

	Inventaris Wob-verzoek W16-07S								
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTS2015350								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel				x		x	x	
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1,2,3				x		x	x	
5	DEC-advies				x		x	x	
6	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
7	Verzoek aanvulling				x		x	x	
8	Aanvulling onderzoeker				x		x	x	
9	Mails voorgenomen besluit 2-2-2016				x		x	x	
10	Advies CCD		x						x
11	Beschikking en vergunning				x		x	x	
12	Mail beschikking 5-2-2016				x		x	x	
13	Mail terugkoppeling DEC 9-2-2016				x		x	x	



16 DEC. 2015

AVD 103002015350

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?

Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.

☒ Ja > Vul uw deelnemernummer in

☐ Nee > U kunt geen aanvraag doen

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

Naam instelling of organisatie

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde

KvK-nummer

4 1 0 5 5 6 2 9

- 1.3 Vul de gegevens van het postadres in.
Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.

Straat en huisnummer

Geert Grooteplein

10

Postbus

9101,

Postcode en plaats

6500HB

Nijmegen

IBAN

NL90ABNA0231209983

Tenaamstelling van het rekeningnummer

UMC st Radboud

- 1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters

☒ Dhr. ☐ Mw.

Functie

Afdeling

Telefoonnummer

E-mailadres

- 1.5 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.

(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 *Melding Machtiging* mee met deze aanvraag
- ☐ Nee

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 1 4 _ 0 1 _ 2 0 1 6
- Einddatum 1 4 _ 0 1 _ 2 0 2 1
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Adoptive T cell therapy and DC vaccination in hematological malignancies
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Immuuntherapie tegen kanker: van ontwikkeling naar doelgerichte behandeling
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC RU DEC
- Postadres Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen
- E-mailadres

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? ☒ Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 741,00 Lege
☐ Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.
☒ Via een eenmalige incasso
☐ Na ontvangst van de factuur

5 Checklist bijlagen

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

6 Ondertekening

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

Centrale Commissie
 Dierproeven
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag

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

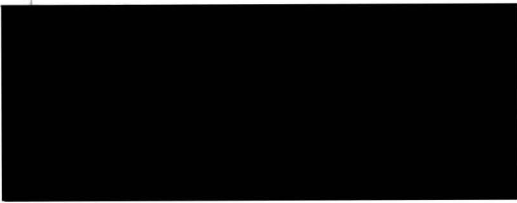
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
- dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan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

Naam 

Functie 

Plaats Nijmegen

Datum 14 - 12 - 2015

Handtekening 

Form Project proposal

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
1.3	Provide the title of the project.	Adoptive T cell therapy and DC vaccination in hematological malignanies

2 Categories

2.1	Please tick each of the following boxes that applies to your project.	☒ Basic Research ☒ Translational or applied research ☐ Regulatory use or routine production ☐ Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare dier ☐ Research aimed at preserving the species subjected to procedures ☐ Higher education or training
-----	---	---

☐ Forensic enquiries

☐ Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

3 General description of the project

3.1 Background

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

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

The immune system is a powerful defense mechanism against foreign pathogens, but also against altered or damaged cells, such as cancer cells. The innate immune system, including natural killer (NK) cells and dendritic cells, is the first line of defense and has the power to quickly respond to danger signals. Subsequently, potent innate antigen-presenting cells (like dendritic cells) activate adaptive immune effector cells, including T cells. These effectors have the potential to generate long-lasting protective immunity. Nevertheless, in cancer major dysregulation of the immune system is observed. Despite initial success of standard therapies, still too many patients have progressive disease or develop relapse. This indicates the urgency to develop novel potent therapies to boost and support anti-tumor immunity. In our project we mainly focus on hematological cancers, which account for approximately 7% of all newly diagnosed cancers in Europe and are categorized in four major groups: acute leukemia's, chronic leukemia's, malignant lymphomas and plasma cell malignancies. However, our immunotherapeutic strategies could also be applied in other cancers.

Allogeneic stem cell transplantation (allo-SCT) is a potent cellular immunotherapy due to donor-derived graft-versus-tumor responses mediated by T cells and NK cells.(1) These immune cells have the potential to competently eliminate residual tumor cells, mediating long-term remission and possibly cure of the disease.(2) However, allo-SCT is associated with high morbidity and mortality due to conditioning-related toxicity, infections and graft-versus-host-disease. Furthermore, in many patients the induction and/or reactivation of anti-tumor responses is inadequate, and tumor cells exploit immune suppressive mechanisms to escape anti-tumor immune responses. Therefore, potent new and/or improved immunotherapies are required to boost anti-tumor immunity to prevent patients from developing progressive or relapsed disease.(2)

T cells can be used as therapy against hematological malignancies. However, it is essential that these T cells recognize and attack only the malignant cells. This would generate a specific, effective and safe treatment. Especially in the setting of allo-SCT, donor T cells could also recognize and destruct healthy patient' cells, most often in the skin, liver, intestinal tract and lungs. This severe complication is called graft-versus-host-disease, and can be fatal for the patient. In the non-transplant setting recognition of antigens expressed by healthy tissues could induce autoimmunity. Therefore, it is essential to specifically target antigens expressed by the tumor cells (or the patient hematological cells in the setting of allo-SCT), such as tumor antigens or minor histocompatibility antigens.(3, 4) This would boost the anti-tumor effect without risk of inducing graft-versus-host-disease or other autoimmune-based side effects. To generate T cells recognizing only the antigen of interest, different strategies can be applied. Either in vitro culturing with dendritic cells presenting the antigen of interest, or gene-modification of T cells with T cell receptors (TCRs) for the

specific antigen. Both strategies will be used in this project to investigate T cell therapy against hematological malignancies, where the efficacy of targeting different antigens will be investigated.

Notably, besides antigen-specificity, also high T cell potency is essential. When tumor-reactive T cells are generated in vitro, T cell differentiation is initiated resulting in mainly terminally differentiated effector T cells that become quickly exhausted. In contrast, early memory T cells have been shown to exhibit better proliferative and self renewal capacity, and might thereby exert a more potent anti-tumor effect. Therefore, to generate a potent therapeutic T cell product, we aim to inhibit T cell differentiation during the in vitro generation of tumor-reactive T cells. Previous in vitro and in vivo studies showed that inhibiting differentiation of T cells is a promising strategy to boost anti-tumor immunity which will be further investigated in this project.(5)

Moreover, to boost the effect of T cell therapy, or to induce a T cell response in vivo, dendritic cell-based vaccination can be used as a promising strategy (6-8). Dendritic cells are the most potent antigen-presenting cells of the immune system. In addition to their crucial role in T cell activation, crosstalk between dendritic cells and NK cells has also been shown to be highly important for proper anti-tumor immunity formation.(9, 10) Using dendritic cells to boost both T cells and NK cells could enhance both the direct innate immune defence, as well as the long-term immune protection against malignant cells.

Multiple clinical vaccination trials have been performed in the past two decades, where monocyte-derived dendritic cells are infused into patients for induction of anti-tumor immunity.(6) Although these trials have shown that dendritic cell vaccination is feasible, safe, and capable of promoting immune responses, only a minority of patients has clinical benefit. This illustrates the urgency for improved dendritic cell vaccine efficacy and potency. Natural occurring myeloid dendritic cell and plasmacytoid dendritic cell subsets are highly interesting for clinical exploration, as these dendritic cell types have the capacity to potentiate each others' T cell stimulatory potential via cross-talk. Using these natural subsets instead of monocyte-derived dendritic cells could greatly enhance the clinical responses. To efficiently generate clinical scale numbers of highly mature and functional dendritic cells, we developed a unique ex vivo culture protocol to generate these natural dendritic cell subsets from hematopoietic progenitor cells.(7) Moreover, this protocol creates the possibility to modify the dendritic cells for further functional improvements (e.g. via silencing of co-inhibitory molecules). Previous studies showed that these dendritic cell vaccines are a promising strategy to boost anti-tumor immunity which will be further investigated in this project.

References

1. Appelbaum FR. Haematopoietic cell transplantation as immunotherapy. *Nature*. 2001;411(6835):385-9.
2. Bachireddy P, Burkhardt UE, Rajasagi M, Wu CJ. Haematological malignancies: at the forefront of immunotherapeutic innovation. *Nature reviews Cancer*. 2015;15(4):201-15.
3. Spierings E. Minor histocompatibility antigens: past, present, and future. *Tissue antigens*. 2014;84(4):374-60.

4. [REDACTED]
5. [REDACTED]
6. [REDACTED]
7. [REDACTED]

8.

9. Ferlazzo G, Pack M, Thomas D, Paludan C, Schmid D, Strowig T, et al. Distinct roles of IL-12 and IL-15 in human natural killer cell activation by dendritic cells from secondary lymphoid organs. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2004;101(47):16606-11.

10. Gerosa F, Gobbi A, Zorzi P, Burg S, Briere F, Carra G, et al. The reciprocal interaction of NK cells with plasmacytoid or myeloid dendritic cells profoundly affects innate resistance functions. Journal of immunology. 2005;174(2):727-34.

11.

12.

13.

14.

15.

16.

17.

3.2 Purpose

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

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

Potent new and/or improved immunotherapies are required to boost anti-tumor immunity to prevent patients from developing progressive or relapsed disease. **Therefore, in this project we aim to study and improve additive therapies against hematological malignancies, focussing on tumor-reactive T cells and dendritic cell vaccination. To achieve this objective we use 2 different strategies:**

1. **Improve the in vitro generation of tumor-reactive T cells (e.g. exploring the recognition of novel tumor-antigens, or inhibition of T cell differentiation).**
2. **Improving dendritic cell vaccination to boost in vivo T cell and NK cell activation (e.g. by in vitro generation of dendritic cells, and boosting/modification of their stimulatory capacity).**

Experiments described in this project will answer the question whether these strategies are promising for subsequent clinical translation, which has proven very valuable for clinical translation in previous studies. We have obtained broad experience with this strategy of development and preclinical in vivo characterization of these immune therapies.

In the [REDACTED] we have long-standing experience with patient diagnostics, as well as investigation of tumor characteristics and tumor-reactive immune responses in patients with hematological malignancies. Furthermore, we develop and improve the anti-tumor potential of various key players (including T cells, NK cells and dendritic cells) essential in (the regulation of) immune protection against cancer. Our research encompasses basal studies that focus on gaining more insight into the development and differentiation of immune cells, as well as into the mechanisms underlying immune effector (dys)functionality.(4-8, 11-17) Furthermore, we perform translational studies to explore our novel potent immunotherapeutic approaches, either as monotherapy or in combination with other therapies for treatment of cancer.(4-8, 11-17) These studies contribute to novel treatment options for cancer patients. [REDACTED]

3.3 Relevance

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

This research will provide more insight into the function of the immune system in the battle against cancer, and explore novel immunotherapeutic strategies that can be used as monotherapy or potentiated in combination therapies. Our data will be published in peer-reviewed journals and will be presented at (inter)national conferences, thereby inform the scientific community and help them in their work.

Moreover, the results obtained in our research studies will contribute to the development and application of new immunotherapies in hematological cancer and could be further explored to other cancer fields. **In The Netherlands, 2000-3000 patients are diagnosed every year with a hematological malignancy. Though this varies between type of malignancy, relapse rates are up to 60%. For these patients the development of additional therapy is essential, where T cell and dendritic cell therapy could induce a long term anti-tumor response. By exploiting novel strategies on the kind of tumor antigen which is targeted, the different therapies developed in this application could be used to be able to treat as many patients possible.** The application of novel and more potent (combinations) therapies will eventually lead to improved cancer-free survival and improved quality of life, which is essential in these types of cancer. Additionally, curing cancer and prevention cancer relapse will positively impact healthcare costs.

3.4 Research Strategy

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

First, extensive in vitro studies will be performed to analyse the T cells and dendritic cells on different components of the strategies. These include for T cells their phenotype, transcriptome, in vitro expansion capacity, killing capacity. For the dendritic cells this includes their phenotype, stimulatory capacity towards T and/or NK cells, and cytokine production. Only promising cell products and (combination) strategies will be tested in animal models.

For dendritic cell therapy, we will study the survival and stimulatory capacity (as read out by T cell and/or NK cell number and phenotype) of the dendritic cells. In addition, we will study the anti-tumor effect (induced by the dendritic cells via the T cells and/or NK cells) in both tumour growth, as well as survival of tumour-bearing mice. This can be tested as a single product, or in comparison to other/previously tested cell products (e.g. monocyte-derived dendritic cells).

For the T cells, improvement of the T cell therapy product will be tested on their expansion capacity and phenotype upon adoptive transfer (e.g. after dendritic cell vaccination or tumor exposure). Moreover, we will test their anti-tumor effect (with or without dendritic cell vaccination) in both tumour load as well as survival of tumour-bearing mice. Lastly, we will test the self-renewal capacity of the T cells to test their long-term anti-tumour protection. Finally, successful T cell products and successful dendritic cell products can be combined in subsequent animal experiment for further research towards the optimal strategy.

For both the T cell products as well as the Dendritic cell products, the specific research question as well as in vitro data will be used to decide whether procedure 1 or 2 will be commenced first. If the first procedure is successful (e.g. significant effect between tested cell product and control setting), it will also be tested in the other procedure (Procedure 2 after successful procedure 1 and other way around). If the first procedure is unsuccessful, new in vitro data will first be generated to further optimize the cell product before further in vivo testing.

These strategies will be performed in several well established mouse models that are well running in the lab. The relevance and investigational strategy of these approaches are further described in section 3.4.2.

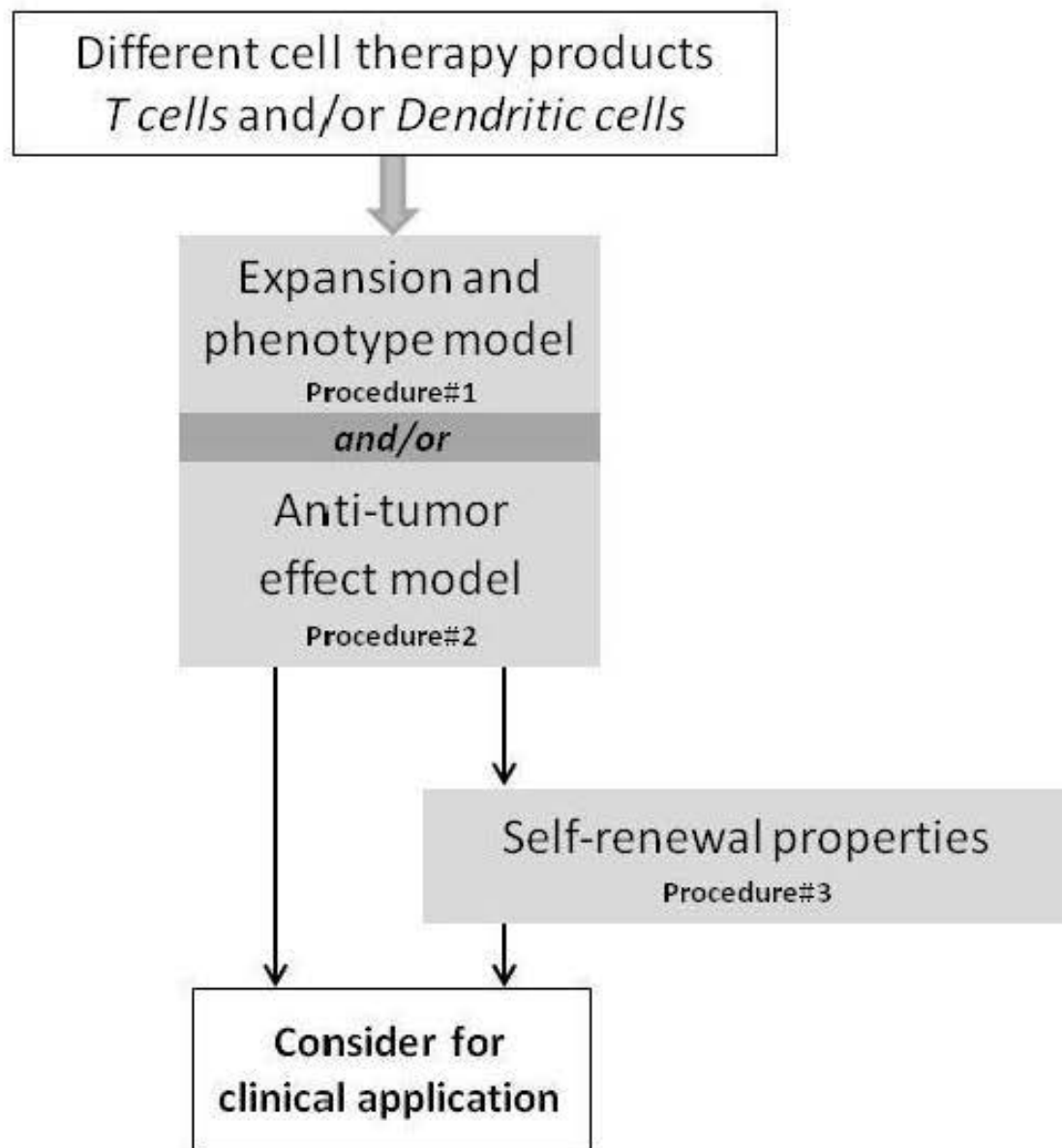


Figure Decision Tree. Strategy of testing the different immune cell products. The different products will be tested in procedure #1 and/or #2. With successful data in one or both of these procedures, the product could be considered for clinical application, or further tested for its self-renewal properties in procedure #3.

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

To investigate the potency of different T cell and dendritic cell products against cancer, we designed 3 different animal procedures that will allow us to address the following points:

Improving dendritic cell products for vaccination strategies

To improve dendritic cell products for a superior anti-tumor effect, we will explore the potency of dendritic cells generated from hematopoietic progenitor cells. Different strategies in the generation of the cells, as well as in modulation of improving their stimulatory capacity towards T and NK cells will be extensively studied *in vitro*. The successful products will then be investigated for their tumor-reactive T and/or NK cell activation-capacity *in vivo* (**procedure #1**). Furthermore, we will investigate the anti-tumor potency of the dendritic cell products via tumor-reactive T and/or NK cells against hematological malignancies (**procedure #2**). These will be tested compared to no, or control dendritic cells, which can be done with up to 6 groups of different cell products. If experiments are successful, combination of the different strategies (e.g. different dendritic cell subsets and silencing of co-inhibitory molecules) could be investigated.

Improving adoptive T cell products for adoptive transfer

To improve T cell therapy, we focus on the antigen-specificity of the T cells as well as their differentiation status. As mentioned, in T cell therapy, the choice of antigen is essential in the effectiveness and safety of the therapy. Exploring different strategies for the generation of tumor-reactive T cells (e.g. TCR-transduction), creates a new field of antigens. These different antigen-specific T cell products can be tested in (**procedure #1**) for their expansion capacity, and in (**procedure #2**) for their anti-tumor capacity. In addition, to improve the strength of T cells for adoptive therapy, differentiation of T cells is inhibited. After extensive *in vitro* analysis, the potent tumor-reactive T cell products will be tested *in vivo* for their expansion capacity and phenotype upon *in vivo* stimulation (**procedure #1**), as well as their anti-tumor effect against hematological malignancies (**procedure #2**). If sufficient improvement of the anti-tumor response against hematological malignancies and/or a successful expansion of the tumor-reactive T cells is observed in these experiments, we will study the self-renewal capacity of the T cells when T cell differentiation was inhibited. T cells with high self-renewal capacity will result in a long-term persistence of these cells in the patient, and could therefore give long-term protection against the malignant cells. This will be tested in a secondary transplant model (**procedure #3**), compared to control T cells, which can be done with up to 6 groups of different tumor-reactive T cell products. If experiments are successful, the combination of the different strategies (e.g. TCR transfer and inhibition of T cell differentiation, or different dendritic cell vaccinations) could be investigated.

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

In the development of immune therapies against hematological malignancies, this project focusses on T cells and dendritic cells. As dendritic cells instruct and guide the T cells towards the malignant cells, these therapeutic strategies are connected. In the

experiments to test and analyse therapeutic potential of the different T cell products, dendritic cells will be used to support and boost the T cells. Moreover, in the models to analyse the therapeutic potential of the dendritic cell products, their stimulatory effect on T and/or NK cells will be used for readout. For clinical application, adoptive T cell therapy and dendritic cell vaccination would favourably be combined as therapy.

In this project, the different immune cell products we will (after extensive *in vitro* studies (go/no-go moment)) evaluate their:

- (Induction of) Expansion and/or phenotype of T and/or NK cells upon *in vivo* stimulation
- Anti-tumor potential of/via tumor-reactive T cell and/or NK cell products against hematological malignancies
- When relevant, study the self-renewal capacity of the immune cell therapy products. The self-renewal capacity will only be studied when either the expansion or anti-tumor potential experiments showed promising data toward a successful strategy/therapy (go/no-go moment).

The procedures described in this application will let us determine the potency of the different cell products, to decide which products could be selected for further clinical development. After each experiment we will evaluate whether the therapeutic strategy/product is promising for the therapy of cancer (go/no-go moment). If the therapeutic cell products shows unfavorable or non-successful *in vivo* behavior this will serve as a no go for further evaluation. In case the product requires further optimization, new *in vitro* studies will be carried out before further animal studies will be performed.

Successful strategies will be combined in further *in vitro* experiments and *in vivo* animal models. The experiments described in this application will be allow us to test and select the best individual immune therapy products and test their combinations, which is essential for selection of the optimal strategies for clinical development.

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

Serial number	Type of animal procedure
1	#1 Expansion and phenotype model
2	#2 Anti-tumor effect model
3	#3 Self-renewal properties of T cells in secondary transplant model

Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number 1	Type of animal procedure #1 Expansion and phenotype model

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

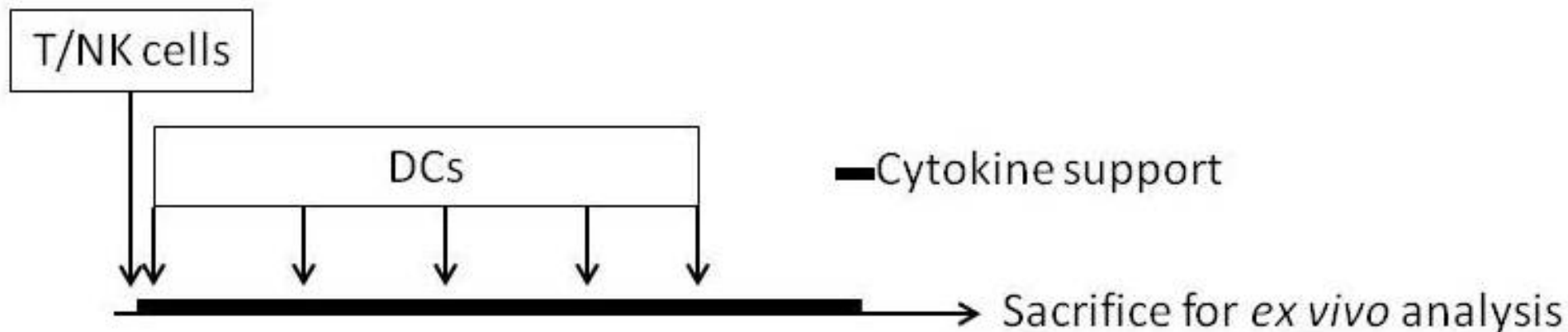
Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

As it is important for a good anti-tumor effect that T cells proliferate well, and dendritic cells induce this proliferation, this model is performed to test the expansion capacity of T cells. In addition, the phenotype and function of T and NK cells will be investigated upon in vivo activation which will reveal more information on the immunological strength of the cell product. This will be performed for the different tumor-reactive T cell products, where we will compare the expansion/phenotype/function of different T cell products to each other. In addition this will be tested for the different dendritic cell products, where we will test the expansion/phenotype/function of tumor-reactive T and/or NK cells upon stimulation by different dendritic cell products. Therefore, immune deficient mice are infused with human (tumor-reactive) T or NK cells, which are then stimulated (to induce expansion) with dendritic cells. The primary outcome of the experiment is the ex vivo analysis (cell number, phenotype and function) of the T and/or NK cells.

This will be determined during the experiment via blood collections (e.g. tail vein punctures with a weekly interval), and upon sacrifice of the mice which will take place one week after the last dendritic cell vaccination.

These outcome parameters have successfully been used in previous studies performed [REDACTED] and by other international research groups.

The attached figure is a representative example of the model.



References

1.

2.

3.

4.

5. Gattinoni, L et al. A human memory T cell subset with stem cell-like properties. Nature Medicine 2011. 17(10). 1290-98

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

Mice are infused with T and/or NK cells (i.v., one or multiple infusions, max 3 infusions in 2 weeks) followed by dendritic vaccination (up to 6 vaccines, i.p. at 1 to 2 times per week). Previous experiments showed that dendritic cell vaccinations with weekly intervals are needed for antigen-specific T cell expansion in mice.

As we are working with immunodeficient mice which lack cytokine production, human cytokines are given for T and/or NK cell support (i.p. or s.c. max every 2-3 days, up to one week after last dendritic cell vaccine) (1-5). The maximum of an injection every 2-3 days is based on rhIL-15, which we currently use as a supportive cytokine for T cells. This is infused every 2-3 days due to the short half-life of rhIL-15 (6). Other cytokines could be tested in this model for optimisation and to reduce the number of injections, and thereby discomfort. As cytokine support is needed for NK and T cell persistence in immunodeficient mice, the maximum length of cytokine support will be 6 weeks, which is one week after the last dendritic cell vaccination.

T and/or NK cell expansion will be monitored by weekly blood collection (e.g. weekly tail puncture, max 100ul).

Mice are sacrificed for ex vivo analysis one week after the last dendritic cell vaccination, resulting in a maximum duration of the experiment of 6 weeks. If blood is collected at sacrifice, this is performed under anesthesia (e.g. via heart puncture).

References

1. Sun et al. Human Interleukin-15 Improves Engraftment of Human T Cells in NOD-SCID Mice Clin Vaccine Immunol. 2006. 13(2) 227-234

2.

3.

4.

5.

6. Hisataka Kobayashi, J et al. Differences of Biodistribution, Pharmacokinetics, and Tumor Targeting between Interleukins 2 and 15. CANCER RESEARCH 2000. 60. 3577–3583

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

The different immune cell products will first be extensively tested in vitro before in vivo studies will be performed. Only the immune cell products with promising in vitro results will be selected for animal studies with appropriate conditions and their controls to reduce the number of mice.

The group size required for each experiments will be determined:

- According to previous in vitro and in vivo experiments performed in the group;
- According to the literature describing similar experimental designs;
- Using validated statistical approaches based on power calculation, expected effect of the treatment, standard deviation, number of comparisons, and read-out parameters.

B. The animals

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

Species: Mouse. These are the lowest possible species to study the human immune system. To study human immune functions in mice we will use immune deficient strains lacking T, B and NK- cells, which will not reject injected human cells.

Origin and life stage: Mice of [REDACTED] or commercially available will be used at an age of 6-25 weeks at the start of experiments.

Sex: In these experiments both females and males will be used. However, to prevent differences caused by sex of the mice during inflammatory reaction (by for instance hormones and size of lymphoid organs), all mice within one experiment will be of the same sex.

Estimated number: Based on the number of animal experiments performed in previous years, and on the research plans we developed for the 5 forthcoming years, we estimate a need of 1200 mice in total (i.e. 8-10 mice per group, 2-6 groups per experiment, 15-20 experiments). **Each experiment will always have at least one control group and up to 5 groups of different modulated therapeutic products. An example would be control T cells and 5 different T cells products, each treated with a different modification protocol. The number of groups will be based on in vitro experiments in which different therapeutic products will be compared before experiments in vivo will be performed.**

This includes mice needed for experiments to optimize the model (e.g. testing new cytokines for support of T and NK cells) and for training of (new) art9 and art12 employees for the included procedures.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Immunodeficient mice (e.g. NSG mice)	██████████ or commercially available	1200	6-25 weeks old

C. Re-use

Will the animals be re-used?

☒ No, continue with question D.

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

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

☐ No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

The amount of mice will first be minimized by doing extensive in vitro investigations into the different immune cell therapy products. In addition, only the most promising strategies will be considered for in vivo evaluation.

Replacement: Animal models are most often required in cancer research to validate and to translate a novel approach to the clinical situation. Following intensive in vitro studies, new approaches should be tested in vivo to mimic the in situ situation found in patients, what we achieve using mouse models. No established pre-clinical models in lower animal species are available for our research purpose.

Reduction: Particular attention is paid to the determination of the optimal size of each group, for each experiment that is required to reach statistical significance. Use of fewer animals could lead to inadequate interpretation of the results.

Refinement: To reduce anxiety, mice will be housed in groups and not individually. The general health of the animals will be monitored daily by the

researcher and/or the biotechnician. The methods that we use are well established and the experiments will be performed by experienced researchers. Previous research by our group and others has shown the translational value of this type of studies.

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

To prevent discomfort due to stress, experiments are performed by experienced staff, and mice are housed in social housing. To minimize animal suffering, pain or fear, repeated injections will be made at different sites when possible. Humane endpoints will be monitored precisely.

Repetition and Duplication

E. Repetition

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

Non-applicable

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

☒ No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

☒ No > Continue with question H.

G. Location where the animals procedures are performed

☐ Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

☐ No > Continue with question I.

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

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

The biotechnical procedures described here only include injections and do not require pain relief. However, terminal blood collection will be performed under anesthesia without recovery.

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

The following forms of discomfort can occur:

- 1) Pain and stress by injections, repeated injections or blood collections.
- 2) Pain and illness related to xenograft reactions.

Explain why these effects may emerge.

The pain, stress and discomfort in this experiment is mainly induced by (multiple) injections and blood collections. In addition, the human T cell could induce a xenograft reaction, where the human T cells attack the mouse tissues. This can particularly cause damage in the gut and skin of infused mice, resulting in diarrhea and bad fur conditions.

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

The general humane endpoints (**more than 20% weight loss**, hunched statue, bad fur condition, loss of activity) will apply.

J. Humane endpoints

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

☐ No > Continue with question K.

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

General humane endpoints will be applied in all mouse experiments. Per experiment specific humane endpoints will be described in addition to the general humane endpoints, to be sure to prevent unnecessary suffering of the mice. **In this particular procedure the humane endpoints are then severe weight loss (>20%) and loss of activity.**

Indicate the likely incidence.

The incidence of the xenograft reaction, and thereby the expected incidence of the humane endpoints is very low (<1%)

K. Classification of severity of procedures

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

Moderate for all mice

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

☐ No

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

Mice will be sacrificed at the end of experiment for ex vivo analysis.

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

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

☒ Yes

Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number 2	Type of animal procedure #2 Anti-tumor effect model

2 Description of animal procedures

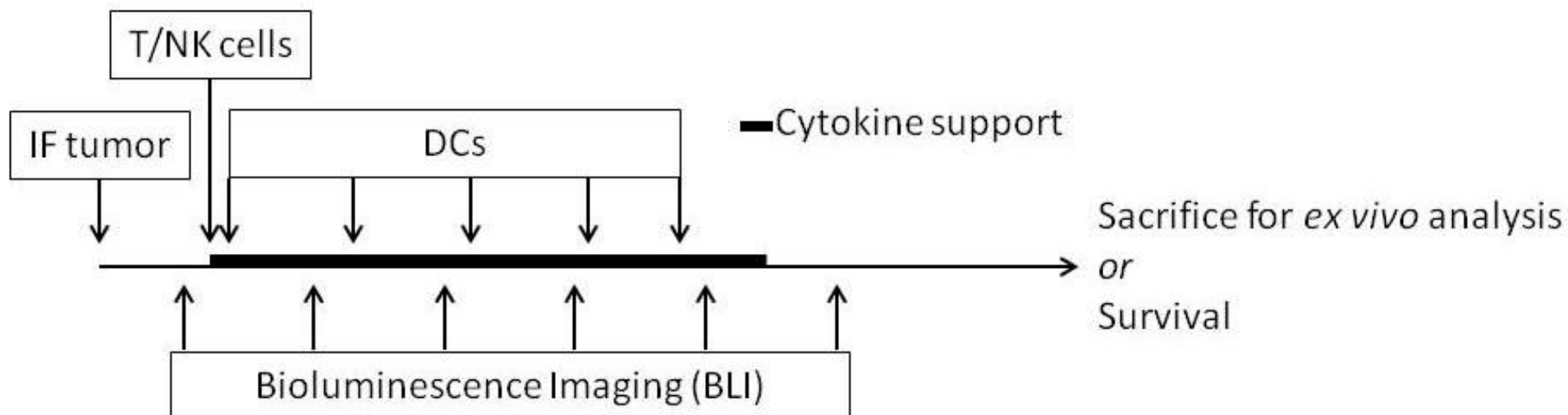
A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

In this model we will test the anti-tumor potential of, or induced by, the different immune cell products (e.g. anti-tumor effect of different T cell products, or antitumor effect of T and/or NK cells upon stimulation by different dendritic cell products). Therefore, mice are injected with a luciferase-expressing hematopoietic tumor cell line in their femur to mimic leukemic growth at its natural location. Then mice are infused with human (tumor-reactive) T and/or NK cells, which are stimulated (to activate and induce expansion) with subsequential dendritic cell vaccination. The primary outcome of the experiment is the tumor growth which can be monitored by bioluminescence imaging. In addition, mice can be sacrificed one week after their last dendritic cell vaccine to match the anti-tumor effect with the ex vivo analysis of the NK and/or T cells, or can be monitored for survival.

These outcome parameters have successfully been used in previous studies performed by our research group and by other international research groups.

The attached figure is a representative example of the model.



References

1. [REDACTED]

2. [REDACTED]

3. Gattinoni, L et al. A human memory T cell subset with stem cell-like properties. Nature Medicine 2011. 17(10). 1290-98

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

Mice are intra femurally (i.f.) injected with hematopoietic tumor cells under anesthesia, to mimic tumor growth in the natural location. Tumor growth will be monitored using repeated (e.g. weekly) Bioluminescence Imaging (BLI) after luciferin injection (ip or iv) under anesthesia. After an established tumor, T and/or NK cells will be infused (i.v., one or multiple infusions, max 3 infusions in 2 weeks) followed by dendritic cell vaccination (up to 6 vaccines, i.p. at 1 to 2 times per week). Previous experiments showed that dendritic cell vaccinations are needed for antigen-specific T cell expansion in mice.

As we are working with immunodeficient mice which lack cytokine production, human cytokines are given for T and/or NK cell support (i.p. or s.c. max every 2-3 days, up to one week after last dendritic cell vaccine). The maximum of an injection every 2-3 days is based on rhIL-15, which we currently use as a supportive cytokine for T cells. This is infused every 2-3 days due to the short half-life of rhIL-15. Other cytokines could be tested in this model for optimisation and to reduce the number of injections, and thereby discomfort. As cytokine support is needed for NK and T cell persistence in immunodeficient mice, the maximum length of cytokine support will be 6 weeks, which is one week after the last dendritic cell vaccination.

T and/or NK cell expansion will be monitored by weekly blood collection (e.g. weekly tail puncture, max 100ul).

Mice are either sacrificed for ex vivo analysis one week after the last dendritic cell vaccination, or monitored for survival. In case of ex vivo analysis, the experiment will have a maximum duration of 8 weeks. If mice are monitored for survival according to the humane endpoints, the experiment will have a maximum duration of 100 days. If blood is collected at sacrifice, this is performed under anesthesia (e.g. via heart puncture).

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

The amount of mice will first be minimized by doing extensive in vitro investigations into the different immune cell products. In addition, only the most promising strategies will be considered for in vivo evaluation.

The group size required for each experiments will be determined:

- According to previous in vitro and in vivo experiments performed in the group;
- According to the literature describing similar experimental designs;
- Using validated statistical approaches based on power calculation, expected effect of the treatment, standard deviation, number of comparisons, and read-out parameters.

We will also take into account drop out of animals during the experiment due to experimental procedures. **In these experiments this will be based on the i.f. injections. around 5-10% of the i.f. injections results in a misinjection (e.g. blockade of the needle resulting in no injection, or injection outside the femur). This can be determined either during the i.f. injection (then mice will be sacrificed without recovery from anesthesia), or during the first BLI before group allocation. These mice will be sacrificed and excluded from the experiment. Therefore, 5-10% extra mice will be included in experiments which include i.f. injection of tumor cells.**

B. The animals

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

Species: Mouse. These are the lowest possible species to study the human immune system. To study human immune functions in mice we will use immune deficient strains lacking T, B and NK- cells, which will not reject injected human cells.

Origin and life stage: Mice [REDACTED] or commercially available will be used at an age of 6-25 weeks at the start of experiments.

Sex: In these experiments both females and males will be used. However, to prevent differences caused by sex of the mice during inflammatory reaction (by for instance hormones and size of lymphoid organs), all mice within one experiment will be of the same sex.

Estimated number: Based on the number of animal experiments performed in previous years, and on the research plans we developed for the 5 forthcoming years, we estimate a need of 1200 mice in total (i.e. 8-10 mice per group, 2-6 groups per experiment, 15-20 experiments). **Each experiment will always have at least one control group and up to 5 groups of different modulated therapeutic products. An example would be control T cells and 5 different T cells products, each treated with a different modification protocol. The number of groups will be based on in vitro experiments in which different therapeutic products will be compared before experiments in vivo will be performed.**

This includes mice needed for experiments to optimize the model (e.g. testing new cytokines for support of T and NK cells, main screening will be done in expansion model Procedure#1, but in some situation this should also be tested in the anti-tumor setting) and for training of (new) art9 and art12 employees for the included procedures.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Immune deficient mice (e.g. NSG mice)	[REDACTED] or commercially available	1200	6-25 weeks old

C. Re-use

Will the animals be re-used?

☒ No, continue with question D.

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

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

☐ No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

The amount of mice will first be minimized by doing extensive in vitro investigations into the different immune cell therapy products. In addition, only the most promising strategies will be considered for in vivo evaluation.

Replacement: Animal models are most often required in cancer research to validate and to translate a novel approach to the clinical situation. Following intensive in vitro studies, new approaches should be tested in vivo to mimic the in situ situation found in patients, what we achieve using mouse models. No established pre-clinical models in lower animal species are available for our research purpose.

Reduction: Particular attention is paid to the determination of the optimal size of each group, for each experiment that is required to reach statistical significance. Use of fewer animals could lead to inadequate interpretation of the results.

Refinement: To reduce anxiety, mice will be housed in groups and not individually. The general health of the animals will be monitored daily by the researcher and/or the biotechnician. The methods that we use are well established and the experiments will be performed by experienced researches. Previous research [REDACTED] and others has shown the translational value of this type of studies.

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

To prevent discomfort due to stress, experiments are performed by experienced staff, and mice are housed in social housing. To minimize animal suffering, pain or fear, analgesia and anesthesia will be used when needed and possible. Repeated injections will be made at different sites when possible. Humane endpoints will be monitored precisely.

Repetition and Duplication

E. Repetition

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

Non-applicable

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

☒ No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

☒ No > Continue with question H.

☐ Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

☐ No > Continue with question I.

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

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

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

Inhalation anesthesia (e.g. Isoflurane) and analgesia (s.c. Temgesic injection before i.f. injection) will be used during i.f. injections, and inhalation anesthesia (e.g. Isoflurane) will be used during Bioluminescence Imaging.

The rest of the biotechnical procedures described here do not require pain relief. However, terminal blood collection will be performed under anesthesia without recovery.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

The following forms of discomfort can occur:

- 1) Pain and stress by injections, repeated injections or blood collections.
- 2) Pain and illness related to xenograft reactions that can occur following human immune cell injection (i.e. attack of mouse tissues by human cells). This can particularly cause damage in the gut and skin of infused mice, resulting in diarrhea and bad fur conditions.
- 3) Distress due to procedures performed under anesthesia with narcosis and recovery, repeated procedures (like bioluminescence imaging).
- 4) Illness due to tumor cell progression such as nausea, paralysis.

Explain why these effects may emerge.

The pain, stress and discomfort in this experiment is mainly induced by (multiple) injections and blood collections. In addition, the human T cell could induce a xenograft reaction, where the human T cells attack the mouse tissues. This can particularly cause damage in the gut and skin of infused mice, resulting in diarrhea and bad fur conditions. In addition, in the survival experiments mice will suffer from discomfort due to tumor growth.

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

1) General health will be inspected daily by responsible researchers and care-takers of the animal facility (i.e. 7 days a week). Mice will be weighed and inspected for their coat and skin condition, activity, and attitude. Animal with significant distress will be killed according to humane endpoints. Special experimental-specific endpoints will be defined, as described in J, to further minimize the discomfort of the mice.

2) Anesthesia sessions (e.g. with isofluran inhalation) will be kept as short as possible, with sufficient recovery time between sessions

J. Humane endpoints

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

☐ No > Continue with question K.

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

General humane endpoints will be applied in all mouse experiments. Per experiment specific humane endpoints will be described in addition to the general humane endpoints, to be sure to prevent unnecessary suffering of the mice. In this particular procedure, we know that tumor cells injected i.f. can overgrow outside the bone, forming a palpable tumor. Mice bearing tumor > 1 cm in diameter (measured by caliper) will be sacrificed. Tumor cells can also disseminate in the body and develop metastasis (mostly at other sites in bones and in liver). Humane endpoints are then severe weight loss (>20%), paralysis, or loss of activity. Notably, such humane endpoints occurs late and are expected only in survival analysis.

Indicate the likely incidence.

For ex vivo analysis (40% of the experiment within this procedure), the incidence of humane endpoints is <5%. For the survival analysis (60% of the experiment within this procedure), incidence of humane endpoints is around 50%

K. Classification of severity of procedures

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

Mice which are sacrificed for ex vivo analysis (40% of the experiment within this procedure) will have moderate discomfort. The mice followed for survival (60% of the experiment within this procedure) will have severe discomfort.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

☐ No

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

Mice will either be killed due to humane endpoints of survival analysis or at the end of the experiment for ex vivo analysis.

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

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

☒ Yes

Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number 3	Type of animal procedure #3 Self-renewal properties of T cells in secondary transplant model

2 Description of animal procedures

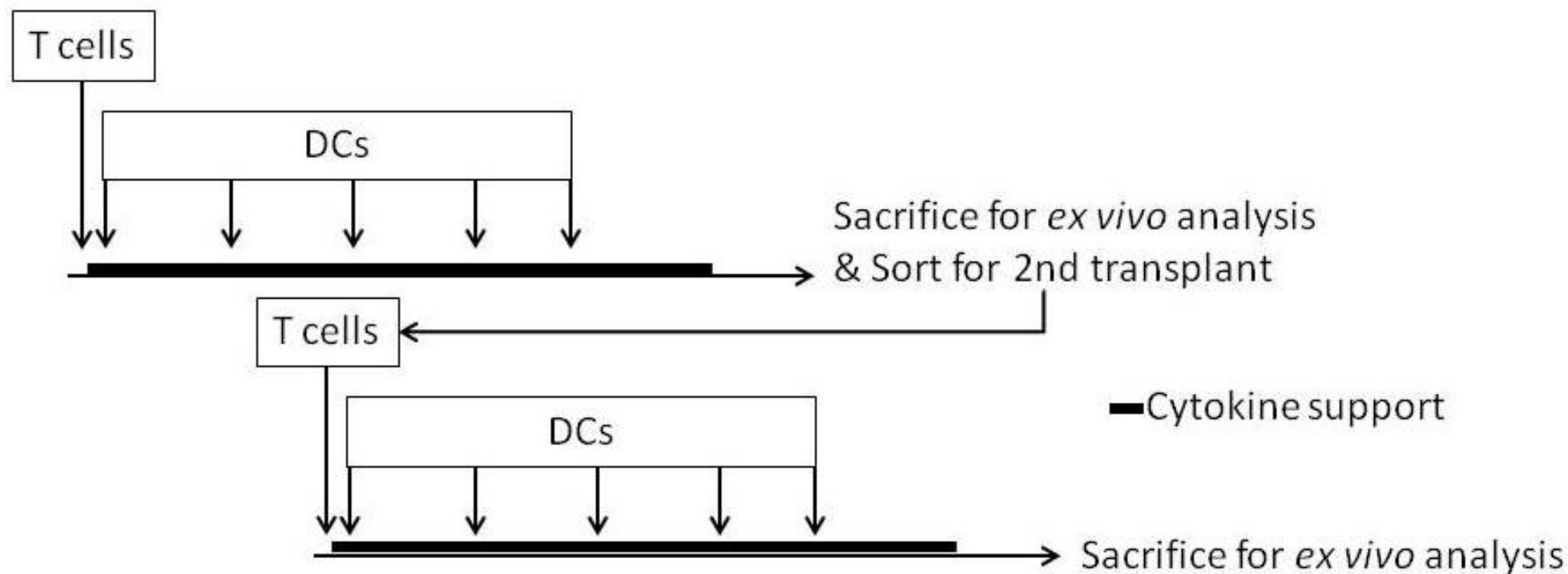
A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

In this model we will test the self-renewal capacity of various tumor-reactive T cell products. If T cells have self-renewal capacity they can maintain their cell population, and result in a long-term presence and thereby long-term anti-tumor effect. Therefore, mice are infused with human T (tumor-reactive) cells, which are stimulated (to induce expansion) with subsequential dendritic cell vaccination. These expanded T cells are then collected and (partly) infused in new mice where they are again stimulated with dendritic cells. The primary outcome of the experiment is the ex vivo analysis of the T cells during the experiment via blood collection and after sacrifice of second cohort of the mice, which will take place one week after the last dendritic cell vaccine, in which we will determine the number, phenotype and function of the in vivo expanded cells.

These outcome parameters have successfully been used in previous studies performed by our research group and by other international research groups.

The attached figure is a representative example of the model.



References

1. Gattinoni, L et al. A human memory T cell subset with stem cell-like properties. Nature Medicine 2011. 17(10). 1290-98

2. [REDACTED]

3. [REDACTED]

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

Mice are infused with different T cell products (i.v., one or multiple infusions, max 3 infusions in 2 weeks) which are then activated with dendritic cells (up to 6 vaccines, i.p. at 1 to 2 times per week). Previous experiments showed that weekly dendritic cell vaccination are needed for antigen-specific T cell expansion in mice.

As we are working with immunodeficient mice which lack cytokine production, human cytokines are given for T cell support (i.p. or s.c. max every 2-3 days, up to one week after last dendritic cell vaccine). The maximum of an injection every 2-3 days is based on rhIL-15, which we currently use as a supportive cytokine for T cells. This is infused every 2-3 days due to the short half-life of rhIL-15. Other cytokines could be tested in this model for optimisation and to reduce the number of injections, and thereby discomfort. As cytokine support is needed for T cell persistence in immunodeficient mice, the maximum length of cytokine support will be 6 weeks, which is one week after the last dendritic cell vaccination. To monitor T cell expansion, blood is collected (e.g. at weekly intervals via tail puncture, max 100ul). Mice sacrificed one week after the last dendritic cell vaccination via cervical dislocation. If blood is collected at sacrifice, this is performed under anesthesia (isoflurane, e.g. via heart puncture). From the lymphoid organs (e.g. blood, spleen, bone marrow) of these mice, T cells are collected to use for secondary transfer.

The isolated T cell (subsets) are infused into a new groups of mice. Again these T cells are activated with dendritic cells and supported with cytokine support as described above. Again these mice are sacrificed one week after the last dendritic cell vaccination via cervical dislocation. If blood is collected at sacrifice, this is performed under anesthesia (isoflurane, e.g. via heart puncture). The maximum duration of the total experiment is 12 weeks.

References

1. Gattinoni, L et al. A human memory T cell subset with stem cell-like properties. Nature Medicine 2011. 17(10). 1290-98

2.

3.

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

The amount of mice will first be minimized by doing extensive in vitro investigations into the different T cell products. In addition, data from animal experiment in procedure #1 and/or procedure #2 will be used for the selection of the most promising products/strategies, which will then be considered for in vivo evaluation on self-renewal capacity.

The group size required for each experiments will be determined:

- According to previous in vitro and in vivo experiments performed in the group;
- According to the literature describing similar experimental designs;
- Using validated statistical approaches based on power calculation, expected effect of the treatment, standard deviation, number of comparisons, and read-out parameters.

- In these experiments we will use statistical approaches for group size calculations in the 2nd transplant groups. The size of the 1st transplant groups will be based on the number of cells needed for 2nd transplant derived from these groups.

B. The animals

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

Species: Mouse. These are the lowest possible species to study the human immune system. To study human immune functions in mice we will use immune deficient strains lacking T, B and NK- cells, which will not reject injected human cells.

Origin and life stage: Mice [REDACTED] or commercially available will be used at an age of 6-25 weeks at the start of experiments.

Sex: In these experiments both females and males will be used. However, to prevent differences caused by sex of the mice during inflammatory reaction (by for instance hormones and size of lymphoid organs), all mice within one experiment will be of the same sex.

Estimated number: Based on the number of animal experiments performed in previous years, and on the research plans we developed for the 5 forthcoming years, we estimate a need of 250 mice in total (i.e. 5 mice per group, 3-10 groups per experiment, 5 experiments). **The amount and distribution of groups will be dependent on the specific set-up of the experiment. For instance to answer the question whether T cells contain self-renewal capacity, and in which cell subset of T cells this resides, one could think of the following groups: group 1 - Stimulation of T cell product followed by sacrifice of the mice, group 2&3 - 2nd transplant of 2 different T cell subsets derived from mice in group 1. On the other hand, if self-renewal capacity of different T cell products is tested, groups 1-3 could be stimulation of (e.g. up to) 3 different T cell products, including also a control T cell group, and groups 4-10 would then be the 2nd transplant of different T cell subsets derived from groups 1-3.**

This includes mice needed for experiment to optimize the model (e.g. testing new cytokines for support of T cells) and for training of (new) art9 and art12 employees for the included procedures.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Immune deficient mice (e.g. NSG mice)	[REDACTED] or commercially available	250	6-25 weeks old

C. Re-use

Will the animals be re-used?

☒ No, continue with question D.

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

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

☐ No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

The amount of mice will first be minimized by doing extensive in vitro investigations into the different immune cell therapy products. In addition, only the most promising strategies will be considered for in vivo evaluation.

Replacement: Animal models are most often required in cancer research to validate and to translate a novel approach to the clinical situation. Following intensive in vitro studies, new approaches should be tested in vivo to mimic the in situ situation found in patients, what we achieve using mouse models. No established pre-clinical models in lower animal species are available for our research purpose.

Reduction: Particular attention is paid to the determination of the optimal size of each group, for each experiment that is required to reach statistical significance. Use of fewer animals could lead to inadequate interpretation of the results.

Refinement: To reduce anxiety, mice will be housed in groups and not individually. The general health of the animals will be monitored daily by the researcher and/or the biotechnician. The methods that we use are well established and the experiments will be performed by experienced researchers. Previous research [REDACTED] and others has shown the translational value of this type of studies.

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

To prevent discomfort due to stress, experiments are performed by experienced staff, and mice are housed in social housing. To minimize animal suffering, pain or fear repeated injections will be made at different sites when possible. Human endpoints will be monitored precisely.

Repetition and Duplication

E. Repetition

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

Non-applicable

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

☒ No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

☒ No > Continue with question H.

☐ Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

☐ No > Continue with question I.

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

H. Pain and pain relief

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

The biotechnical procedures described here only include injection and do not require pain relief. However, terminal blood collection will be performed under anesthesia without recovery.

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

The following forms of discomfort can occur:

- 1) Pain and stress by injections, repeated injections or blood collections.
- 2) Pain and illness related to xenograft reactions that can occur following human immune cell injection (i.e. attack of mouse tissues by human cells). This can particularly cause damage in the gut and skin of infused mice, resulting in diarrhea and bad fur conditions

Explain why these effects may emerge.

The pain, stress and discomfort in this experiment is mainly induced by (multiple) injections and blood collections. In addition, the human T cell could induce a xenograft reaction, where the human T cells attack the mouse tissues. This can particularly cause damage in the gut and skin of infused mice, resulting in diarrhea and bad fur conditions.

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

General health will be inspected daily by responsible researchers and care-takers of the animal facility (i.e. 7 days a week). Mice will be weighed and inspected for their coat and skin condition, activity, and attitude. Animal with significant distress will be killed according to humane endpoints. Special experimental-specific endpoints will be defined, as described in J, to further minimize the discomfort of the mice.

J. Humane endpoints

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

☐ No > Continue with question K.

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

The general humane endpoints (**more than 20% weight loss**, hunched statue, bad fur condition, loss of activity) will apply. No experimental specific humane endpoints are expected.

Indicate the likely incidence.

The incidence of the xenograft reaction, and thereby the expected incidence of the humane endpoints is very low (<1%)

K. Classification of severity of procedures

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

Moderate for all mice

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

☐ No

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

Mice will be sacrificed at the end of experiment for ex vivo analysis.

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

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

☒ Yes

DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer 2015-0120
2. Titel van het project: Adoptive T cell therapy and DC vaccination in hematological malignancies
3. Titel van de NTS: Immunotherapie tegen kanker: van ontwikkeling naar doelgerichte behandeling
4. Type aanvraag:
 - ☐ nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
 - Naam DEC: RUDEC
 - Telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED] bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9:00 tot 15:00 uur
 - Mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject:
 - ☐ ontvangen door DEC: 22-09-2015
 - ☐ aanvraag compleet
 - ☐ in vergadering besproken: 06-10-2015
 - ☐ anderszins behandeld
 - ☐ termijnonderbreking(en) van 13-10-2015 tot 23-11-2015
 - ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - ☐ aanpassing aanvraag: 23-11-2015
 - ☐ advies aan CCD: 14-12-2015
7. Eventueel horen van aanvrager
 - Datum
 - Plaats
 - Aantal aanwezige DEC-leden
 - Aanwezige (namens) aanvrager
 - Strekking van de vraag / vragen
 - Strekking van het (de) antwoord(en)
 - Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag
8. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum: 13-10-2015
 - Strekking van de vragen:

Project Proposal:

-3.2 Op deze manier geformuleerd lijkt de hoofddoelstelling tweeledig. Bedoelen de onderzoekers misschien dat de hoofddoelstelling van hun onderzoek is 'to improve T cells and NK cells as therapy for hematological malignancies.'? Beide subdoelstellingen dragen bij aan deze hoofddoelstelling.

-3.3 De onderzoekers kunnen het medisch belang nog iets beter toelichten en toespitsen op het voorgestelde onderzoek. Welk percentage van de patiënten met een hematologische

tumor zou bijvoorbeeld baat kunnen hebben bij deze therapie als deze geoptimaliseerd wordt?

-3.4.3 De samenhang tussen de verschillende onderdelen van het project is nog niet duidelijk uitgelegd. Op welke wijze zullen resultaten uit het ene deel gebruikt worden bij de andere onderdelen? Onder 3.4.2 is dit kort aangegeven. De onderzoekers worden verzocht dit helder te omschrijven bij dit onderdeel (3.4.3), inclusief go/no go momenten.

Description of Animal Procedures:

-DAP1, vraag A1. De onderzoekers hebben de illustratie van het general design bij A2 gegeven. Het zou hier beter op zijn plaats zijn.

-DAP1, vraag A3. Welke hoeveelheid uitval verwachten de onderzoekers? Op welke wijze is hiermee in de berekening onder B rekening gehouden?

-DAP1, vraag B (geldt ook voor DAP2 en -3): Willen de onderzoekers zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruiken? Zo niet, wat is hiervoor de rationale?

-DAP1 en DAP2, vraag B. De onderzoekers verwachten dat de experimenten uit 2 tot 6 groepen dieren zullen bestaan. Kunnen zij bij A2 een voorbeeld beschrijven van een experiment met 6 groepen, en kunnen zij aangeven van welke omstandigheden het aantal groepen afhankelijk is?

-DAP1, vraag I3 en J. Uit J blijkt dat er experiment specifieke eindpunten zullen zijn. De onderzoekers worden verzocht de tekst bij I en J in overeenstemming met elkaar te brengen.

-DAP2, vraag H. Bij i.f. injectie van tumorcellen is adequate pijnbestrijding nodig. De commissie zou graag de zwaarwegende experimentele omstandigheden horen die het noodzakelijk maken om binnen 24 uur na injectie van de tumorcellen te starten met T-cel therapie.

-DAP2, vraag J. Ernstig gewichtsverlies is onvoldoende gedefinieerd. Welk percentage gewichtsverlies zal worden gehanteerd?

-DAP3, vraag B. Kunnen de onderzoekers duidelijker opschrijven uit welke groepen zo'n experiment zal bestaan, en daarbij vermelden welke groepen voor de tweede transplantatie worden gebruikt.

- Datum antwoord: 23-11-2015
- Strekking van de antwoorden:

Project Proposal:

- 3.2 De hoofddoelstelling van deze aanvraag is de verbetering van additieve immuuntherapieën tegen hematologische maligniteiten, waarbij gebruik wordt gemaakt van enerzijds T cel infusies en anderzijds dendritische cel vaccinatie, die in vivo de T cellen zullen aansturen. Omdat bekend is dat dendritische cellen ook natural killer (NK) cellen kunnen aansturen zal ook dit worden meegenomen in de ontwikkeling van een optimaal dendritisch cel vaccinatie product. Om de hoofddoelstelling te verduidelijken is deze geherformuleerd zoals onderstaand.

“Therefore, in this project we aim to study and improve additive therapies against hematological malignancies, focussing on tumor-reactive T cells and dendritic cell vaccination. To achieve this objective we use 2 different strategies:

1. Improve the in vitro generation of tumor-reactive T cells (e.g. exploring the recognition of novel tumor-antigens, or inhibition of T cell differentiation).
2. Improving dendritic cell vaccination to boost in vivo T cell and NK cell activation (e.g. by in vitro generation of dendritic cells, and boosting/modification of their stimulatory capacity)."

-3.3 Om het medische belang van deze therapieën aan te geven is onderstaande informatie toegevoegd aan de aanvraag.

"In The Netherlands, about 2000 to 3000 patients are diagnosed with a hematological malignancy every year. Though relapse rates varie between type of malignancy, this can be up to 60%. This shows that the development of additional therapy is essential, where T cell and dendritic cell therapy could induce a long term anti-tumor response. By exploiting novel strategies on the kind of tumor antigen which is targeted, the different therapies developed in this application could be used to be able to treat as many patients possible."

-3.4.3 Om beter de samenhang aan te geven tussen de verschillende onderdelen van de aanvraag is onderstaande tekst bijgevoegd in 3.4.3.

"In the development of immune therapies against hematological malignancies, this project focuses on T cells and dendritic cells. As dendritic cells instruct and guide the T cells towards the malignant cells, these therapeutic strategies are connected. In the experiments to test and analyse the therapeutic potential of the different T cell products, dendritic cells will be used to support and boost the T cells. Moreover, in the models to analyse the therapeutic potential of the dendritic cell products, their stimulatory effect on T cells and/or NK cells will also be used for readout. For clinical application, adoptive T cell therapy and dendritic cell vaccination would favorably be combined as therapy."

Verder zijn in de verschillende no/no-go momenten beter toegespitst in dit gedeelte van de aanvraag.

Description of Animal Procedures:

DAP1

-A1 Op verzoek van de commissie is het figuur in alle 3 de Description of Animal Procedures verplaatst naar vraag A1.

- A3 Uitval van dieren is vooral te verwachten in Description of Animal Procedure 2 waarbij de intra femurale (i.f.) injectie kan leiden tot een misinjectie. Omdat er dan geen tumorgroei plaatsvindt in het beenmerg zullen deze muizen worden uitgesloten van het experiment en geofferd. Om te voorkomen dat door deze uitval de groepen te klein worden zal in experimenten waar i.f. injectie wordt uitgevoerd 5-10% extra muizen worden geïncubeerd. Om dit verder uit te leggen is in Description of Animal Procedures 2 de volgende tekst toegevoegd.

"In these experiments this will be based on the i.f. injections. around 5-10% of the i.f. injections results in a misinjection (e.g. blockade of the needle resulting in no injection, or injection outside the femur). This can be determined either during the i.f. injection (then mice will be sacrificed without recovery from anesthesia), or during the first BLI before group allocation. These mice will be sacrificed and excluded from the experiment. Therefore, 5-10% extra mice will be included in experiments which include i.f. injection of tumor cells."

In Description of Animal Procedures 1 en 3 is deze tekst verwijderd aangezien het in deze modellen minder waarschijnlijk is dat er dieren vanwege experimentele procedures zullen uitvallen.

- B (ook DAP 2 en 3) In alle experimenten kan zowel gebruik worden gemaakt van mannelijke als vrouwelijke dieren. Echter, om de verschillen veroorzaakt door sekse van de dieren (bijvoorbeeld door hormonen of de grootte van lymfoide organen te voorkomen en daarmee de variatie binnen een experiment zo klein mogelijk te houden, zal de sekse binnen een experiment gelijk worden gehouden. Dit is als volgt gespecificeerd in de aanvraag.

“In these experiments both females and males could be used. However, to prevent differences caused by sex of the mice during inflammatory reaction (by for instance hormones and size of lymphoid organs), all mice within one experiment will be of the same sex”

-B (ook DAP 2) Om een beter beeld te geven van de mogelijkheden van de groepen is de tekst in beide Description of Animal Procedures uitgebreid met de volgende toelichting.

“Each experiment will always have at least one control group and up to 5 groups of different modulated therapeutic products. An example would be control T cells and 5 different T cells products each treated with a different modification protocol. The number of groups will be based on in vitro experiments in which different therapeutic products will be compared before experiments in vivo will be performed. “

-I3 en J Om de eindpunten beschreven in I3 en J gelijk te maken is de omschrijving in zowel I3 als J aangepast. Hierbij is in I3 de zin ‘No experimental humane endpoints are expected’ verwijderd. En is in J herschreven naar het volgende.

“In this particular procedure the humane endpoints are then severe weight loss (>20%) and loss of activity. “

DAP2

- H Omdat er in de literatuur onduidelijkheid bestaat over het effect van pijnbestrijding op T cel functie was in de aanvraag beschreven dat wanneer i.f. injectie van tumorcellen en de infusie van T cellen binnen 24 uur viel er geen pijnbestrijding maar alleen anesthesie werd toegepast bij deze handeling. Echter, dit zal slechts in een uitzonderlijke situatie het geval zijn, bijvoorbeeld wanneer het effect van T cellen op een hele lage tumordosis dient te worden getest bij een tumor die erg snel groeit. Na heroverweging hebben we besloten dat dit hoogstwaarschijnlijk niet toegepast zal worden, en is dit daarom verwijderd uit de aanvraag.

- J Ernstig gewichtsverlies is gedefinieerd als meer dan 20% verlies. Dit is aangepast in alle 3 de Description of Animal procedures.

DAP3

- B Om een duidelijker beeld te schetsen van het gebruik van de verschillende groepen is de volgende tekst toegevoegd aan het onderdeel.

“The amount and distribution of groups will be dependent on the specific set-up of the experiment. For instance, to answer the question whether T cells contain self-renewal capacity, and in which subset of T cells this resides, one could think of the following groups: group 1 - Stimulation of T cell product followed by sacrifice of the mice, group 2&3 - 2nd transplant of 2 different T cell subsets derived from mice in group 1. On the other hand, if self-renewal capacity of different T cell products is tested, groups 1-3 could be stimulation of

(e.g. up to) 3 different T cell products, including also a control T cell group, and groups 4-10 would then be the 2nd transplant of different T cell subsets derived from groups 1-3.”

Als toevoeging is in vraag A3 een extra uitleg voor de berekening van de groepsgrootte toegevoegd door middel van onderstaande tekst.

“In these experiments we will use statistical approaches for group size calculations in the 2nd transplant groups. The size of the 1st transplant groups will be based on the number of cells needed for 2nd transplant derived from these groups.”

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

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

- Aard expertise
- Deskundigheid expert
- Datum verzoek
- Strekking van het verzoek
- Datum expert advies
- Expert advies

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

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

C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:
 - ☐ uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling, namelijk ‘to study and improve additive therapies against hematological malignancies, focusing on tumor-reactive T cells and dendritic cell vaccination’. Deze hoofddoelstelling leidt tot twee strategieën die in dit project afzonderlijk en in combinatie worden onderzocht, te weten ‘improving the in vitro generation of tumor-reactive T-cells’ en ‘improving dendritic cell vaccination to boost in vivo T cell and NK cell activation’. De te behalen onderzoeksresultaten in muismodellen zullen duidelijk maken welke strategieën therapeutisch relevante tumor-actieve T-cellen opleveren, welke strategieën leiden tot therapeutisch relevante vaccinaties met dendritische cellen, en welke (combinatie) van deze strategieën het beste therapeutische effect in vivo in een xenotransplantatie model geeft. Voorts wordt duidelijk op welke wijze de populatie van tumor-actieve T-cellen in stand gehouden kan worden in vivo. Deze resultaten kunnen op korte termijn leiden tot de ontwikkeling van effectievere therapieën voor mensen met kanker van hematologische oorsprong. Elk jaar krijgen twee- tot drieduizend mensen deze diagnose. De huidige behandeling blijkt bij 60% van de patiënten niet afdoende. Maatschappelijk is dit onderzoek van belang, omdat de resultaten kunnen bijdragen aan de ontwikkeling van betere therapieën voor hematologische kankers, wat zou resulteren in gezondheidswinst voor veel mensen. De DEC vindt het vergaren van kennis over het ontwikkelen van betere additieve therapieën voor hematologische kankers van substantieel belang.

4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Deze groep heeft veel ervaring in dit onderzoeksveld en met de voorgestelde dierproeven. De gekozen aanpak leidt tot betrouwbare uitspraken over het therapeutisch potentieel van tumor-reactieve T-cellen die met verschillende strategieën zijn gegenereerd, over het therapeutisch potentieel van verschillende vaccinaties met dendritische cellen, en over het anti-tumor effect van (een combinatie van) beide therapieën.
5. Er is geen sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren.
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief wordt hoofdzakelijk bepaald door de groei van humane hematologische kankercellen in het beenmerg, en de behandeling daarvan met humane cellen. De DEC schat het ongerief als gevolg van de benodigde herhaalde bloedafnames, injecties met humane T-cellen of dendritische cellen, en injecties met cytokines elke 2-3 dagen in als matig. Het ongerief als gevolg van de groei van humane hematologische kankercellen gedurende langere tijd in het survivaalexperiment schat de commissie in als ernstig. Een experiment van dit type is noodzakelijk alvorens de meest veelbelovende therapieën bij patiënten kunnen worden toegepast en in die zin is dit ongerief dan ook onvermijdelijk. Het cumulatief ongerief voor de muizen in de beschreven vergunningaanvraag is dus juist ingeschat als matig voor 70% van de dieren en ernstig voor 30% van de dieren.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**. De doelstelling van het project kan niet gerealiseerd worden zonder proefdieren of door gebruik van minder complexe diersoorten. Een therapie waarbij het immuunsysteem is betrokken kan niet goed bestudeerd worden zonder proefdiermodellen. De onderdelen van het project die in vitro bestudeerd kunnen worden zijn al uitgevoerd. Voor het beantwoorden van de resterende onderzoeksvragen zijn dierproeven noodzakelijk. De muis is het minst complexe proefdier waarin de werking van humane immuuncellen, waaronder het anti-tumor effect van deze cellen, onderzocht kan worden.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd. De DEC is het eens met het beschreven onderzoeksmodel en de onderbouwing van het aantal benodigde dieren. Door de stapsgewijze aanpak waarin de resultaten uit eerdere proeven worden gebruikt voor het design van vervollexperimenten wordt onnodig gebruik van proefdieren voorkomen. De DEC is van oordeel dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 2650 muizen.
9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven. De experimentele handelingen bij de dieren zullen worden uitgevoerd door hierin getrainde onderzoekers, waardoor de stress voor de dieren zoveel mogelijk wordt beperkt. Dagelijkse controles van de dieren zorgen ervoor dat bij onverwacht optredend ongerief tijdig kan worden ingegrepen. De onderzoekers zullen gedurende het project trachten de frequentie van cytokine-injecties te verminderen. De DEC is ervan overtuigd dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.
Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.
10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project, zelfstandig leesbaar, beknopt en begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

Op basis van de onder C genoemde overwegingen komt de DEC tot de volgende ethische afweging.

Met dit onderzoek worden belangrijke wetenschappelijke inzichten verworven in het therapeutisch potentieel van tumor-reactieve T-cellen die met verschillende strategieën zijn gegenereerd, over het therapeutisch potentieel van verschillende vaccinaties met dendritische cellen, en over het anti-tumor effect van (een combinatie van) beide therapieën. Voorts wordt duidelijk op welke wijze de populatie van tumor-reactieve T-cellen in stand gehouden kan worden in vivo. Deze resultaten zullen op korte termijn kunnen leiden tot de ontwikkeling van effectievere additionele therapieën voor mensen met hematologische kanker. Het belang van meer kennis over effectievere additionele therapieën voor hematologische maligniteiten acht de DEC substantieel, aangezien de huidige behandeling bij 60% van de patiënten niet tot genezing leidt.

Tegenover dit substantiële belang staat het gegeven dat 70% van de dieren matig ongerief en 30% van de dieren ernstig ongerief zullen ondervinden als gevolg van de groei van humane hematologische kankercellen en de injectie met humane T-cellen en dendritische cellen in combinatie met de benodigde handelingen. Het ernstige ongerief ontstaat wanneer het therapeutische effect van de meest veelbelovende (combinatie van) therapieën wordt onderzocht. Deze stap is noodzakelijk alvorens een dergelijke therapie bij patiënten kan worden toegepast. De commissie is er van overtuigd dat bij de dierproeven adequaat invulling gegeven zal worden aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en/of verfijning van dierproeven. Het gebruik van de dieren en het daarbij optredende ongerief is onvermijdelijk, wil men de doelstellingen kunnen realiseren.

De DEC is van oordeel dat het hier boven geschetste belang de onvermijdelijke nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren, in de vorm van angst, pijn of stress, rechtvaardigt. Aan de eis dat het belang van de experimenten op dient te wegen tegen het ongerief dat de dieren wordt berokkend, is voldaan.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

- ☐ De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
 - Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen



Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN ()



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD103002015350

Bijlagen

2

Datum 16 december 2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

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

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD103002015350. 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. U ontvangt binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. Als wij nog informatie van u nodig hebben, wordt deze termijn opgeschort. 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 kan uw aanvraag buiten behandeling worden 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.centralecommissiedierproeven.nl. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10300
Naam instelling of organisatie: Radboud Universiteit Nijmegen
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 41055629
Straat en huisnummer: Geert Grooteplein 10
Postbus: 9101, [REDACTED]
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN
IBAN: NL90ABNA0231209983
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: UMC st Radboud

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

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

Gegevens gemachtigde

BSN: [REDACTED]
Naam: [REDACTED]
Postbus: 9101
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN ([REDACTED])

Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Nee

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: 14 januari 2016
Geplande einddatum: 14 februari 2021
Titel project: Adoptive T cell therapy and DC vaccination in hematological malignancies
Titel niet-technische samenvatting: Immuuntherapie tegen kanker: van ontwikkeling naar doelgerichte behandeling
Naam DEC: RU DEC
Postadres DEC: Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen
E-mailadres DEC:

Betaalgegevens

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

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen: ☒ Projectvoorstel
☒ Beschrijving Dierproeven
☒ Niet-technische samenvatting
Overige bijlagen: ☒ Melding Machtiging
☒ DEC-advies

Ondertekening

Naam:
Functie:
Plaats: Nijmegen
Datum: 14 december 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen



Postbus 9101,
6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD103002015350

Bijlagen

2

Datum 16 december 2015

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 16 december 2015

Vervaldatum: 15 januari 2016

Factuurnummer: 15700350

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD103002015350	€ 741,00

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen

[Redacted]

[Redacted]

Postbus 9101
6500 HB NIJMEGEN

**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD103002015350

Uw referentie

Datum 19 januari 2016
Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

Bijlagen
1

Geachte [Redacted]

Op 15 december 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Adoptive T cell therapy and DC vaccination in hematological malignancies" met aanvraagnummer AVD103002015350. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

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

Onduidelijkheden

- 1) In de verschillende bijlagen dierproeven spreekt u over muizen die bedoeld zijn voor modeloptimalisatie. Wij begrijpen dat dit nodig kan zijn, maar willen een beeld krijgen van welk deel van de dieren voor optimalisatiedoeleinden benut zal worden. Kunt u aangeven om hoeveel dieren dit ongeveer zal gaan?
- 2) In de verschillende bijlagen dierproeven spreekt u over muizen die bedoeld zijn voor training van nieuwe medewerkers. Dit lijkt tegenstrijdig met de opmerking dat de experimenten worden uitgevoerd door ervaren personeel. Kunt u aangeven om hoeveel muizen dit ongeveer zal gaan, welke behandelingen deze dieren zullen ondergaan (en hoe vaak) en of deze dieren geïncubeerd worden in de studies of dat deze dieren alleen voor training zullen worden gebruikt?
- 3) Kunt u verder verhelderen wat de criteria zijn waarop u besluit procedure 1 dan wel procedure 2 dan wel beide uit te voeren met de verschillende cel therapie producten? Zijn resultaten uit procedure 1 van invloed op uitvoering van procedure 2?

Datum

19 januari 2016

Onze referentieAanvraagnummer
AVD103002015350

Wij vragen u deze informatie te verduidelijken.

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

Opsturen binnen veertien dagen

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

Wanneer een beslissing

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlage:

- formulier Melding Bijlagen via de post



Melding

Bijlagen via de post

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

1 Uw gegevens

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

2 Bijlagen

- 2.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
- Vul de naam of omschrijving van de bijlage in.*
- | | |
|--------------------------|--|
| ☐ | |
| ☐ | |
| ☐ | |

3 Ondertekening

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

Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen
Geert Grooteplein Zuid 10
T ()
www.radboudumc.nl

Datum	Ons kenmerk	Pagina
20 januari 2016		1 van 2

Onderwerp
RU-DEC 2015-0120 / AVD103002015350

Geachte Centrale Commissie Dierproeven,

Naar aanleiding van uw vragen en opmerkingen betreffende onze aanvraag RU-DEC 2015-0120 / AVD103002015350 onderstaand puntsgewijs onze reactie.

1) *De commissie heeft aangegeven graag een beter beeld te krijgen van het aantal dieren dat voor optimalisatiedoeleinden van de dierproeven zal worden gebruikt.*

Het verwachte aantal dieren wat gebruikt zal worden voor optimalisaties van modellen is maximaal 5% van de aangegeven aantallen. Met deze aantallen verwachten wij de (in de toekomst) noodzakelijke optimalisaties uit te kunnen voeren.

Om dit te verduidelijken is onderstaande tekst toegevoegd aan onderdeel Animals B1 in alle 3 de Description of Animal Procedures:

"For the optimization of the models we expect to use less than 5% of the requested animals."

2) *De commissie heeft aangegeven graag meer informatie te ontvangen over het trainen van nieuwe werknemers, welke en hoe vaak deze dieren handelingen zullen ondergaan, en of deze dieren naderhand nog in experimenten zullen worden gebruikt*

Het uitvoeren van de experimenten zal inderdaad gedaan worden door ervaren medewerkers, echter nieuwe medewerkers op het project zullen daarom getraind dienen te worden alvorens deze aan de experimenten kunnen deelnemen. Het gaat hier dan voornamelijk om de standaard injectie technieken (i.v., i.p., s.c.). De meer gespecialiseerde technieken (e.g. hartpunctie, intrafemorale injectie) zullen worden uitgevoerd door een kleine selectie van getrainde werknemers, of door getrainde biotechnici betrokken bij het project. Met deze trainingen vooraf, op surplus dieren, willen we bereiken dat de handelingen in de experimenten altijd worden uitgevoerd door ervaren medewerkers. Deze zullen daardoor minder variaties geven, met betrekking tot bijvoorbeeld misinjecties, en hierdoor kam ook ongerief voorkomen worden.

Het aantal dieren dat hiervoor gebruikt zal worden ligt laag, maximaal 1% van de aangevraagde dieren. Daarbij zal er bij voorkeur gebruik worden gemaakt van dieren uit de fok die niet voor andere experimenten gebruikt kunnen worden. De dieren die voor training worden gebruikt zullen niet in andere experimenten worden geïncubeerd.

Om dit te verduidelijken is onderstaande tekst toegevoegd aan onderdeel Animals B1 in alle 3 de Description of Animal Procedures:

"Training of new employees will be performed to ensure to have experienced researchers performing experiments, which will reduce unnecessary discomfort of the mice and unwanted variation e.g. due to misinjections. For this training, less than 1% of the requested mice will be used. When possible, animals will be selected which are left over from breeding. Animals used in training will not be used in other experiments."

3) *De commissie heeft aangegeven graag criteria te ontvangen waarop wordt Procedure 1, dan wel procedure 2, of beiden zal worden uitgevoerd op de verschillende cel therapie producten. Daarnaast vraagt de commissie toelichting of de resultaten uit deze procedures invloed zullen hebben op elkaar.*

Op basis van de specifieke vraagstelling bij het therapeutische cel product, alsmede de in vitro data, zal besloten worden of procedure 1 dan wel 2 als eerste wordt uitgevoerd, of dat slechts een van beide procedures uitgevoerd zal worden. Voor bijvoorbeeld een therapeutisch celproduct wat in vitro een verhoogde effectorfunctie maar geen verhoogde proliferatie laat zien, zou gekozen kunnen worden alleen het anti-tumor effect in procedure 2 te testen. Wanneer de eerst uitgevoerde procedure succesvol is (bijvoorbeeld significant verschil tussen getest cel producten en controle cel product/geen behandeling) kan het celtherapie product ook worden getest in de andere procedure (succesvol in 1 kan getest worden in 2 en visa versa). Hierbij zullen de resultaten uit het eerdere experimenten altijd gebruikt worden voor verdere optimalisatie van vervollexperimenten (bijv. voor bepalen van aantal dieren door middel van gemeten spreiding en effecten). Wanneer deze procedure niet succesvol is zal de andere procedure niet worden uitgevoerd maar zal er eerst verdere ontwikkeling plaatsvinden in in vitro experimenten.

Om dit te verduidelijken is onderstaande tekst toegevoegd aan de Research Strategy 3.4.1 van de Project Proposal van de aanvraag:

"For both the T cell products as well as the Dendritic cell products, the specific research question as well as in vitro data will be used to decide whether procedure 1 or 2 will be commenced first. If the first procedure is successful (e.g. significant effect between tested cell product and control setting), it will also be tested in the other procedure (Procedure 2 after successful procedure 1 and other way around). If the first procedure is unsuccessful, new in vitro data will first be generated to further optimize the cell product before further in vivo testing."

Bovenstaande aanpassingen zijn verwerkt in de aanvraag, waarbij tekstuele wijzigingen en toevoegingen zijn aangegeven via rode en vetgedrukte teksten. Wij hopen u hiermee voldoende te hebben geïnformeerd. Mocht u nog verdere vragen hebben horen we dit graag.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

[REDACTED]

Van: Info-zbo
Verzonden: dinsdag 2 februari 2016 17:01
Aan: [REDACTED]
Onderwerp: RE: AVD103002015350: voorgenomen besluit

Geachte [REDACTED],

Dank u wel voor uw reactie. Wij zullen de beschikking in orde gaan maken en u deze toesturen.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028
E: info@zbo-ccd.nl (Let op: nieuw e-mail adres)

Van: [REDACTED]
Verzonden: dinsdag 2 februari 2016 16:48
Aan: info@zbo-ccd.nl; [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: RE: AVD103002015350: voorgenomen besluit

Geachte mevrouw [REDACTED]

Ik heb zojuist met de onderzoekers gesproken. Zij gaan akkoord met deze voorwaarde en zullen een pilotstudie uitvoeren om eventuele verschillen tussen de geslachten vast te stellen. Zo niet, dan zullen evenredige aantallen mannen en vrouwen worden gebruikt in de overige experimenten. Als er wel verschillen zijn, zullen de onderzoekers dit terug rapporteren aan de CCD.

Wij zien de definitieve beslissing van de CCD graag tegemoet.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

Radboud universitair medisch centrum
Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen
[REDACTED]
www.radboudumc.nl

Aanwezig: ma, di, wo en vr van 8.30 – 17.00 uur

Van: Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]

Verzonden: dinsdag 2 februari 2016 14:29

Aan: [REDACTED]

CC: [REDACTED]

Onderwerp: AVD103002015350: voorgenomen besluit

Geachte heer/mevrouw,

Wij hebben een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven van u in behandeling. Het gaat om het project 'Adoptive T cell therapy and DC vaccination in hematological malignancies' met aanvraagnummer AVD103002015350.

De CCD heeft uw aanvraag besproken en is voornemens deze te vergunnen. De CCD wil echter een aantal voorwaarden toevoegen aan de vergunning waaronder één voorwaarde die mogelijk consequenties zouden kunnen hebben voor de uitvoering van uw project. Deze voorwaarde en de argumentatie hiervoor vindt u hieronder.

Voorgenomen voorwaarde:

In een pilotstudie wordt vastgesteld of het gebruik van beide geslachten mogelijk is. Deze pilotstudie kan parallel/geïntegreerd aan de eerste studie met mannelijke dieren worden uitgevoerd. Indien er geen verschil in uitkomsten wordt gevonden, worden in alle dierproeven mannelijke en vrouwelijke dieren in evenredige aantallen gebruikt. Zo doende wordt voorkomen dat surplus dieren in voorraad moeten worden gedood. De aanvrager mag de uitkomsten van de eerste onderzoeken waarbij beide geslachten gebruikt worden rapporteren aan de CCD. De uitkomst van deze eerste onderzoeken kan voor de CCD aanleiding geven om bovenstaande voorwaarde van gelijk gebruik van beide geslachten voor deze projectvergunning te wijzigen of in te trekken.

Onderbouwing:

In uw aanvraag geeft aan dat u in alle bijlagen beide geslachten gaat gebruiken. Om spreiding in de data te voorkomen bent u van plan binnen één experiment slechts één geslacht te gebruiken. U heeft uw argument dat er minder variatie zal zijn bij het gebruik van alleen dieren van één geslacht niet met wetenschappelijk bewijs onderbouwd. Deze voorwaarde is toegevoegd om het aantal in voorraad gedode dieren te beperken.

Aangezien bovengenoemde voorwaarde mogelijk de uitvoering van uw project kan beïnvloeden, wil de CCD u nog in de gelegenheid stellen te reageren op deze voorwaarde alvorens zij een definitief besluit neemt. Daarnaast willen wij de DEC vragen de CCD aanvullend te adviseren over deze voorwaarde. Indien uw reactie of het aanvullend advies van de DEC daar aanleiding toe geeft, kan de CCD haar voorgenomen besluit nog herzien.

Om u hiervoor de gelegenheid te kunnen geven, en uw reactie vervolgens tijdens de CCD vergadering te kunnen bespreken, dienen wij de behandeltermijn op te schorten. Hoewel de CCD uw aanvraag binnen de wettelijke termijn van 40 werkdagen heeft beoordeeld, zullen we, door u in de gelegenheid te stellen te reageren op het voorgenomen besluit, de termijn van 40 werkdagen overschrijden. Wij kunnen u daarom alleen in de gelegenheid stellen te reageren, indien u instemt met het opschorten van de behandeltermijn totdat de CCD uw aanvraag opnieuw kan bespreken en een definitief besluit kan nemen.

Indien u gebruik wilt maken van de mogelijkheid te reageren op de voorgenomen voorwaarde, verzoeken wij u in te stemmen met het opschorten van de behandeltermijn en ons hiervan uiterlijk woensdag 03 februari 2016 op de hoogte te stellen.

Indien u gebruik maakt van bovenstaande mogelijkheid, wordt u verzocht uiterlijk maandag 8 februari 2016 inhoudelijk te reageren en eventueel aanvullende informatie aan te leveren. Wij zullen uw reactie vervolgens doorsturen naar de DEC die advies heeft uitgebracht over uw aanvraag en deze vragen de CCD naar aanleiding van uw reactie aanvullend te adviseren over bovengenoemde voorwaarde.

Mocht u geen gebruik willen maken van de mogelijkheid te reageren of instemmen met de voorgenomen voorwaarde, verzoeken wij u ons dat ook uiterlijk 3 februari 2016 te laten weten. Het voorgenomen besluit zal dan definitief gemaakt worden. Indien wij dan niets van u gehoord hebben, gaan wij er ook van uit dat u geen gebruik wilt maken van de mogelijkheid de aanvullende informatie te verstrekken.

Wij wachten uw reactie af.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag

.....
T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl (Let op: nieuw e-mail adres)

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

centralecommissiedierproeven.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD103002015350

05 FEB. 2016

Datum

Betreft Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 15 december 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Adoptive T cell therapy and DC vaccination in hematological malignancies" met aanvraagnummer AVD103002015350. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 21 januari 2016 heeft u uw aanvraag aangevuld. De aanvullingen betroffen een verheldering van het aantal dieren dat voor optimalisatiedoeleinden gebruikt zal worden, een verheldering van de handelingen en het aantal dieren dat gebruikt zal worden voor het trainen van nieuwe medewerkers, en verheldering van de criteria waarop procedure 1 danwel procedure 2 danwel beide zullen worden uitgevoerd.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning. De eerste twee voorwaarden zijn algemene voorwaarden. De laatste voorwaarde is toegevoegd om evenredig gebruik van beide geslachten van dieren te optimaliseren om het aantal in voorraad gedode dieren te beperken. Op 2 februari 2016 hebben wij u in de gelegenheid gesteld te reageren op het voorgenomen besluit van de CCD betreffende deze laatste voorwaarde. U heeft op 2 februari 2016 aangegeven accoord te gaan met de voorwaarde zoals hierboven toegelicht en in de vergunning beschreven. U kunt met uw project "Adoptive T cell therapy and DC vaccination in hematological malignancies" starten. De vergunning wordt afgegeven van 5 februari 2016 tot en met 14 januari 2021. Deze termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat de door u aangevraagde begindatum in het verleden ligt.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Beoordeling achteraf

Na afloop van het project zal er een beoordeling plaatsvinden, zoals bedoeld in artikel 10a1, lid 1d en lid 3, in de wet. Meer informatie over de eisen bij een beoordeling achteraf vindt u in de bijlage.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie RU DEC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 14 december 2015. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Wij nemen dit advies van de commissie grotendeels over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering, met toevoeging van de voorwaarden zoals hierboven gemotiveerd.

Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van 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 nummers in de rechter kantlijn in deze brief.

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

Centrale Commissie Dierproeven

~~namens de~~

ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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

Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Adres: Postbus 9101 [REDACTED]

Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN

Deelnemersnummer: 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak 5 februari 2016 tot en met 14 januari 2021, voor het project "Adoptive T cell therapy and DC vaccination in hematological malignancies" met aanvraagnummer AVD103002015350, volgens advies van Dierexperimentencommissie RU DEC.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED] Voor de uitvoering van het project is [REDACTED] verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 15 december 2015
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 21 januari 2016;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 15 december 2015;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 14 december 2015, ontvangen op 15 december 2015;
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 21 januari 2016.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
Expansion and phenotype model	Muizen (Mus musculus) / Immune deficient	1200	Matig / moderate	
Anti-tumor effect model	Muizen (Mus musculus) / Immune deficient	1200	Ernstig / severe	
Self-renewal properties of T cells in secondary transplant model	Muizen (Mus musculus) / Immune deficient	250	Matig / moderate	

Voorwaarden

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

De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat go/no go momenten worden afgestemd met de IvD.

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.

In een pilotstudie wordt vastgesteld of het gebruik van beide geslachten mogelijk is. Deze pilotstudie kan parallel/ geïntegreerd aan de eerste studie met mannelijke dieren worden uitgevoerd. Indien er geen verschil in uitkomsten wordt gevonden, worden in alle dierproeven mannelijke en vrouwelijke dieren in evenredige aantallen gebruikt. Zo doende wordt voorkomen dat surplus dieren in voorraad moeten worden gedood. De aanvrager mag de uitkomsten van de eerste onderzoeken waarbij beide geslachten gebruikt worden rapporteren aan de CCD indien er verschillen in uitkomsten zijn tussen geslachten. De uitkomst van deze eerste onderzoeken kan voor de CCD aanleiding geven om bovenstaande voorwaarde van gelijk gebruik van beide geslachten voor deze projectvergunning te wijzigen of in te trekken.

Beoordeling achteraf

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet en wordt daarom voorzien van beoordeling achteraf. Deze beoordeling zal uiterlijk 14 januari 2022 plaatsvinden. Er zal dan beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt. Daarnaast wordt bekeken of de schade die de dieren hebben ondervonden, het aantal en soorten proefdieren en de ernst van lijden van de proefdieren conform de vergunning waren.

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 een ontheffing is verleend.

Verzorging

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

In artikel 9 staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn. In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.

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

Pijnbestrijding en verdoving

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdoving wordt uitgevoerd tenzij dat niet mogelijk is, dan wel bij het verrichten van een dierproef worden pijnstillers toegediend of andere goede methoden gebruikt die de pijn, het lijden, de angst of de blijvende schade bij het dier tot een minimum beperken. Een dierproef die bij het dier gepaard gaat met zwaar letsel dat hevige pijn kan veroorzaken, wordt niet zonder verdoving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdoving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdoving onverenigbaar is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier

niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

Einde van een dierproef

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

De Minister heeft vrijstelling ontheffing verleend volgens artikel 13c, die de afwijkende methode van doden op basis van wetenschappelijke motivering ten minste even humaan acht als de in de richtlijn opgenomen passende methoden.

Beoordeling achteraf

Volgens artikel 10a1, lid 1d en lid 3 van de wet worden projecten waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt, projecten die als ernstig ingedeelde dierproeven omvatten of een dierproef die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, achteraf beoordeeld worden.

[REDACTED]

Van: Info-zbo
Verzonden: vrijdag 5 februari 2016 9:03
Aan: [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: Beschikking AVD103002015350
Bijlagen: DEC advies 350.pdf; Beschikking AVD103002015350.pdf

Geachte heer, mevrouw,

Deze beschikking is ook per post verzonden.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl
[REDACTED]

.....
Bezuidenhoutseweg 73 | 2594 AC | Den Haag Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag
.....

Van: Info-zbo
Verzonden: dinsdag 9 februari 2016 12:25
Aan: [REDACTED]
Onderwerp: Terugkoppeling aanvraag AVD103002015350

Beste DEC,
Enige tijd geleden heeft u ons een advies gezonden betreffende aanvraag AVD103002015350 (Adoptive T cell therapy and DC vaccination in hematological malignancies).
Onze dank voor dit heldere, goed onderbouwde DEC advies.

Tijdens het proces hebben wij de onderzoeker gebeld ter verduidelijking van de kans op een xenograft response. Daarnaast hebben wij schriftelijk enkele vragen gesteld aan de onderzoeker:

- 1) In de verschillende bijlagen dierproeven spreekt u over muizen die bedoeld zijn voor modeloptimalisatie. Wij begrijpen dat dit nodig kan zijn, maar willen een beeld krijgen van welk deel van de dieren voor optimalisatiedoelinden benut zal worden. Kunt u aangeven om hoeveel dieren dit ongeveer zal gaan?
 - 2) In de verschillende bijlagen dierproeven spreekt u over muizen die bedoeld zijn voor training van nieuwe medewerkers. Dit lijkt tegenstrijdig met de opmerking dat de experimenten worden uitgevoerd door ervaren personeel. Kunt u aangeven om hoeveel muizen dit ongeveer zal gaan, welke behandelingen deze dieren zullen ondergaan (en hoe vaak) en of deze dieren geïncubeerd worden in de studies of dat deze dieren alleen voor training zullen worden gebruikt?
 - 3) Kunt u verder verhelderen wat de criteria zijn waarop u besluit procedure 1 dan wel procedure 2 dan wel beide uit te voeren met de verschillende cel therapie producten?
- Zijn resultaten uit procedure 1 van invloed op uitvoering van procedure 2?

De onderzoeker heeft deze vragen naar tevredenheid beantwoord.

De CCD heeft besloten de vergunning te verlenen met de volgende voorwaarden:

- 1) De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat eventuele go/no go momenten worden afgestemd met de IvD.
- 2) 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.
- 3) In een pilotstudie wordt vastgesteld of het gebruik van beide geslachten mogelijk is. Deze pilotstudie kan parallel/ geïntegreerd aan de eerste studie met mannelijke dieren worden uitgevoerd. Indien er geen verschil in uitkomsten wordt gevonden, worden in alle dierproeven mannelijke en vrouwelijke dieren in evenredige aantallen gebruikt. Zo doende wordt voorkomen dat surplus dieren in voorraad moeten worden gedood. De aanvrager mag de uitkomsten van de eerste onderzoeken waarbij beide geslachten gebruikt worden rapporteren aan de CCD. De uitkomst van deze eerste onderzoeken kan voor de CCD aanleiding geven om bovenstaande voorwaarde van gelijk gebruik van beide geslachten voor deze projectvergunning te wijzigen of in te trekken.

Wegens ernstig ongerief in een deel van de dieren zal een beoordeling achteraf plaatsvinden.

Omdat de laatste voorwaarde als een beperkende voorwaarde gezien wordt, is de aanvrager in de gelegenheid gesteld hierop nog te reageren voordat het besluit definitief gemaakt werd. De aanvrager is accoord gegaan met het uitvoeren van een pilot studie.

Deze e-mail is bedoeld ter informatie, u hoeft niets te doen.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]
Centrale Commissie Dierproeven