel ongestoorde uitgroei in [REDACTED], analyse post-mortum. De te testen stoffen zijn afkomstig uit in vitro screenings programma's waarbij uit een groot aantal "veelbelovende" compounds de meest kansrijke voor in vivo botgroei stimulatie, moeten worden geselecteerd.

Deze proefopzet wordt ook gebruikt indien er MDS of MF patiënt stroma wordt onderzocht in het [REDACTED]. In dat geval worden er óf maligne óf normale stamcellen (na minimaal 6-8 weken) in de [REDACTED] geïnjecteerd en geobserveerd voor uitgroei zoals beschreven is bij ad A1.

Deel B**Ad B1,2,3.**

Stap 1 [REDACTED]

[REDACTED] Voor experimenten waarbij stroma – gerelateerde chemo-of immuno resistentie wordt onderzocht, worden genetisch veranderde stromale cellen gebruikt voor het creëren van een aangepaste "niche".

Stap 2: uit het biobank bestand worden de tumorcellen van specifieke patiënten geselecteerd die op basis van gedefinieerde genetische/fenotypische analyse in aanmerking komen om met therapie "x" behandeld te worden, en in de [REDACTED] geïnjecteerd. Daarin groeien ze uit tot tumoren. (Nb. voor bepaalde experimenten kunnen de cellen eerst met merkgenen genetisch worden gemarkeerd (met genen die coderen voor luciferase en/of fluorescerende eiwitten) ten behoeve van "real life" bioluminescentie/fluorescentie imaging/of 2-photon imaging (onder narcose) om naast de tumorgroei, eventueel het hominggedrag van tumorcellen of van immuun-effectorcellen en de effecten die de behandeling daarop heeft, te kunnen monitoren.

Stap 3: De muizen met tumoren worden in vivo blootgesteld aan therapie met middel "x"; "x" kan zowel chemotherapie óf antilichaam- óf immunotherapie óf een combinatie van deze betreffen.

De analyse vooraf én na therapie kan inzicht geven in de relatie tussen genetische/fenotypische opmaak van de tumorcellen en de gevoeligheid voor een bepaalde therapie.

3.4.3 Beschrijf en benoem de logische samenhang van deze verschillende onderdelen en de eventuele fasering in de uitvoering. Vermeld eventuele mijlpalen en keuzemomenten.

De experimenten die in dit project worden uitgevoerd vertonen een sterke onderlinge samenhang. Dit komt doordat wij het hele traject van het ontstaan van leukemie, myeloom, myelodysplasie en myelofibrose én de behandeling van deze tumoren, én het als gevolg daarvan het ontstaan van resistentie én het doorbreken daarvan met onze ideeën over specifieke, patiënt-gerichte (chemo-immunotherapie) in een [REDACTED] willen reproduceren (zie het bijvoegde schema behandeling leukemie).

Dat begint met het willen begrijpen waarom de tumoren ontstaan, dus het identificeren van de genetische/moleculair

biologische oorzaken die hieraan te grondslag liggen. Dit onderzoeken we bij onderdeel A1, waarbij van patiënten afkomstige tumorcellen, zowel vóór als na uitgroei in het humane [REDACTED] model, worden geanalyseerd (gedetailleerde genetische en fenotypische analyse), gecategoriseerd en in een (stikstof) biobank opgeslagen. In onderdeel A2 worden de kenmerkende veranderingen in de micro-omgeving die zijn opgetreden (i.c. de [REDACTED] en botmetabolisme veranderingen) in kaart gebracht. Door experimenten uit te voeren met een genetische aangepaste micro-omgeving, waarin de gevonden veranderingen selectief zijn ingebracht kan in het [REDACTED] model onderzocht worden wat de specifieke rol is van een veranderde micro-omgeving als drijvende kracht in tumorvorming en tumorgroei.

Dan volgt bij onderdeel B onderzoek om innovatieve therapie (chemo-immuno) te ontwikkelen op basis van de verkregen informatie bij A1 en A2, waarbij de focus komt te liggen op resistentie (zoals die in de patient is ontstaan en in de muis gereproduceerd door het toedienen van vergelijkbare therapie als die de patient heeft gekregen). Dat begint met vanuit de biobank specifiek resistente patiënten monsters te selecteren om daarmee óf experimenten uit te voeren met een nieuwe compound (cytostaticum) (**chemotherapie**) die deze resistentie zouden kunnen doorbreken, óf voor het uittesten van de specifieke [REDACTED]

Mijlpalen in dit onderzoek zijn:

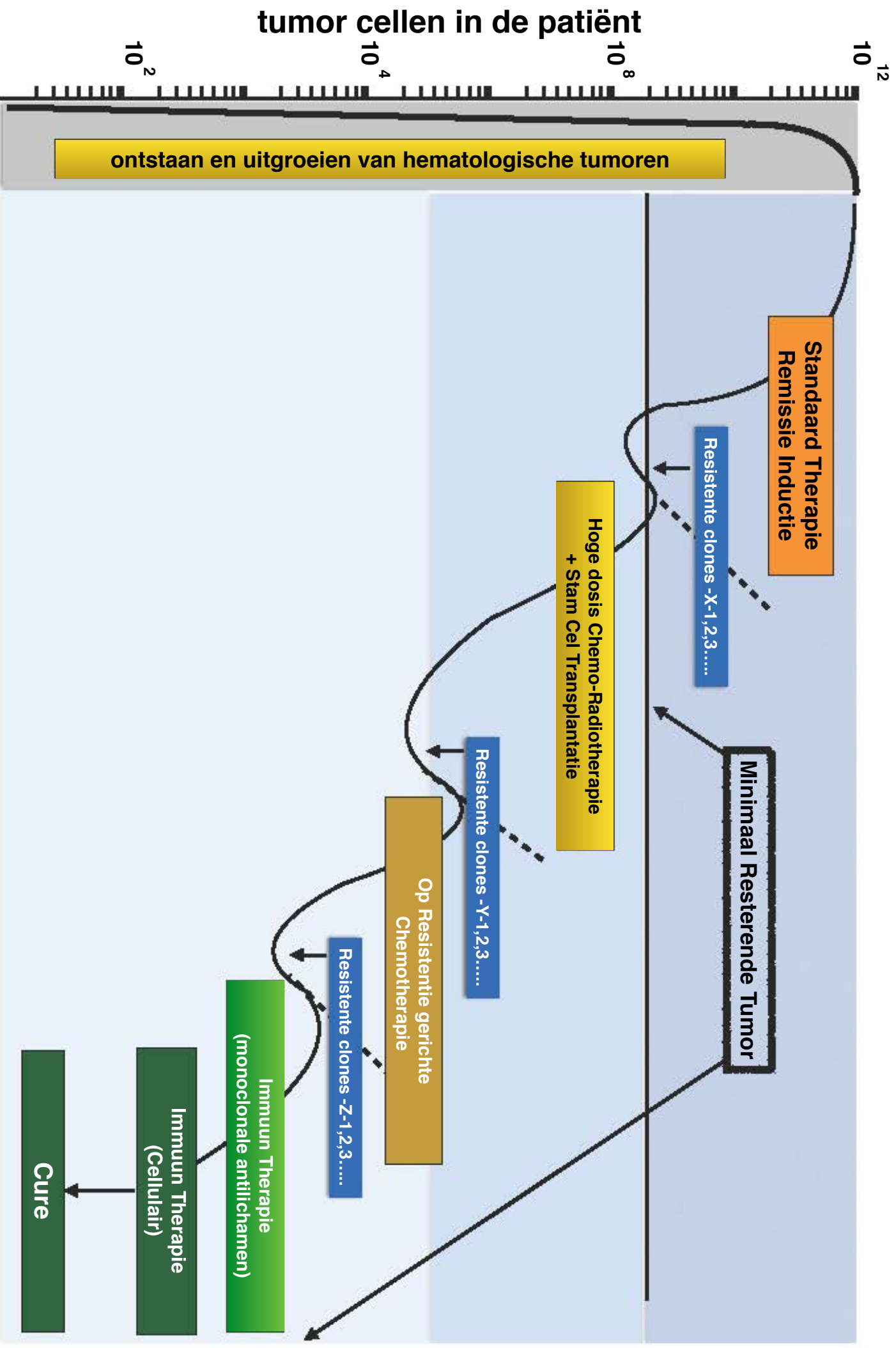
- het genereren van een substantiële biobank met volledig gekarakteriseerde en gevalideerde patiënten tumorcellen, die in het [REDACTED] zijn gegroeid en geëxpandeerd, voor alle denkbare aanvullende onderzoeken en experimenten
- het begrijpen hoe het verlies van de functie of een overactiviteit van een bepaalde gen of genproduct (in de tumorcellen) gekoppeld kan worden aan een bepaald resistentie patroon;
- het identificeren van de oorzaken (genetische verandering) van het dysfunctioneren van de stromale component in de [REDACTED]" (zowel in de tumorcel als/of in stromale cellen);
- het identificeren van een (afwijkend) genetisch profiel dat gekoppeld kan worden aan een specifieke therapie-resistentie en het kunnen doorbreken daarvan met een nieuwe compound, of een nieuw monoclonaal antilichaam, of nieuwe "typen" immuuncompetente cellen, of combinaties van deze;
- het (bijdragen) aan implementatie van een nieuwe behandeling in de klinische praktijk op basis van de resultaten van experimenten in het gehumaniseerd muizenmodel

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Pathofysiologie van humane primaire hematologisch tumoren die groeien in een [REDACTED] t.b.v. karakterisering en biobanking (A1) en veranderingen in het botmetabolisme en de stromafunctie in de [REDACTED]
2	Therapie ontwikkeling in het [REDACTED] (B) Chemotherapie en/of immuno-chemo combinatietherapie in relatie tot resistentie, clonale evolutie/"clonale getijden"
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	

Principe van de behandeling van hematologische tumoren (leukemie etc)

(eerst tumorload reductie, daarna op Minimaal Resterende Tumor gerichte chemo-immunotherapie)



Projectaanvraag:

Pathofysiologie van humane primaire hematologisch tumoren die groeien in een [REDACTED]
[REDACTED] t.b.v. karakterisering en biobanking (A1) en veranderingen in het bot metabolisme en de stromafunctie in de [REDACTED] VUMC

Overzicht aantal dieren per dierproef met bijbehorend ongerief.

Onderdeel/dierproef	Diersoort	Aantal dieren*	Mate van ongerief
Dierproef 1 Ten behoeve van karakterisering en biobanking van hematologische tumoren; veranderingen in het bot metabolisme en onderzoek van stromafunctie in de (maligne) beenmerg niche Fok van dieren voor dierproef 1	muis muis muis muis	750 300 600 450	matig matig matig licht
Dierproef 2 Ontwikkeling van chemo-immuno-combinatie therapie in het hu- [REDACTED] model in relatie tot resistentie. Fok van dieren voor dierproef 2	muis muis	2000 550	matig licht
Totaal aantal dieren gehele project in 5 jaar	muis	4650	

*Totaal aantal dieren voor de looptijd van het project van 5 jaar

DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer:
2. Titel van het project: Pathofysiologie en therapie ontwikkeling voor hematologische maligniteiten (leukemie, myeloom, myelodysplasie, myelofibrose)
3. Titel van de NTS: Pathofysiologie en therapie ontwikkeling voor hematologische maligniteiten (leukemie, myeloom, myelodysplasie, myelofibrose)
4. Type aanvraag:
 - ✓ nieuwe aanvraag projectvergunning
 - ☐ wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: Vrije Universiteit Amsterdam / VU medisch centrum
 - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
 - mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ✓ ontvangen door DEC: 25-06-2015
 - ✓ aanvraag compleet: 25-06-2015
 - ✓ in vergadering besproken: 14-07-2015
 - ☐ anderszins behandeld: n.v.t.
 - ☐ termijnonderbreking(en) van / tot: n.v.t.
 - ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen: n.v.t.
 - ✓ aanpassing aanvraag: 30-07-2015
 - ✓ advies aan CCD: 03-08-2015
7. Eventueel horen van aanvrager: n.v.t.
8. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum: 21-07-2015
 - Strekking van de vraag / vragen: De DEC stelt enkele kleine tekstuele verduidelijkingen voor. De keuze voor het gebruik van een specifiek geslacht heeft een motivatie. Tot slot dienen de voor de fok in te zetten aantallen dieren met een genetisch gemodificeerde achtergrond in de aanvraag te worden vermeld.
 - Datum antwoord: 30-07-2015
 - Strekking van het (de) antwoord(en): De gevraagde aanpassingen zijn doorgevoerd.
 - De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag: Ja
9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC): n.v.t.

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunning plichtig. Het omvat dierproeven in de zin der wet.
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om over deze projectvergunningaanvraag te adviseren. De benodigde expertise op dit wetenschappelijk terrein is aanwezig binnen de DEC.
4. Vanwege betrokkenheid bij het betreffende project is een aantal DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken bij de advisering: n.v.t. (geen van de DEC-leden is betrokken bij het betreffende project)

C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:
 - ✓ uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord
 - ☐ uit onderwijskundig oogpunt verantwoord
 - ☐ uit het oogpunt van productiedoeleinden verantwoord
 - ☐ wettelijk vereist
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën (fundamenteel en toegepast onderzoek) zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling.
3. De doelstelling is helder omschreven. De DEC onderschrijft het wetenschappelijke en maatschappelijke belang van de doelstelling, te weten:

Het wetenschappelijk belang: meer inzicht verkrijgen in de ziekteprocessen van verschillende soorten hematologische tumoren (leukemie, multipel myeloom, myelodysplasie of myelofibrose) en het ontwikkelen en testen van nieuwe behandelingsmethoden (chemo-therapeutica, antilichamen en cellulaire immuuntherapieën).

Het maatschappelijk belang: Het onderzoek kan een belangrijke bijdrage leveren aan het verbeteren van behandelingsmethoden en het ontwikkelen van nieuwe therapieën, zodat patiënten in een zo vroeg mogelijk stadium van de ziekte de meest effectieve en minst belastende vorm van therapie kunnen krijgen

Het wetenschappelijke en maatschappelijke belang wordt door de DEC ingeschat als substantieel. Per jaar worden in Nederland circa 1000 nieuwe patiënten gediagnostiseerd met hematologische tumoren (leukemie, multipel myeloom, myelodysplasie of myelofibrose). Met de voorhanden zijnde behandelingsmethoden kan een groot deel van deze patiënten niet adequaat worden geholpen. Er is dringend behoefte aan betere therapieën. Het maatschappelijke belang van dit onderzoek is om die reden groot.

4. Naar de overtuiging van de DEC beschikt de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen om de projectdoelstelling met de gekozen strategie / aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren.

Het proefdieronderzoek vindt plaats in nauwe samenwerking met de kliniek. Hierdoor is de beschikbaarheid van patiënten materiaal voor het onderzoek gegarandeerd. De selectie van te testen therapeutica vindt in nauwe samenwerking met onder meer de kliniek en farmaceutische partners plaats.

Met de techniek waarmee dit onderzoek wordt uitgevoerd bestaat ruime ervaring. De slagskansen van experimenten is zeer hoog. Alle technische voorzieningen die benodigd zijn voor uitvoering van het project zijn voorhanden. Binnen de onderzoeksgroep is zowel voldoende deskundigheid als financiering aanwezig om het project succesvol uit te voeren.

Binnen de afdeling is de structuur aanwezig om de onderzoeksresultaten naar klinische fase I/II studies te vertalen. De nieuw verkregen inzichten kunnen op termijn bij patiënten worden toegepast, wat de kansen op remissie en op uiteindelijke genezing doet toenemen. De DEC acht het reëel om te veronderstellen dat binnen de looptijd van het project nieuwe en/of aanvullende inzichten zullen worden verkregen die uiteindelijk klinisch toepasbaar blijken te zijn. Tegelijkertijd moet worden verwacht dat de onderzoekslijn als zodanig langer dan vijf jaar zal doorlopen, omdat niet binnen deze termijn optimale en volledig effectieve behandelingen voor alle soorten hematologische tumoren in alle patiënten zullen kunnen worden ontwikkeld.

5. Alle dieren worden gefokt voor het gebruik in dierproeven, er is geen sprake van afwijkende huisvesting en/of hergebruik. Er is geen sprake van bedreigde diersoorten, niet-menselijke primaten, zwerfdieren en/of dieren in/uit het wild. De toegepaste methoden voor anesthesie/euthanasie zijn conform de Richtlijn.
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het verwachte ongerief: matig, als gevolg van het opzetten van de diermodellen (injectie met tumorcellen) en het toedienen van medicijnen, waaronder chemotherapie of immunotherapie. Ernstig ongerief wordt niet verwacht.
7. Het project is in overeenstemming met de vereisten ten aanzien van de vervanging van dierproeven. Het gebruik van proefdiervrije methoden of minder complexe diersoorten is volgens de DEC niet mogelijk.

Het gebruik van proefdieren is noodzakelijk, omdat uit eerder onderzoek is gebleken dat het onmogelijk is om leukemie/myeloom patiëntmateriaal in vitro te laten uitgroeien met behoud van de voor het onderzoek essentiële tumorkenmerken.

De keuze voor het gebruik van muizen is naar het oordeel van de DEC gerechtvaardigd. Er wordt gebruikt gemaakt van muizen met een verzwakt immuunsysteem, omdat alleen in deze dieren tumorcellen van patiënten kunnen uitgroeien zonder een afstotingsreactie op te roepen.

8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven.

Het maximale aantal dierproeven is proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd. De DEC onderschrijft dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 4650 muizen, en acht dit aantal realistisch onderbouwd.

Onnodige duplicatie van experimenten wordt voorkomen doordat de onderzoekers goed bekend zijn met het onderzoeksveld en samenwerken met de andere onderzoeksgroepen die vergelijkbaar onderzoek verrichten.

9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd.

Door de opzet van de experimenten blijft tumor uitgroei gelokaliseerd in de [REDACTED]

[REDACTED] Dit veroorzaakt minder ongerief dan andere leukemie-diermodellen.

Tijdens de dierproeven zal waar nodig pijnstilling of verdoving worden toegepast. Richtlijnen voor zorgvuldig onderzoek, in dit geval de Code of Practice voor dierproeven in het kankeronderzoek, worden gevolgd. Mochten onvoorziene complicaties optreden die meer dan matig ongerief veroorzaken dan wordt het experiment onmiddellijk beëindigd. Alle dierproeven worden uitgevoerd door bekwaam personeel.

Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.

10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd. De NTS voldoet daarmee aan de eisen zoals gesteld in artikel 10.a.1.7 van de Wod.

D. Ethische afweging

Volgens de DEC rechtvaardigen de doeleinden van dit project het voorgestelde gebruik van dieren. De DEC onderschrijft dat de doelstellingen niet zonder het gebruik van proefdieren kunnen worden behaald en acht het gebruik van maximaal 4650 muizen en het daarmee samenhangende maximale matige ongerief bij de dieren en hun overlijden gerechtvaardigd.

Het verwachte resultaat, in het kader van de bestrijding van levensbedreigende en zwaar belastende ziekten, weegt moreel gezien in voldoende mate op tegen de schade bij dieren in de vorm van lijden, pijn en angst. Bij het uitvoeren van de dierproeven wordt een adequate invulling gegeven aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en verfijning van de dierproeven. Het wetenschappelijke onderzoek in dit project is (1) van substantieel belang en (2) van goede kwaliteit.

(1) De resultaten zullen bijdragen aan het verkrijgen van een beter wetenschappelijk inzicht in de ziekteprocessen van verschillende hematologische tumoren en het ontwikkelen van nieuwe therapieën. Op termijn kunnen de uitkomsten van het project leiden tot betere, meer effectieve en minder belastende behandelingsmethoden voor patiënten.

(2) De DEC is van mening dat dit project verantwoord is vanuit wetenschappelijk oogpunt en acht het waarschijnlijk dat de doelstellingen worden behaald. De onderzoeksgroep beschikt over ruime ervaring op het gebied van de te gebruiken methoden en werkt nauw samen met klinici. De groep heeft tijdens eerder onderzoek veel kennis en ervaring opgedaan met de voorgestelde typen dierproeven. In combinatie met de beschikbare faciliteiten en infrastructuur betekent dit dat de groep goed gekwalificeerd en geoutilleerd is voor het uitvoeren van het in dit project beschreven onderzoek.

Samenvattend kan worden gesteld dat het als substantieel te kwalificeren belang van het onderzoek naar het oordeel van de DEC opweegt tegen het gebruik van maximaal 4650 muizen en het daarbij verwachte maximale matige ongerief.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

- ☐ De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen
- ☐ De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
- ☒ De DEC adviseert de vergunning te verlenen

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.



Centrale Commissie Dierproeven

06 AUG 2015

06 AUG 2015

Melding Machtiging

- U kunt met dit formulier een machtiging afgeven of beëindigen.
- U machtigt een natuurlijk persoon (zoals een adviseur) of een rechtspersoon (zoals een BV, stichting, vereniging) om uw zaken voor u te behartigen. De machtiging is voor maximaal vijf jaar geldig.
- Meer informatie vindt u op www.centralecommissiedierproeven.nl.

1 Gegevens aanvrager

- 1.1 Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.

Naam van de portefeuillehouder	[REDACTED]
KvK-nummer	53815211
NVWA deelnemernummer	11400

2 Gegevens gemachtigde

- 2.1 Vul één van deze nummers van de gemachtigde in: KvK-nummer, of Burgerservicenummer (BSN)
Geef aan welk nummer u invult.

☐ KvK-nummer	
☒ BSN	[REDACTED]

- 2.2 Wat zijn de gegevens van de gemachtigde?

Naam gemachtigde	[REDACTED]	☒ Dhr. ☐ Mw.
Adres of postbus	van der Boechhorststraat 1	
Postcode en Plaats	1081 BT Amsterdam	

3 Inhoud machtiging

3.1 Wilt u een nieuwe machtiging afgeven?

☒ Ja > Geef bij vraag 3.3 aan wat de gemachtigde voor u mag doen.

☐ Nee

3.2 Wilt u een machtiging intrekken?

☐ Ja > Ga door naar vraag 4

☐ Nee

3.3 Wat mag de gemachtigde voor u doen?

☒ Een projectvergunning aanvragen

☒ Een wijziging op een verleende projectvergunning aanvragen

☒ Een melding doorgeven op een verleende projectvergunning

☐ Een bezwaarschrift indienen en daarover communiceren met de Centrale Commissie Dierproeven en alle andere handelingen verrichten die nodig zijn voor een goede afwikkeling van het bezwaarschrift.

☐ Alle bovenstaande opties

4 Ondertekening

4.1 Ondertekenen het formulier en stuur het als bijlage met uw aanvraag mee via de beveiligde e-mailverbinding of per post:

Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Ik heb dit formulier volledig en naar waarheid ingevuld. Ik verklaar dat ik bekend ben met alle voorwaarden van wet en regelgeving (Wod, dierproevenbesluit en dierproevenregeling).

Naam gemachtigde

Datum

3 0 - 0 7 - 2 0 1 5

Handtekening
portefeuillehouder
van de instelling

Handtekening
gemachtigde



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

VU Medisch Centrum
p/a [REDACTED]
van der Boeฮอร์ststraat 1
1081 BT AMSTERDAM
[Barcode]

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD114002015201
Bijlagen
2

Datum 03-08-2015
Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw [REDACTED]
Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 3 augustus 2015.
Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD114002015201. 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: 11400
Naam instelling of organisatie: VU Medisch Centrum
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 53815211
Straat en huisnummer: de Boelelaan 1117
Postcode en plaats: 1081 HV AMSTERDAM
IBAN: [REDACTED]
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: [REDACTED]

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens gemachtigde

KvK-nummer: 11400
BSN: [REDACTED]
Naam: [REDACTED]
Adres: van der Boeฮอร์ststraat 1
Postcode en plaats: 1081 BT AMSTERDAM

Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Ja

Wat mag de gemachtigde doen?

- ☒ Een projectvergunning aanvragen
- ☒ Een wijziging op een verleende projectvergunning aanvragen
- ☒ Een melding doorgeven op een verleende projectvergunning
- ☐ Een bezwaarschrift indienen en daarover communiceren met de Centrale Commissie Dierproeven en alle andere handelingen verrichten die nodig zijn voor een goede afwikkeling van het bezwaarschrift
- ☐ Alle bovenstaande opties

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u?

- ☒ Nieuwe aanvraag
- ☐ Wijziging op een (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
- ☐ Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

Over uw project

Geplande startdatum: 1 september 2015
Geplande einddatum: 31 augustus 2020
Titel project: Pathofysiologie en therapie ontwikkeling voor hematologische maligniteiten (leukemie, myeloom, myelodysplasie, myelofibrose)
Titel niet-technische samenvatting: Pathofysiologie en therapie ontwikkeling voor hematologische maligniteiten (leukemie, myeloom, myelodysplasie, myelofibrose)
Naam DEC: DEC-VU-VUMC
Postadres DEC: Van der Boerhorststraat1, Transistorium, kamer [REDACTED], 1081 BT Amsterdam / The Netherlands
E-mailadres DEC: [REDACTED]

Betaalgegevens

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

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen: [x] Projectvoorstel
[x] Beschrijving Dierproeven
[x] Niet-technische samenvatting
Overige bijlagen: [x] Melding Machtiging
[x] DEC-advies

Ondertekening

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Plaats: Amsterdam
Datum: 3 augustus 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

VU Medisch Centrum
p/a [REDACTED]
van der Boeฮอร์ststraat 1
1081 BT AMSTERDAM
[Barcode]

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD114002015201
Bijlagen
2

Datum 03-08-2015
Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 3 augustus 2015
Vervaldatum: 2 september 2015
Factuurnummer: 201570201

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvegrunning dierproeven Betreft aanvraag AVD114002015201	€ 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.



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Medisch Centrum VUMC
t.a.v. [REDACTED]
De Boelelaan 1117
1080 HV Amsterdam
Nederland

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
AVD114002015201

Uw referentie

Datum 23 september 2015
Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Bijlagen
1

Geacht [REDACTED],

Op 03 augustus 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project pathofysiologie en therapie ontwikkeling voor hematologische maligniteiten (leukemie, myeloom, myelodysplasie, myelofibrose). Met aanvraagnummer AVD114002015201. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag gedeeltelijk goed op grond van artikel 10a van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet). De commissie ziet uw aanvraag als 2 afzonderlijke projecten te weten: deel A bestaand uit subdoel A1 en A2, bijlage dierproeven 3.4.4.1 en deel B, bestaand uit subdoel B1, B2 en B3 bijlage dierproeven 3.4.4.2. De huidige projectaanvraag behandelt een project met 2 verschillende doelstellingen die elk een eigenstandige beoordeling behoeven. Hieraan liggen artikel 10a lid 7 en art. 10a2 van de wet ten grondslag.

Deze vergunning betreft Deel A van uw projectaanvraag, dit betreft het deel bijlage dierproeven 3.4.4.1. Hierbij geldt de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning. Deze algemene voorwaarde wordt gesteld bij vergunningen met een looptijd van 5 jaar. Dit om te voldoen aan datgene wat volgt uit artikel 10 lid 1a van de wet.

U kunt met deel A van uw project pathofysiologie en therapie ontwikkeling voor hematologische maligniteiten (leukemie, myeloom, myelodysplasie, myelofibrose) starten. De vergunning wordt afgegeven van 24 september 2015 tot en met 31 augustus 2020.

De commissie verzoekt u voor deel B van uw project een aparte aanvraag in te dienen. In deze separate aanvraag verzoekt de commissie u aandacht te besteden aan onderbouwing van de selectie criteria op basis waarvan therapeutica uit de in vitro selectie geschikt worden geacht voor in vivo toepassing.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Vrije Universiteit Amsterdam/ VU medisch centrum gevoegd. Dit advies is opgesteld op 3 augustus 2015. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a lid 3 van de wet. Wij kunnen ons niet geheel vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Omdat er geen sprake is van een coherent project waarvan alle projectonderdelen nodig zijn om het gezamenlijke doel te behalen. Wij nemen dit advies van de

commissie niet geheel over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving liggen ten grondslag aan dit besluit.

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 de rechter kantlijn in deze brief.

Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. 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:



ir. G. de Peuter
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: Vrije Universiteit Medisch Centrum VUMC Amsterdam

Adres: De Boelelaan 1117

Postcode en woonplaats: 1081 HV Amsterdam

Deelnemersnummer: 11400

deze projectvergunning voor het tijdvak 24 september 2015 tot en met 31 augustus 2020, voor het project met aanvraagnummer AVD114002015201, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Vrije Universiteit Amsterdam/ VU medisch centrum. Hierbij is afgeweken van het DEC-advies omdat de commissie in de aanvraag twee afzonderlijke projecten onderscheidt.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is UHD/ onderzoeker

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 6 augustus 2015
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 3 augustus 2015;
 - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 3 augustus 2015;
 - c. Advies van Dierexperimentencommissie, ontvangen op 3 augustus 2015;
 - d. Herziene versie van de NTS voor het vergunde deel van het project ontvangen op 22 september 2015.

Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst	Voorwaarden
Pathofysiologie van humane primaire hematologisch tumoren die groeien in een [redacted] in muizen, t.b.v. karakterisering en biobanking (A1) en veranderingen in het bot metabolisme en de stromafunctie in de [redacted]	Muizen, vrouwelijk 8-9 weken	2100/ 5 jaar waarvan n=1650 voor experimenten en n=450 voor fok	matig	

Voorwaarden

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 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.

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

Datum

1 september 2015

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD114002015201

dierenlijnen, wanneer bij de nakomelingen niet evenveel of meer, pijn, lijden, angst, of blijvende schade wordt waargenomen of verwacht dan bij het inbrengen van een naald. Er wordt dan door een dierenarts of een andere ter zake deskundige beslist of het dier in leven zal worden gehouden. Een dier wordt gedood als aannemelijk is dat het een matige of ernstige vorm van pijn, lijden, angst of blijven schade zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.

Volgens artikel 13b 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.