

Inventaris Wob-verzoek W16-22S									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	<b>NTS2016410</b>								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel				x			x	
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1				x			x	
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2			x					
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3			x					
7	Bijlage beschrijving dierproeven 4			x					
8	Flow schema			x					
9	DEC-advies				x		x	x	
10	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
11	Verzoek aanvulling aanvraag				x		x	x	
12	Reactie verzoek aanvulling				x		x	x	
13	Aanvulling DEC-advies				x		x	x	
14	Advies CCD		x						x
15	Beschikking en vergunning				x		x	x	

04 FEB. 2016



AWD 115002016410

## 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](http://www.zbo-ccd.nl) of in de toelichting op de website.
- Of bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

### 1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 11500 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen															
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table><tr><td>Naam instelling of organisatie</td><td>UMC Utrecht</td></tr><tr><td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td><td>[REDACTED]</td></tr><tr><td>KvK-nummer</td><td>3 0 2 4 4 1 9 7</td></tr></table>	Naam instelling of organisatie	UMC Utrecht	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]	KvK-nummer	3 0 2 4 4 1 9 7									
Naam instelling of organisatie	UMC Utrecht																
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]																
KvK-nummer	3 0 2 4 4 1 9 7																
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	<table><tr><td>Straat en huisnummer</td><td>Instantie voor Dierenwelzijn</td></tr><tr><td>Postbus</td><td>12007</td></tr><tr><td>Postcode en plaats</td><td>3501AA Utrecht</td></tr><tr><td>IBAN</td><td>NL27INGB0000425267</td></tr><tr><td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td><td>Universiteit Utrecht</td></tr></table>	Straat en huisnummer	Instantie voor Dierenwelzijn	Postbus	12007	Postcode en plaats	3501AA Utrecht	IBAN	NL27INGB0000425267	Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Utrecht					
Straat en huisnummer	Instantie voor Dierenwelzijn																
Postbus	12007																
Postcode en plaats	3501AA Utrecht																
IBAN	NL27INGB0000425267																
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Utrecht																
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[REDACTED]</td><td><input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.	Functie	[REDACTED]		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]	
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.															
Functie	[REDACTED]																
Afdeling	[REDACTED]																
Telefoonnummer	[REDACTED]																
E-mailadres	[REDACTED]																
1.5	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[REDACTED]</td><td><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie	[REDACTED]		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]	
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.															
Functie	[REDACTED]																
Afdeling	[REDACTED]																
Telefoonnummer	[REDACTED]																
E-mailadres	[REDACTED]																

- 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 0 1 \_ 0 3 \_ 2 0 1 6
- Einddatum 0 1 \_ 0 3 \_ 2 0 2 1
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Ontwikkeling, effectiviteit en werkingsmechanismen van therapeutische antistoffen
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Ontwikkeling, effectiviteit en werkingsmechanismen van therapeutische antistoffen
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC DEC Utrecht
- Postadres Postbus 85500 3508 GA Utrecht
- E-mailadres dec-utrecht@umcutrecht.nl

## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1.584,00 Lege
- Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
- Via een eenmalige incasso
- Na ontvangst van de factuur
- Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*

## 5 Checklist bijlagen

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

## 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.

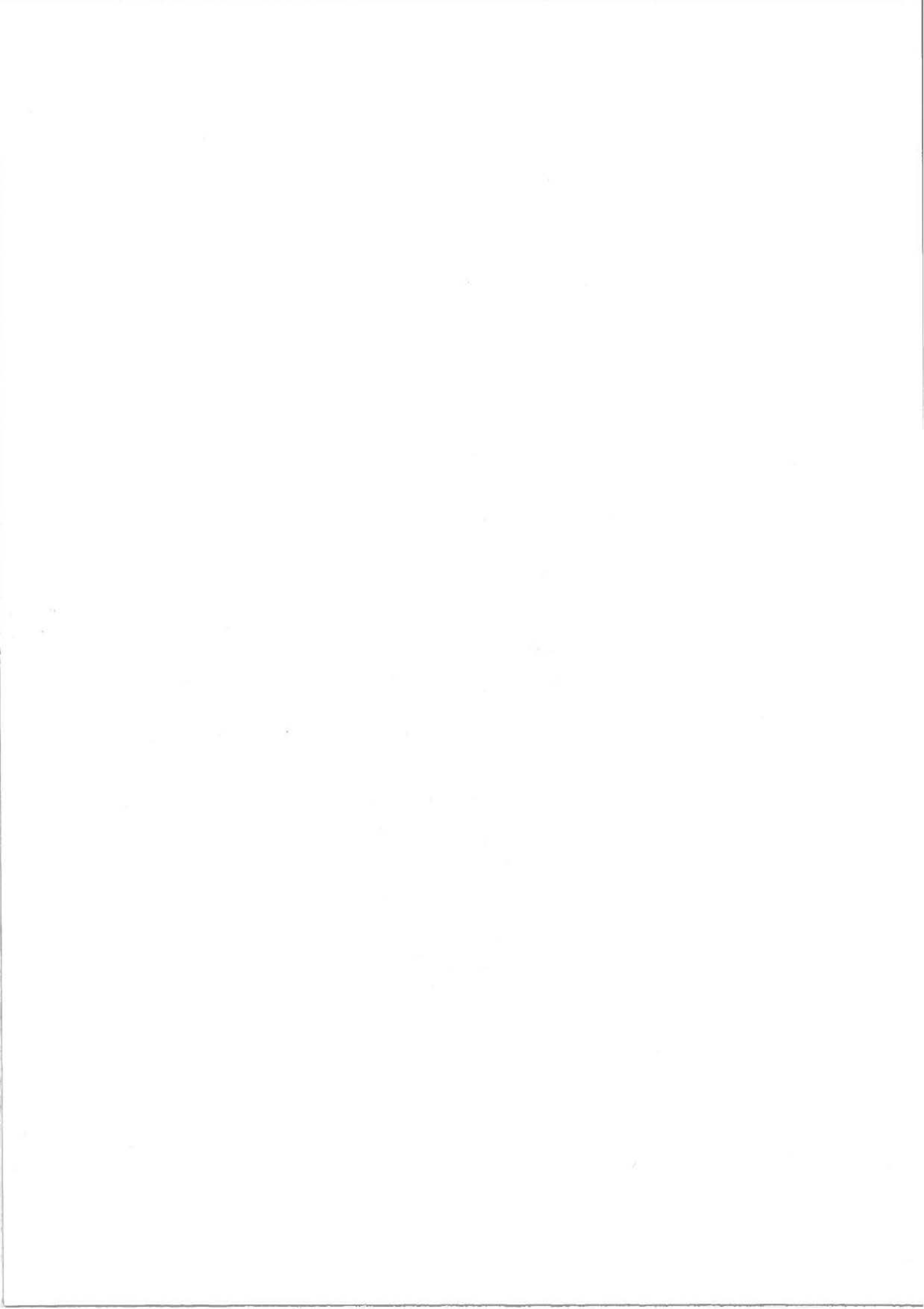
Naam 

Functie 

Plaats Utrecht

Datum 01-02-2016

Handtekening 





## Format Projectvoorstel dierproeven

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

### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul de titel van het project in.

### 2 Categorie van het project

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

### 3 Algemene projectbeschrijving

#### 3.1 Achtergrond

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

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

Centraal in ons onderzoek staan antistoffen. Antistoffen zijn lichaamseigen eiwitten die specifiek kunnen binden aan eiwitten van ziekteverwekkers zoals bacteriën en virussen. De ziekteverwekkers worden op die manier omgeven door specifieke antistoffen, een proces dat opsonisatie genoemd wordt. De op de ziekteverwekkers samengepakte antistoffen kunnen vervolgens het afweersysteem activeren wat tot uitschakeling van de ziekteverwekker leidt. Antistoffen zorgen er dus voor dat het afweersysteem ziekteverwekkers in ons lichaam herkent en uitschakelt.

Het mechanisme waarmee antistoffen het afweersysteem stimuleert en een ziekteverwekker kunnen bestrijden bestaan o.a. uit:

- Blokkeren van de functie van een eiwit van de ziekteverwekker door de interactie met de antistof. Dit kan bijvoorbeeld leiden tot het voorkomen van infectie maar ook het dood gaan van de ziekteverwekker.
- De activering van een eiwit cascade, het zogenaemde complement systeem, door samengepakte antistof. Deze eiwit cascade leidt uiteindelijk tot het "lek" maken van een ziekteverwekker waardoor deze dood gaat. Het complement systeem is van nature aanwezig in het lichaam.
- Activatie van afweercellen, zoals Natural Killer cellen, macrofagen, dendritische cellen en neutrofielen. Deze afweercellen kunnen specifiek samengepakte antistoffen herkennen en zo ziekteverwekkers identificeren en uitschakelen.
- Neutraliserende werking door opsonisatie met antistoffen van een ziekteverwekker. De ziekteverwekker zal niet meer kunnen infecteren/funktioneren vanwege de gebonden antistoffen.
- Combinaties van bovengenoemde en nog onbekende mechanismen.

Deze werkingsmechanismen van antistoffen gebruikt men ook steeds meer in de kliniek voor de behandeling van patiënten. Het betreft hier therapeutische antistoffen die speciaal ontwikkeld zijn voor de behandeling van ziektes zoals kanker, infectie ziektes, allergieën, bijwerkingen bij transplantatie procedures en auto-immuun ziektes (1). Deze therapeutische antistoffen grijpen specifiek aan op zogenaemde target eiwitten. Target eiwitten zijn bijvoorbeeld eiwitten die specifiek of sterk verrijkt op kanker cellen of ziekteverwekkers voorkomen. In het geval van kanker en infectieziektes kunnen therapeutische antistoffen het target eiwit binden waarna het afweersysteem vervolgens de kankercel of ziekteverwekker kan uitschakelen. Veel therapeutische antistoffen voor de behandeling van kanker zijn ook in staat om de functie van het target eiwit te verstoren zodat de kankercel dood gaat. Er zijn ook therapeutische antistoffen die de functie van het afweersysteem beïnvloeden. Hier gaat het bijvoorbeeld om antistoffen tegen target eiwitten zoals inhibitoire receptoren of cytokines die vaak ontregeld zijn bij auto-immuunziektes. Een voordeel van antistoffen is dus dat ze specifiek en effectief aangrijpen op de oorzaak van een ziekte in tegenstelling tot het gebruik van chemische therapieën die niet specifiek en vaak alleen symptoom bestrijdend werken. Een bijkomend voordeel van antistoftherapie is dat deze vaak goed verdragen wordt en dus gebruikt kan worden in combinatie met andere therapieën om patiënten beter te behandelen. Ook kunnen antistoftherapieën infectieziektes voorkomen of bestrijden, waarvoor geen goede medicijnen of vaccins beschikbaar zijn. Deze patiënten kunnen dankzij therapeutische antistoffen worden voorzien van een passieve immuniteit wat ziekteverwekkers neutraliseert en infectie voorkomt.

De allereerste antistoftherapie werd gebruikt voor de behandeling van non-Hogkin B-cel lymfoma met de antistof Rituximab. Deze antistoftherapie is in 1997 in gebruik genomen en grijpt aan op het CD20 target eiwit dat specifiek op B cellen voorkomt. Rituximab therapie wordt nog steeds succesvol gebruikt in de kliniek maar is doorgaans niet genezend en werkt met name levensverlengend (2). Sindsdien hebben meerdere therapeutische antistoffen een toepassing in

de kliniek gekregen. Ondanks dat deze antistoftherapieën in eerste instantie succesvol kunnen zijn zien we ook hier dat lang niet alle patiënten er goed op reageren of dat er na enige tijd resistentie tegen de antistoffen optreedt waardoor de therapie niet meer werkt en er een terugval van de ziekte is (3,4). Er is hier dus nog veel terrein te winnen als het gaat om de effectiviteit van therapeutische antistoffen en het voorkomen van resistentie. Zo zijn er bijvoorbeeld voor Rituximab al nieuwe alternatieven op de markt of in ontwikkeling (5). Bestaande antistoftherapieën behoeven dus verbetering om zodoende patiënten een beter vooruitzicht te geven. Een recent voorbeeld van een succesvolle antistoftherapie is het gebruik van antistoffen die de "immune checkpoints" blokkeren in de behandeling van kanker. Deze antistoffen doorbreken hiermee de afweer tolerante tumor omgeving zodat het eigen afweersysteem de kankercellen herkent en opruimt. Recentelijk zijn deze antistoffen veel in het nieuws geweest en zorgen in een deel van de patiënten zelfs voor genezing van verscheidene soorten kanker. Mede door dit soort successen beschouwt men de huidige ontwikkelingen in de immunotherapie, waaronder dus ook antistoftherapie, baanbrekend met de potentie om o.a. kanker te genezen (6).

In het lichaam komen een aantal type antistoffen voor waaronder IgG, IgA, IgE, IgD en IgM. De antistoffen die in de kliniek gebruikt worden zijn momenteel allemaal van het IgG isotype. IgG is een voor de hand liggende keus omdat dit het meest voorkomt in de bloed circulatie en erg stabiel is. Dit isotype is goed in staat afweermechanismen binnen het lichaam in gang te zetten die ziektes kunnen bestrijden. Een deel van ons onderzoek richt zich echter ook op het gebruik van het IgA isotype als therapeutische antistof. IgA is de meest geproduceerde antistof in het lichaam en kan overlappende, maar ook andere afweerfuncties aanzetten dan IgG. IgA is echter wel minder lang actief in ons lichaam vergeleken met IgG. Dit kan ongunstig zijn wanneer een lange termijn effect wordt beoogd, maar juist ook gunstig wanneer een kort effect wordt geprefereerd, zoals bijvoorbeeld bij pediatrische patiënten. Veel van de huidige therapeutische IgG antistoffen grijpen namelijk aan op het afweersysteem. In de praktijk blijkt dat het prille afweersysteem bij kinderen vaak niet opgewassen is tegen de persistente werking van IgG antistoffen wat uiteindelijk tot een schadelijke en permanente onbalans in het afweersysteem kan leiden.

Verder heeft ons onderzoek al laten zien dat het IgA isotype of een combinatie van IgA en IgG antistoffen tegen kanker geassocieerde target eiwitten die al gebruikt worden in de kliniek, betere anti-kanker effecten teweeg brengen (7,8). Met name de werkingsmechanismen van IgA en de betrokken afweercellen om kankercellen te doden, vormen hierbij nog een mysterie. Wij zijn daarom van plan om dit fundamentele vraagstuk op te helderen en verwachten dat daar ook dierexperimenten voor nodig zijn.

Antistoftherapie wordt ook toegepast ter voorkoming of behandeling van virus infecties (9). Wij doen momenteel onderzoek naar therapeutisch antistoffen gericht tegen respiratoire virussen, zoals respiratoir syncytial virus (RSV) en influenza. Deze virussen vormen nog altijd een serieus gevaar voor (vroeg geboren) baby's en ouderen. Momenteel is er al een IgG antistof (palivizumab) beschikbaar voor de behandeling van RSV (10). Hierbij dient men antistoffen tegen RSV intramusculair of intraveneus toe aan patiënten. Met ons lopende en toekomstige onderzoek willen we laten zien dat het toedienen van antistoffen via de luchtwegen (inhalatie) ook effectief is met als bijkomstigheid dat het de behandeling sterk vereenvoudigt, een aspect dat met name voor kinderen een minder invasieve behandeling op zou leveren. We willen hierbij ook een IgA format van anti-virale antistoffen zoals palivizumab gebruiken. Het idee om IgA antistoffen tegen respiratoire virussen te ontwikkelen komt mede voort uit het feit dat IgA antistoffen domineren in mucosa gebieden t.o.v de andere antistof isotypes. Dit zijn gebieden zoals de natuurlijke beschermlaag van slijmvliezen en longepitheel in de luchtwegen dat een barrière vormt voor deze virussen voordat zij kunnen infecteren. IgG komt van nature maar in zeer beperkte mate voor op deze locaties. Als IgA format verwachten we dus dat deze antistof via inhalatie beter presteert dan IgG, aangezien dit de natuurlijk plek is waar IgA zijn neutraliserende functie uitoefent. Onze eerste *in vivo* proeven laten al zien dat dit IgA een zeer goede preventieve werking heeft (Jacobino et. al., ongepubliceerd). Ook willen wij graag influenza neutraliserende antistoffen gaan testen in zowel het IgG als het IgA format. Dit is potentieel erg belangrijk omdat er op dit moment nog geen antistoffen in de kliniek zijn voor de behandeling van influenza infecties.

Zowel in de context van kanker en van infectieziektes, hebben wij dus al sterke aanwijzingen dat IgA een goed alternatief kan zijn voor eiwit targets waarvoor al IgG antistoffen gebruikt worden in de kliniek. Wij achten het daarom belangrijk dat dit concept verder ontwikkelt kan worden voor klinische toepassingen en hiervoor zullen we ook *in vivo* experimenten willen verrichten.

Naast de behoefte voor verbeterde antistoffen die de huidige therapeutische antistoffen kunnen vervangen, zijn er nog vele ziekten waarvoor nog geen



antistoftherapie beschikbaar is terwijl deze daar wel geschikt voor zijn. Om verbeterde en/of nieuwe antistoffen voor de behandeling van patiënten te maken is het van cruciaal belang dat we hun werkingsmechanismen goed in kaart brengen. Deze kunnen onderling sterk verschillen en zullen dus per antistof bepaald moeten worden. Verder zijn deze mechanismen niet compleet gedefinieerd en behoeven nog verder onderzoek. Binnen ons project willen wij daarom graag nieuwe antistoffen maken door muizen te immuniseren met target eiwitten en de werkingsmechanismen van deze nieuwe antistoffen te karakteriseren. De immunisatie van muizen behoort tot de meest efficiënte werkwijze om nieuwe antistoffen te maken. In het laboratorium is dit niet mogelijk omdat de benodigde biologische systemen voor een goede immunisatie en antistof opwekking in een dier te complex zijn om na te bootsen in het laboratorium. Alvorens de nieuwe antistoffen te testen in diermodellen zullen we de beste kandidaat antistoffen selecteren m.b.v. biochemische analyses en *in vitro/ex vivo* experimenten. Met dit voorwerk kunnen we al goed inschatten of een antistof ook *in vivo* zal werken en wat de belangrijkste werkingsmechanismen zijn. Ook hier geldt dat de complexiteit van de biologische systemen in een dier niet na te bootsen zijn in het laboratorium, en aangezien de antistoffen bedoeld zijn voor gebruik in de kliniek moet er ook *in vivo* bewijs geleverd worden. De werkingsmechanismen zullen we dus ook moeten onderzoeken in therapeutische diermodellen. Daarom zullen we de voorgenomen experimenten met de hierna beschreven therapeutische diermodellen dusdanig inrichten zodat de verwachte of nieuwe werkingsmechanisme(n) bevestigd/bestudeerd kunnen worden. De werkingsmechanismen willen we niet alleen onderzoeken met "eindpunt"-experimenten maar ook met "live"-experimenten. Hierbij willen we met intravitale microscopie de groei van tumorcellen en de antistof gemedieerde interactie met afweercellen in beeld brengen in het levende dier. Voor een overzicht van onze onderzoekstrategie verwijzen we naar onderdeel 3.4 van dit projectvoorstel en het bijgesloten flowchart figuur (pdf bijlage).

#### Literatuur referenties

##### 1. Therapeutic antibodies: Discovery, design and deployment

Ramslanda PA, Hutchinson AT, Carter PJ. *Molecular Immunology*, 2015 Oct;67(2, PartA):1-3.

pii: S1040-8428(15)30041-X. doi: 10.1016/j.critrevonc.2015.09.001. [Epub ahead of print]

##### 2. A molecular perspective on rituximab: A monoclonal antibody for B cell non Hodgkin lymphoma and other affections.

Seyfizadeh N, Seyfizadeh N, Hasenkamp J, Huerta-Yepes S. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 2015 Sep 30.

##### 3. The safety and side effects of monoclonal antibodies

Hansel TT, Kropshofer H, Singer T, Mitchell JA, George AJT. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2010, 9, 4:325-338.

##### 4. Adverse effects of the humanized antibodies used as cancer therapeutics

Klastersky J. *Current Opinion in Oncology*, 2006, 18, 4:316-320.

##### 5. Novel CD20 monoclonal antibodies for lymphoma therapy.

Cang S, Mukhi N, Wang K, Liu D. *Journal of Hematology and Oncology*, 2012 Oct, 11;5:64.

##### 6. Cancer Immunotherapy

Couzin-Frankel J. *Science*, 2013, 342, 6165:1432-1433

##### 7. IgA EGFR antibodies mediate tumour killing in vivo

Boross P, Lohse S, Nederend M, Jansen JH, van Tetering G, Dechant M, Peipp M, Royle L, Liew LP, Boon L, van Rooijen N, Bleeker WK, Parren PW, van de Winkel JG, Valerius T, J.H.W. Leusen. *EMBO Molecular Medicine*, 2013 Aug;5(8):1213-26.

##### 8. Simultaneous Targeting of FcγRs and FcαRI Enhances Tumor Cell Killing

Brandsma AM, ten Broeke T, Nederend M, Meulenbroek LAPM, van Tetering G, Meyer S, Jansen JHM, Beltran Buitrago MA, Nagelkerke SQ, Nemeth I, Ubink R, Rouwendal G, Lohse S, Valerius T, Leusen JHW, Peter Boross P. *Cancer Immunology Research*, 2015:1-9 In Press

##### 9. Monoclonal antibodies for prophylactic and therapeutic use against viral infections

Both L, Banyard AC, van Dolleweerd C, Wrig ht E, Ma JK-C, Fooks AR. *Vaccine*, 2013, 31, 12:1553-1559.

##### 10. Development and use of palivizumab (Synagis): a passive immunoprophylactic agent for RSV

Pollack P, Groothuis JR, Barbarotto GM. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 2002, 8, 3:201-206.

### 3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

Ons streven is om nieuwe en effectievere antistoffen te ontwikkelen en hun werkingsmechanismen te bepalen. Deze antistoffen en kennis willen we uiteindelijk gebruiken voor de ontwikkeling van nieuwe therapieën of het verbeteren van huidige therapieën. Uiteindelijk hopen wij te kunnen bijdragen aan betere of genezende behandelingen voor o.a. kanker en infectieziekten. De focus van onze onderzoeksgroep ligt dus bij de antistoffen en hun werking maar niet noodzakelijk in de context van één bepaalde ziekte.

Wij willen graag bestaande antistoffen verbeteren omdat de huidige antistoffen vaak niet bij alle patiënten werken. De redenen hiervoor zijn vaak al onderzocht en kan bijvoorbeeld liggen het optreden van resistentie of aan de genetische achtergrond van deze patiënten. Door stukjes van bestaande antistoffen aan te passen proberen wij deze problemen op te lossen en de antistoffen effectiever te maken. Momenteel richten wij ons met name op de ontwikkeling van betere alternatieven van antistoffen tegen de target eiwitten CD20, Her2 (een eiwit dat verhoogd voorkomt bij o.a. borstkanker), EGFR (een eiwit dat verhoogd voorkomt bij o.a. darm kanker) en neutraliserende antistoffen tegen virus eiwitten van RSV en influenza. Ook genereren wij antistoffen tegen nieuwe targets. Dit zijn momenteel target eiwitten die van toepassing zijn op meerdere type kankers of selectief voor een bepaald type kanker. Voor het genereren van nieuwe antistoffen immuniseren wij muizen met de gekozen target eiwitten om uiteindelijk antistof producerende cellijnen (hybridoma's) te genereren. De keuze voor een target eiwit hangt af van verschillende factoren zoals specificiteit voor een ziekte en functie van het target eiwit. Wij hebben al verschillende panels van nieuwe antistoffen kunnen maken welke momenteel gekarakteriseerd worden. Wij verwachten de komende vijf jaar dan ook deze lijn voort te zetten en meerdere nieuwe antistoffen te maken, karakteriseren en de *in vitro*, *ex vivo* en *in vivo* effectiviteit en werkingsmechanismen te bepalen. De translatie richting de kliniek zal meer tijd kosten en zal mogelijk in samenwerking met biotechnologische/farmaceutische bedrijven gebeuren. Hiervoor zal dan een aparte aanvraag voor worden geschreven.

In een ander deel van ons onderzoek willen we aantonen dat IgA antistoffen net zo goed of zelfs effectiever kunnen zijn dan IgG antistoffen. Hiervoor hebben wij reeds bestaande therapeutische IgG antistoffen bedoeld voor borst- en darmkanker omgezet naar IgA antistoffen. Er is tevens aangetoond met *in vitro* en *in vivo* experimenten dat we met deze IgA antistoffen betere resultaten behalen dan met IgG antistoffen. Omdat blijkt dat het IgA isotype beter werkt, zijn we dit concept verder aan het verkennen met IgA antistoffen tegen eiwit targets die al gebruikt worden voor kanker en virussen. Wij hebben dan ook al *in vivo* experimenten uitgevoerd die laten zien dat IgA antistoffen tegen target eiwitten van RSV en influenza een effectieve werking hebben tegen deze virussen. De technologie om IgG en IgA antistoffen aan te passen en in voldoende mate te produceren is aanwezig in ons laboratorium, mede dankzij de samenwerking met de groep van Thomas Valerius in Kiel, Duitsland. Met dit deel van ons onderzoek hopen wij in de toekomst antistof therapieën gebaseerd op IgA naar de kliniek te brengen ter verbetering of als alternatief voor IgG antistof therapieën.

### 3.3 Belang

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

Voor een aantal klinische scenario's worden antistoftherapieën al succesvol toegepast. Deze therapieën kunnen erg goed aanslaan maar dit geldt zeker niet voor alle patiënten. Bovendien zijn er voor veel ziektes nog geen antistof therapieën beschikbaar waar dit wel goed mogelijk zou kunnen zijn. Met de voorgenomen studies willen wij nieuwe en betere antistoffen ontwikkelen en de kennis over het effect en werkingsmechanisme van antistoftherapie vergroten. Hiermee verwachten we dat er in de toekomst meer patiënten, beter behandeld kunnen worden, maar ook dat er beter ingeschat kan worden of een antistoftherapie goed zal aanslaan bij een patiënt. Betere antistoftherapieën zullen ook leiden tot minder invasieve en dure behandelingen zoals chirurgische ingrepen.

Antistoftherapieën worden over het algemeen goed verdragen omdat ze veel specifiekere werking hebben dan therapieën met conventionele medicijnen. Hierdoor kunnen antistoftherapieën vaak goed gecombineerd worden met andere therapieën ter verbetering van de behandeling en zelfs genezing van patiënten waarbij conventionele therapieën geen effect meer hebben. Een bijkomend voordeel is dat antistoffen veel minder frequent hoeven te worden toegediend dan conventionele medicijnen. Dit komt omdat antistoffen, met name die van het IgG isotype, zeer stabiel zijn en wel tot een aantal maanden na de therapie nog terug te vinden zijn in de patiënt.

Wij doen ook onderzoek naar antistoffen voor de behandeling of het voorkomen van infecties van de respiratoire virussen RSV en influenza. Dergelijke antistoffen worden in de kliniek intraveneus of intramusculair toegediend. In onze studies testen wij ook de toediening van deze antistoffen via de luchtwegen (inhalatie). Mits effectief zou dit een veel minder invasieve en werkzaamere toedieningsroute zijn ten bate van de patiënt en de kliniek.

---

### 3.4 Onderzoeksstrategie

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

Voor een overzicht van de opzet van het project verwijzen wij ook naar de flowchart, te zien in het figuur (pdf file) bijgesloten bij deze projectaanvraag.

##### **A) Kiezen target eiwit.**

Als academische groep zijn wij o.a. geïnteresseerd in de werkingsmechanisme van therapeutisch antistoffen. Voor dit meer fundamentele deel van ons onderzoek ligt het daarom voor de hand om target eiwitten te kiezen waarover al veel bekend is en/of waar ook al therapeutische antistoffen voor zijn. Voor onze studies zal het target eiwit gerelateerd zijn aan kanker of virus/bacterie infecties. Vaak zijn bestaande therapeutische antistoffen niet 100 % effectief wat een extra reden voor ons is om deze nader te onderzoeken en deze zijn ook goede controle antistoffen om onze nieuwe antistoffen mee te vergelijken. Goede voorbeelden van dergelijke target eiwitten zijn: CD20 (B-cel maligniteiten), Her2 (Borstkanker), EGFR (dikke darm kanker), F-eiwit (RSV). Het kan ook zo zijn dat er nieuwe antistoffen gewenst zijn voor eiwitten die een rol spelen bij de werkingsmechanismen van antistoffen. Bijvoorbeeld nieuwe antistoffen tegen bepaalde Fc receptoren (de receptor voor antistoffen op het oppervlak van afweercellen), zodat hun rol in de antistof werkingsmechanismen onderzocht kan worden.

Ook kiezen we nieuwe ziekte gerelateerde target eiwitten waartegen we antistoffen willen maken. Dit zijn target eiwitten waarvan uit (gepubliceerd) wetenschappelijk onderzoek blijkt dat ze een belangrijke rol spelen bij een ziektebeeld of eiwitten die bijvoorbeeld specifiek bij een of meerdere kankers voorkomen. Bij de keuze voor nieuwe target eiwitten evalueren we eerst aan de hand van wetenschappelijke publicaties en patenten of er niet al goede antistoffen zijn tegen een nieuw target. Dit is belangrijk om de maatschappelijke/farmaceutische/financieel-economische potentie van een nieuwe antistof in te schatten.

##### **B) Muizen immuniseren met een target eiwit voor het genereren van nieuwe antistoffen.**

Wanneer er gekozen is voor een bepaald target eiwit gaan we hiertegen nieuwe antistoffen maken door muizen te immuniseren. Hierbij gaan we het eiwit target toedienen aan de muis waarna het afweersysteem van de muis antistoffen moet gaan maken tegen het eiwit target. Of een muis inderdaad antistoffen tegen het beoogde eiwit target is gaan maken wordt eerst bepaald. Hiervoor wordt bloed van de muis afgenomen en in het laboratorium getest voor de aanwezigheid van antistoffen tegen het target eiwit. Antistoffen worden gemaakt door een type afweercel, de zogenoemde B cellen. De B cellen van de geïmmuniseerde muis worden vervolgens uit de milt/lymfeknopen gehaald en in het laboratorium gefuseerd met SP2/0 cellen. SP2/0 cellen zijn muizen myeloma cellen (een soort tumor cellen) welke onsterfelijk zijn. Deze eigenschap moet na fusie met een B cel behouden blijven zodat er een nieuwe stabiele onsterfelijke en antistof producerende cel ontstaat. Deze cel is dus een hybride van een B cel en een SP2/0 cel en wordt dan een hybridoma genoemd. Na dit fusie protocol zullen een deel van de hybridoma cellen antistoffen produceren tegen het target eiwit. Deze hybridoma's zullen verdere selectie ondergaan op basis van stabiliteit van de hybridoma en de kwaliteit van de antistof die geproduceerd wordt per hybridoma. Uiteindelijk worden zo hybridoma's verkregen welke nieuwe unieke antistoffen maken tegen het beoogde eiwit target. Jarenlange ervaring van de onderzoeksgroep maar ook de consensus uit

de mondiale onderzoekswereld maakt het immuniseren van dieren, in ons geval muizen, tot de meest efficiënte methode om nieuwe antistoffen te maken.

### **C) Nieuwe antistoffen worden (recombinant) geproduceerd en getest op hun biochemische eigenschappen in het laboratorium.**

Nadat er hybridoma's verkregen zijn kunnen we deze gebruiken om grotere hoeveelheden van de antistoffen te produceren. Ook kunnen we dankzij de hybridoma's de genetische code van deze muizen antistoffen achterhalen. Op basis van deze genetische code kunnen we de antistoffen ook recombinant produceren. Dit houdt ook in dat we de antistoffen kunnen omzetten naar een IgA format omdat normaliter de nieuwe antistoffen uit de geïmmuniseerde muis van het IgG isotype zijn. Tevens kunnen we in een later stadium van het onderzoek de meest veelbelovende antistoffen humaniseren. Het humaniseren van een antistof houdt in dat de antistof zoveel mogelijk wordt aangepast naar een humane vorm terwijl de therapeutische eigenschappen bewaard blijven. Door het humaniseren van antistoffen is er zo min mogelijk kans dat er later in een patiënt resistentie gaat optreden tegen de therapeutische antistof.

De nieuwe antistoffen zullen getest worden in het laboratorium op hun kwaliteit en manier van binding aan het target eiwit. Wij hebben hiervoor verschillende methodes beschikbaar waaronder ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), SPR (surface plasmon resonance) en ligand tracer (<http://www.kbc.umu.se/ligand-tracer-instrument.html>).

### **D) *In vitro/ex vivo* Effectiviteit en werkingsmechanismen van nieuwe antistoffen**

Tijdens de ontwikkeling van antistoffen maken we gebruik van een aantal *in vitro* experimenten. We testen of een nieuwe antistof een binding gemedieerd effect kan veroorzaken waarbij de target cellen dood gaan (apoptose) vanwege de binding van de antistof aan het target eiwit. Antistoffen tegen virussen kunnen we *in vitro* testen met neutralisatie assays. Hierbij worden virus en antistof aan infecteerbare cellen gevoegd. Na enige tijd kan er dan gekeken worden hoeveel van de cellen geïnfecteerd zijn door het virus.

De werking en effectiviteit van nieuwe antistoffen en de rol van afweercellen en het complement systeem onderzoeken we altijd eerst met humaan materiaal. Het gaat hier om humaan bloed van gezonde vrijwilligers verkregen via de mini-donor dienst in het UMC Utrecht. Hierbij kan er o.a. *in vitro* gekeken worden of een antistof ADCC (antibody dependent cellular cytotoxicity) en/of CDC (complement dependent cytotoxicity) activiteit vertoont. Met ADCC experimenten kunnen we bijvoorbeeld bekijken of de nieuwe antistoffen samen met bepaalde afweercellen uit humaan bloed, kankercellen kunnen doden die het target eiwit expresseren (target cellen). Daarnaast zullen we met CDC experimenten testen of de antistoffen target cellen kunnen doden m.b.v. het complement systeem geïsoleerd uit humaan bloed. Afhankelijk van de resultaten verkregen met het humane materiaal zullen we antistoffen ook testen met vergelijkbare *in vitro/ex vivo* experimenten waarbij gebruik gemaakt wordt van muizen materiaal. Met de uitslagen van deze experimenten komen we niet alleen te weten of de antistoffen dus ook met ander dierlijk materiaal werken maar ook hoe de werkwijze wordt van vervolg *in vivo* experimenten waarbij we tumor of virus modellen gebruiken in muizen.

### **E) Een selectie van antistoffen testen op hun werking in geschikte muismodellen**

Uiteindelijk willen we veelbelovende antistoffen testen met *in vivo* experimenten in muizen. Voor antistoffen die we ontwikkelen voor kanker gerelateerde eiwit targets gebruiken we tumormodellen. Bij deze modellen dienen we eerst tumorcellen toe waar het target eiwit op voorkomt. Deze tumorcellen worden op een bepaalde locatie van het dier ingebracht. Vervolgens starten we de behandeling van de dieren met de antistoffen en volgen de tumorgroei. Voor onze langlopende tumormodellen gebruiken wij vaak tumorcellen die ook het luciferase eiwit maken zodat de tumorgroei m.b.v. bioluminescentie zichtbaar gemaakt kan worden. Op deze manier kunnen we de tumorgroei makkelijk volgen gedurende langere periodes (weken). Anderzijds kunnen we ook tumormodellen gebruikt waarbij we de tumorgroei volgen door de tumoromvang te bepalen met een schuifmaat, bijvoorbeeld bij langlopende subcutane modellen. Ook gebruiken wij kortlopende tumormodellen (enkele dagen) waarbij tumorcellen in het peritoneum worden gebracht, de dieren met antistof worden behandeld, waarna de tumorcellen uit het peritoneum worden geogst en gekwantificeerd.

Onze onderzoeksgroep wil ook graag de tumormodellen op een nieuwe manier benaderen, namelijk met intravitale 2-foton fluorescentie microscopie. Hierbij kunnen we met microscopie de tumorcellen en de behandeling met antistoffen live volgen. Dit gaat via een kijkvenster dat in de huid van de muis is



█ Bij de klassieke immunisatie worden de muizen ingespoten/geïmmuniseerd met een recombinant geproduceerd target eiwit samen met Freund's complete adjuvans. Daarna zullen we de afweer reactie versterken door opeenvolgend extra immunisaties te verrichten in de aanwezigheid van Freund's incomplete adjuvans. Met deze methode kunnen antistoffen opgewekt worden tegen oplosbare en membraan gebonden eiwitten. Een nadeel van deze methode kan zijn dat het target eiwit meestal niet in zijn natuurlijk vorm wordt aangeboden aan het afweersysteem. Dit kan er toe leiden dat een deel van de opgewekte antistoffen configuraties van een eiwit herkennen die normaliter niet voorkomen en dus niet toepasbaar zijn als therapeutische antistof. Om antistoffen op te wekken tegen membraan gebonden eiwitten █ kunnen muizen ook worden geïmmuniseerd met █

worden in het laboratorium gemaakt en zullen na toediening door de muis █

. We zullen ook hier de afweer reactie versterken door █ toe te dienen. Het gebruik van █ heeft in het verleden al laten zien beter in staat te zijn om antistoffen tegen moeilijke membraan eiwitten op te wekken.

Na het immuniseren zullen we met het bloed van de muizen bepalen welke dieren antistoffen maken tegen het target eiwit. De milt en de lymfe knopen van deze dieren, een bron van antistof-producerende cellen, zullen dan gebruikt worden om stabiele antistof producerende hybridoma's te genereren.

We verwachten dat we maximaal 8 keer per jaar een immunisatie experiment zouden uitvoeren, wat neerkomt op 40 immunisatie experimenten voor 5 jaar.

### **C) Nieuwe antistoffen worden recombinant geproduceerd en getest op hun biochemische eigenschappen in het laboratorium.**

Voor dit onderdeel zullen geen dierproeven nodig zijn.

### **D) *In vitro/ex vivo* Effectiviteit en werkingsmechanismen van nieuwe antistoffen**

#### Dierproef 2: Verzamelen van muismateriaal

We willen nieuwe antistoffen eerst *in vitro/ex vivo* testen met materiaal van muizen. Op deze manier willen we hun vermogen om cytotoxische effector functies uit te lokken door afweercel activatie beter kunnen inschatten. Hiervoor worden afweercellen (macrofagen, dendritische cellen) opgekweekt uit beenmerg en/of afweercellen uit bloed geïsoleerd. Het beenmerg zal geïsoleerd worden uit de femur en tibia van de muis en het bloed zal verkregen worden via verbloeding d.m.v. een hart punctie. De opgekweekte of geïsoleerde afweercellen zullen vervolgens gebruikt worden voor *in vitro/ex vivo* experimenten in het laboratorium. Op deze manier willen we eerst de effector eigenschappen van de antistoffen vaststellen, voordat ze in grotere *in vivo* experimenten gebruikt gaan worden.

### **E) Een selectie van antistoffen testen op hun werking in geschikte muis modellen**

#### Dierproef 3: Tumor modellen

De antistoffen die we ontwikkelen tegen kanker gerelateerde eiwit targets moeten getest worden op hun tumor remmende of genezende werking. Voor onze tumormodellen gebruiken we tumorcellen waarop het eiwit target voorkomt. Deze tumorcellen dienen we toe aan de muizen waarna de tumorcellen enige tijd kunnen uitgroeien. De dieren ondergaan vervolgens een behandeling met antistoffen en de tumor uitgroei wordt periodiek gecontroleerd m.b.v. bioluminescentie of volume bepalingen met een schuifmaat. Afhankelijk van het model willen we ook diermateriaal oogsten voor nadere analyse na beëindiging van de dierproef voor bijvoorbeeld histologische analyse, bloedonderzoek of om metastase te scoren. We willen ook graag tumormodellen gaan volgen in levende muizen met 2-foton fluorescentie microscopie (intravitale microscopie). De muis zal m.b.v. operatieve handelingen een kijk venster in de huid krijgen. De locatie van het venster zal afhangen van het tumor model, bijvoorbeeld op de buik voor een intraperitoneaal model, etc. Afweercellen en tumorcellen zullen met de microscoop te herkennen zijn door fluorescente markers die we de muis kunnen toedienen. Tevens kunnen we transgene muizen gebruiken die bijvoorbeeld een type afweercellen maakt waarin een fluorescent eiwit tot expressie komt. Uiteindelijk dienen deze experimenten ervoor om te kijken of de antistoffen tumorgroei tegen kunnen gaan of zelfs de tumor kunnen klaren en welke onderdelen van het afweersysteem hierbij betrokken zijn.

#### Dierproef 4: Respiratoire virus modellen

We ontwikkelen ook antistoffen om respiratoire virussen zoals RSV en influenza te bestrijden. Deze antistoffen zijn niet alleen bedoeld om deze virussen na infectie te bestrijden maar ook om infectie te voorkomen. Om onze antistoffen te testen willen we daarom de dieren wel of niet preventief met antistof behandelen. De antistoffen worden hierbij via inhalatie toegediend, waarna de dieren intranasaal geïnfecteerd worden met virus. Om de effectiviteit van het toedienen van antistoffen via de luchtwegen te testen willen we graag een vergelijk kunnen maken met de gebruikelijke intraveneuze en intramusculaire vaccinatie- of behandelingsroutes. Afhankelijk van de gekozen proefopzet zullen we de dieren eventueel verder behandelen met antistoffen na infectie met virus. Om de werking van de antistoffen te bepalen zullen we periodiek het gewicht van de dieren bepalen en analyseren we de nasale of broncho-alveolaire lavage vloeistoffen en longweefsel. Met deze analyses zal bepaald worden hoeveel virus er in de luchtwegen aanwezig was, of er sprake is van een preventieve werking van de antistoffen en of ze ook effectief zijn na infectie.

---

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

---

Voor ons onderzoek moeten we na het kiezen van een eiwit target in eerste instantie dieren gebruiken om nieuwe antistoffen te maken. Het betreft hier reeds bekende maar zeker ook nieuwe target eiwitten waar nog geen therapeutische antistoffen voor ontwikkeld zijn. Na biochemische analyse, maken we een selectie van de meest veelbelovende antistoffen. Deze testen we verder met *in vitro* experimenten waarbij naast humaan materiaal ook muis materiaal gebruikt zal worden. Op basis van die resultaten wordt er een verdere selectie gemaakt van de antistoffen. Veelal zijn deze antistoffen bedoeld om als therapeuticum te gaan gebruiken. Voordat we klinische trials gaan ondernemen met patiënten zal de effectiviteit en werking van de nieuwe antistoffen getest moeten worden in muizen. Naar verhouding zullen we voor dit laatste de meeste dieren gebruiken.

---

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Immunisaties van muizen
2	Verzamelen van muis materiaal
3	Tumor modellen
4	Respiratoire virus modellen
5	
6	
7	
8	
9	
10	





## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

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

#### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer                           | Type dierproef                                      |
|--------------------------------------|---|
| <input type="text" value="3.4.4.1"/> | <input type="text" value="Immunisatie van muizen"/> |

*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*

#### 2 Beschrijving dierproeven

##### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Voor het genereren van nieuwe antistoffen worden er twee verschillende protocollen gebruikt: een klassiek immunisatie-protocol om antistoffen tegen alle type target eiwitten te genereren en  De eiwit targets of "antigenen" die geselecteerd worden zullen doorgaans eiwitten zijn die een immunologische relevantie hebben of direct geassocieerd en/of specifiek zijn voor een ziekte.

### **Klassieke immunisatie-protocol**

Dit immunisatie-protocol kan op een korte termijn uitgevoerd worden omdat alleen het eiwit of een stukje daarvan (peptide) benodigd is om muizen mee te immuniseren. Deze eiwitten of peptiden kunnen we simpelweg via commerciële weg verkrijgen. Voor het klassieke immunisatie-protocol worden de dieren geïmmuniseerd door het eiwit/peptide samen met compleet Freund's adjuvans (CFA) subcutaan te injecteren. Vervolgens krijgen de dieren meerdere keren een boost met het eiwit/peptide in incomplete Freund's adjuvans (IFA). Op verschillende tijdstippen zullen we de antilichaam titers bepalen in bloed, afgenomen door middel van de wangprik. Na de laatste boost worden de dieren verbloed en de antistof producerende cellen uit de milt en lymfeknopen geogst. Deze cellen kunnen we in het laboratorium fuseren met myeloma cellen (SP2/0 cellen). Hieruit worden vervolgens stabiele onsterfelijke hybride cellen (hybridoma's) gegenereerd en geselecteerd die antistoffen produceren. Ervaring uit het verleden heeft al uitgewezen dat deze methode prima voldoet wanneer er antistoffen nodig zijn als reagens voor het onderzoek, bijvoorbeeld voor detectie van het target eiwit in de assays die in het laboratorium gebruikt worden. Ook kan deze methode antistoffen opleveren die geschikt zijn als therapeuticum.

### **Nieuwe immunisatie-methode**

Ons onderzoeksteam heeft een nieuwe immunisatie-methode ontwikkeld om antistoffen op te wekken tegen membraan gebonden eiwitten. Deze methode heeft als voordeel dat [REDACTED]

[REDACTED] Dit leidt er toe dat we met deze methode efficiënter antistoffen kunnen genereren die ook toepasbaar zijn als therapeuticum. Uit ervaring weten we al dat deze methode zeer geschikt is om antistoffen op te wekken tegen moeilijke eiwit targets die een inefficiënte respons geven met de klassieke immunisatie methode.

Voor de nieuwe methode worden [REDACTED] gebruikt. [REDACTED] In het laboratorium worden er eerst [REDACTED]

[REDACTED]. Normaliter worden [REDACTED]. De muis zal een aantal keren geboost worden met [REDACTED] en we gaan de antistof concentratie in het bloed tegen het specifieke antigeen op een aantal momenten tijdens de dierproef bepalen. Wanneer een muis de gewenste antistoffen maakt voeren we nog eenmaal een boost uit met [REDACTED]. Hierna worden de dieren verbloed en de antistof producerende cellen uit de milt en lymfeknopen geogst. Deze cellen zullen we vervolgens gebruiken in een fusie experiment om stabiele antistof producerende hybridoma's te generen zoals hierboven omschreven voor het klassieke immunisatie protocol.

---

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

### **Klassieke immunisatie-protocol**

Voor het klassieke immunisatie-protocol worden de dieren geïmmuniseerd door het antigeen met CFA subcutaan te injecteren. Voor een goede immunisatie is het belangrijk het afweersysteem zo goed mogelijk te stimuleren bij de eerste blootstelling aan het eiwit target. Dit gaat het beste door CFA te gebruiken. Vervolgens krijgen de dieren op dag 21 en wanneer nodig (max 3x) een boost met het antigeen. Voor een boost wordt het antigeen met IFA subcutaan ingespoten. Om antilichaam titers te bepalen wordt er voor de immunisatie bloed afgenomen (als negatieve controle) en daarna op dag 14, 21 en wanneer nodig. Het bloed wordt afgenomen d.m.v. de wangprik. De frequentie van bloed afname zal mede bepaald worden door de uitslag van de antilichaam titers uit de eerdere bloedmonsters maar zal maximaal 6x zijn per muis en maximaal 1x per twee weken. Dieren met positieve antilichaam titers zullen we vier dagen na de laatste boost verbloeden onder anesthesie en analgesie via de orbital plexus of met een hartpunctie. Voor deze klassieke immunisatie methode is het standaard om 2 muizen per immunisatie experiment te gebruiken en het experiment zal maximaal een jaar duren.

### **Nieuwe immunisatie-methode**

Bij de nieuwe methode worden [REDACTED]

█ bij de muizen. █  
Normaliter zullen █ gegeven worden. Om antilichaam titers te bepalen wordt er voor de immunisatie bloed afgenomen (als negatieve controle) en daarna █  
Het bloed wordt afgenomen d.m.v. de wangprik. De frequentie van bloed afname zal mede bepaald worden door de uitslag van de antilichaam titers uit de eerdere bloedmonsters maar zal maximaal 6x zijn per muis en maximaal 1x per week. Vier dagen na de laatste boost worden de dieren verbloed via de orbital plexus of met een hartpunctie.  
Voor de nieuwe immunisatie-methode worden █ de antistoffen opgewekt moeten worden. █  
█ het specifieke eiwit target. Eerdere studies hebben laten zien dat █  
█ een antistof respons te induceren. Verder is het moeilijk om van tevoren te voorspellen █ een goede antistof productie zullen zorgen, daarom zullen we maximaal █ gebruiken voor de immunisatie. Eerdere studies hebben laten zien dat █ muizen moeten worden ingespoten om voldoende antistof producerende hybridoma's te genereren. In totaal willen we dus maximaal 9 dieren gebruiken per eiwit target waartegen antistoffen moeten worden opgewekt.

---

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

Voor het klassieke immunisatie protocol worden 2 muizen per immunisatie gebruikt.

Voor de nieuwe immunisatie methode worden er maximaal 9 dieren per experiment gebruikt.

Deze aantallen zijn gebaseerd op ervaringen uit het verleden en zijn doorgaans toereikend om met één immunisatie experiment voldoende hybridoma's te genereren.

---

## B. De dieren

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

Voor deze immunisatie experimenten zullen doorgaans wildtype C57BL/6JRj of Balb/c muizen worden gebruikt. Indien nodig en beschikbaar kunnen er muizen worden gebruikt die het target eiwit niet expresseren. Deze zogenoemde knock-out (KO) muizen zijn niet tolerant voor het eiwit target en zijn daardoor beter geschikt voor antilichaam inductie. Omdat het eiwit target per immunisatie wisselt, is het onmogelijk om nu aan te geven welke KO muizen eventueel gebruikt gaan worden.

Verwacht wordt dat er maximaal 8 immunisaties met beide methodes per jaar ingezet zullen worden. Dit zijn dus  $8 \times 2 = 16$  muizen voor de klassieke methoden en  $8 \times 9 = 72$  muizen voor de nieuwe methode. Samen zullen dit dus 88 muizen per jaar zijn.

In totaal wordt het aantal benodigde muizen voor 5 jaar dus op  $5 \times 88 = 440$  muizen geschat.

Bij voorkeur worden volwassen dieren gebruikt van minimaal 6 weken tot maximaal 21 weken oud.

Om er zeker van te zijn dat het afweersysteem van de dieren volledig ontwikkeld is worden er geen dieren jonger dan 6 weken gebruikt.

De maximale duur van een immunisatie experiment wordt gesteld op 1 jaar. Dieren ouder dan 21 weken worden derhalve niet gebruikt om het risico op vroegtijdige beëindiging van het experiment door ouderdom te voorkomen. Voor deze immunisatie experimenten zullen beide geslachten gebruikt worden. Zowel mannetjes als vrouwtjes worden geacht in staat te zijn de benodigde afweerreactie uit te voeren om antistoffen tegen de aangeboden target eiwitten te maken.

De wildtype dieren zullen worden verkregen van een geregistreerd fok- of afleveringsbedrijf in de EU.

De KO muizen zullen indien mogelijk van een geregistreerd fok- of afleveringsbedrijf in de EU en anders van elders ter wereld worden verkregen.

### C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

### D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Er is geen andere proefdierlijke methode die zo efficiënt en zulke goede antistoffen opwekt dan het immuniseren van levende muizen. De klassieke immunisatie methode gebruikt naar verwachting minder dieren dan de nieuwe immunisatie methode. Maar de nieuwe immunisatie methode werkt echter beter [REDACTED] het afweersysteem. De kans is dus groter dat deze methode betere antistoffen zal genereren die geschikt zijn als therapeutikum.

Voorgaande immunisatie experimenten, zoals aangegeven onder A, hebben laten zien dat de gekozen dier aantallen per immunisatie experiment meestal voldoende zijn om voldoende antistoffen te genereren. In enkele gevallen was het (nog) niet succesvol. Dit is echter geen reden om het aantal dieren per immunisatie te verhogen omdat het experiment falen ook kan liggen aan de procedure in het laboratorium die volgt na de dierproef. Voorgaande experimenten waarbij deze immunisatie protocollen zijn uitgevoerd worden vastgelegd in het dierproef dossier en gerapporteerd in het labjournaal van de betrokken medewerker(s). Deze labjournaals zijn digitaal en kunnen door iedere medewerker binnen de onderzoeksgroep geraadpleegd worden. Dit zal helpen voorkomen dat een immunisatie onnodig herhaald zou worden. Bij de keuze van een nieuw eiwit target evalueren we goed hoe relevant deze is m.b.v. wetenschappelijke publicaties en bijvoorbeeld patenten. Het kan mogelijk zijn dat er reeds antistoffen zijn ontwikkeld tegen een eiwit target en dat deze gepatenteerd/beschermd zijn en dus niet gebruikt kunnen worden door de onderzoeksgroep voor verdere ontwikkeling. Een dergelijke situatie zou ons kunnen doen besluiten om toch nieuwe antistoffen tegen het target eiwit te maken met onze nieuwe methode. Deze nieuwe antistoffen zullen naar alle waarschijnlijkheid niet dezelfde eigenschappen hebben en dus bijdrage aan de ontwikkeling van een therapeutische antistoffen arsenaal dat beschikbaar is tegen een target eiwit. De technologie voor de nieuwe immunisatie methode wordt zover bekend alleen door onze onderzoeksgroep toegepast en een commercieel bedrijf aan wie de technologie is gelicenseerd door de projectaanvrager. De kans dat er dieren worden gebruikt voor een identiek immunisatie experiment met de nieuwe methode is daarom erg klein.

Om de kans op succes te vergroten en het gebruik van dieren met de nieuwe immunisatie methoden te beperken, wordt er vooraf [REDACTED]

Het ongerief van de dieren zal zo veel mogelijk beperkt worden door het gebruik van standaard kooiverrijking. Zowel mannetjes als vrouwtjes zullen gebruikt worden voor de immunisatie experimenten.

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

De dieren worden in groepsverband gehuisvest en worden verder volgens de reguliere welzijnscontrole dagelijks beoordeeld op basis van gedrag, houding, gang/mobiliteit, voedingstoestand en verzorgingstoestand.

In dit experiment zal het antigeen waartegen antistoffen opgewekt moeten worden ingebracht bij de muizen op een wijze welke een goede toegang biedt aan het afweersysteem. Een subcutane of ██████████ toediening met een injectiespuit is de minst invasieve methode om dit te bereiken en zal licht ongerief veroorzaken.

Aan het einde van het experiment zullen de dieren analgesie en anesthesie krijgen om het risico op ongerief tijdens het verbloeden zo klein mogelijk te houden.

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

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

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Het [REDACTED] inspuiten kan mogelijk pijn veroorzaken (licht ongerief). Dit is echter van korte duur. Het is dus onnodig om het dier hiervoor te verdoven of pijnstilling te geven omdat dit net zoveel ongerief zal veroorzaken als [REDACTED] inspuiten.

Ja

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

- Bij de nieuwe immunisatie methode kunnen mogelijk [REDACTED] optreden.
- Desoriëntatie/verwardheid.
- Ouderdomsproblematiek, verminderde weerbaarheid/beweeglijkheid, grotere kans op ziek worden.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

- Bij de nieuwe immunisatie methoden worden [REDACTED]. Het kan echter voorkomen dat [REDACTED] kunnen optreden. Wanneer dit geconstateerd wordt zullen de dieren onmiddellijk geëuthanaseerd worden.
- Voor de [REDACTED] moeten de muizen absoluut stil liggen en worden daarom verdoofd met isofluraan. Het bijkomen/uitwerken van deze verdoving zal gepaard gaan met verwardheid en desoriëntatie.
- Het kan voorkomen dat de dieren in een immunisatie experiment ouder worden dan een jaar. Dit kan leiden tot ongerief t.g.v. ouderdom. Muizen kunnen hierdoor sneller ziek worden en een verminderde weerbaarheid/beweeglijkheid gaan vertonen hetgeen tot ongerief kan leiden.

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

- We zullen de muizen goed in de gaten houden (dagelijks) en indien nodig ([REDACTED]) de controle intensiveren en/of een cage-lid test uitvoeren. Bij de cage-lid test wordt de motoriek en kracht van het dier gecontroleerd door de verdachte muis op het rooster van de kooi te zetten en deze vervolgens om te keren. Hierna wordt geëvalueerd hoe goed het dier in staat is aan het rooster te blijven hangen. Dit kan eventueel vergeleken worden met een muis die in goede conditie lijkt te zijn.
- De [REDACTED] zal zo snel mogelijk uitgevoerd worden om de duur van de verdoving tot een minimum te beperken. De [REDACTED] is echter noodzakelijk om de [REDACTED]
- We zullen altijd proberen om het experiment te beëindigen voordat de dieren 1 jaar worden. Door onvoorziene omstandigheden of prioritering van experimenten kan het toch gebeuren dat er dieren ouder dan een jaar nog in een experiment zullen zitten. Deze dieren zullen een duidelijk "ouderdoms-label" krijgen waardoor ze makkelijk herkenbaar zijn. Deze dieren zullen extra gecontroleerd worden en er zal gestreefd worden naar een snelle afhandeling

van het experiment.

#### J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Bij de nieuwe immunisatie methode is het mogelijk dat [REDACTED].

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

Uit gegevens van de laatste 2 jaar blijkt dat bij ongeveer [REDACTED] geconstateerd.

#### K. Classificatie van ongerief

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

De dieren zullen van de subcutane toediening van eiwit target met CFA matig ongerief ondervinden. Subcutane toediening van target eiwit met IFA, [REDACTED], bloedafname via de wangprik en het verbloeden onder analgesie en anesthesie zal licht ongerief veroorzaken.

In het geval van de nieuwe immunisatie methode kunnen er [REDACTED] Dit kan leiden tot matig ongerief.

Samenvattend verwachten we bij dit type dierproef dat het ongerief van de muizen voor 72% licht en 28% matig zal zijn.

### Einde experiment

#### L. Wijze van doden

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

Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

Aan het einde van het immunisatie experiment moeten de afweercellen uit de milt en lymfe knopen worden geïsoleerd. Om deze organen te kunnen oogsten is het nodig het dier te doden.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

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

#### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef                |
|------------|-------------------------------|
| 3.4.4.2    | Verzamelen van muis materiaal |

*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*

#### 2 Beschrijving dierproeven

##### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Voor het *ex vivo/in vitro* testen van nieuwe antistoffen willen we gebruik maken van verschillende afweercellen zoals macrofagen, neutrofielen en dendritische cellen. Deze afweercellen hebben Fc receptoren op hun oppervlak waarmee ze aan het Fc deel van antistoffen kunnen binden. Interacties van Fc receptoren met antistoffen die gebonden zijn aan hun eiwit target, kunnen leiden tot activatie van de afweercellen. De afweercellen kunnen hierdoor bepaalde effector functies gaan uitvoeren, bijvoorbeeld het doden en opruimen van een tumorcel die met antistoffen bedekt was. Op deze manier kunnen we dus testen of en in welke mate de antistoffen in staat zijn om effector functies van afweercellen aan te zetten, wat neutralisatie van het pathogeen of kankercel doding als gevolg heeft.



Deze afweercellen worden opgezuiverd uit bloed of opgekweekt uit beenmerg. Er is dus als zodanig niet sprake van een langdurig experiment met de muis zelf. We zullen alleen materiaal van de muis oogsten om te gebruiken in *ex vivo/in vitro* experimenten.

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

Macrofagen en dendritische cellen voor *in vitro* experimenten worden gekweekt uit beenmerg. De muizen worden hiervoor zonder voorafgaande handelingen geëuthanaseerd d.m.v. cervicale dislocatie. Vervolgens zullen we de femur en tibia verwijderen om daaruit beenmerg te isoleren. Dit beenmerg zullen we in het laboratorium verder opkweken en laten differentiëren naar afweercellen zoals macrofagen of dendritische cellen. Voor experimenten met afweercellen uit muizenbloed wordt het dier verbloed door bloed afname via de orbital plexus of met een hartpunctie, onder verdoving en pijnstilling.

Wanneer experimenten met muizen neutrofielen nodig zijn, willen we de dieren eerst subcutaan behandelen met een groeifactor om het aantal neutrofielen in het bloed te vergroten. Vier dagen later volgt verbloeding van de muizen via de orbital plexus of met een hartpunctie, onder verdoving en pijnstilling.

Indien mogelijk worden beenmerg en bloed uit dezelfde muis geoogst. Onder verdoving en pijnstilling zullen we het dier dan eerst verbloeden waarna de femur en tibia verwijderd voor de beenmerg isolatie.

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

Uit ervaring is bekend wat de opbrengst van de afweercellen zal zijn na het kweken van beenmerg of isolatie uit bloed. Hierop gebaseerd kan een goede inschatting worden gemaakt van het aantal muizen dat nodig is voor een beoogd *ex vivo/in vitro* experiment.

## **B. De dieren**

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

Als bron van afweercellen of beenmerg zullen o.a. wildtype C57BL/6Jrj of Balb/c, Fc receptor (FcR) gamma KO muizen (geen FcR expressie om de rol van FcR te bepalen), NOTAM muizen (wel FcR expressie maar geen signalering via deze receptoren) en Fc alpha receptor I (FcaRI) transgene (Tg) muizen op een Balb/c en op een C57Bl/6 achtergrond worden gebruikt.

Voor sommige doeleinden wordt ook de immuno-incompetente SCID muis gebruikt, welke geen T en B cellen heeft. Deze muizen hebben logischerwijs voornamelijk granulocyten in hun bloed en dan met name neutrofielen als de grootste populatie afweercellen. Een eventuele verstoring of bijdrage van T en B cellen kan zo bepaald of uitgesloten worden met een *ex vivo* experiment.

FcR gamma KO, NOTAM en FcaRI Tg muizen worden verkregen uit eigen fok. Verder zal voor deze experimenten zoveel mogelijk gebruik worden gemaakt van surplus dieren uit de fok.

Indien nodig zullen er wildtype dieren worden verkregen van een geregistreerd fok- of afleveringsbedrijf in de EU.

Bij voorkeur maken we gebruik van volwassen dieren tussen de 6 en 52 weken oud. Beide geslachten zullen gebruikt worden maar binnen een experiment heeft het wel de voorkeur om of alleen mannelijke of alleen vrouwelijke dieren te gebruiken, dit om eventuele verschillen door het geslacht te vermijden.

Uit voorgaande studies is gebleken dat er 8 muizen nodig zijn voor een experiment met afweercellen uit bloed en 4 muizen zijn voldoende voor een experiment met uit beenmerg gekweekte afweercellen. Gebaseerd op voorgaande jaren schatten we in dat er voor ieder onderdeel 10 experimenten per jaar worden gedaan. Voor beide experimentele onderdelen samen betekent dit dat er verwacht wordt om  $(8 \times 10) + (4 \times 10) = 120$  muizen per jaar te gebruiken. Voor een projectaanvraag voor vijf jaar komt dit neer op 600 muizen.

### C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

### D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Nieuwe antistoffen zullen eerst getest worden in *ex vivo/in vitro* experimenten waarbij gebruik wordt gemaakt van humane afweercellen geïsoleerd uit bloed van gezonde vrijwilligers. Eventueel kan er hier een verdere selectie van antistoffen worden gemaakt om alleen de meest veelbelovende te testen met afweercellen van muizen om op die manier het aantal benodigde dieren te beperken. Omdat het hier om primaire muis cellen gaat waarvoor geen goede cellijnen als alternatief beschikbaar zijn is het niet mogelijk om dit zonder dierproeven te testen.

Het uiteindelijk eerst testen van antistoffen met primaire afweercellen van muizen zal ook het gebruik van vervolg *in vivo* experimenten beperken waarbij doorgaans veel meer dieren worden gebruikt (bijvoorbeeld in tumor/virus modellen). Onnodige dier experimenten kunnen we dus voorkomen door eerst *ex vivo/in vitro* experimenten met muis materiaal te verrichten. Indien we een *ex vivo* experiment met muizen neutrofielen willen doen, zullen de dieren eerst behandeld worden met een groeifactor (GM-CSF). Dit verhoogt het aantal neutrofielen in het bloed met ongeveer een factor 2, waardoor er minder muizen nodig zijn per experiment. Voorgaande experimenten waarbij deze muis materialen zijn gebruikt worden vastgelegd in het dierproef dossier en gerapporteerd in het labjournaal van de betrokken medewerker(s). Deze labjournaals zijn digitaal en kunnen door iedere medewerker binnen de onderzoeksgroep geraadpleegd worden. Dit zal helpen voorkomen dat een *ex vivo/in vitro* experiment onnodig herhaald zou worden. Voor een belangrijk resultaat kan het zijn dat een experiment met primaire afweercellen uit muis herhaald zou moeten worden. Een vuistregel voor wetenschappelijk onderzoek is dat een resultaat reproduceerbaar moet zijn. De algemene consensus hiervoor is dat een resultaat met minimaal drie onafhankelijke experimenten bevestigd moet worden. Als dit voor een bepaald experiment geldt, bijvoorbeeld omdat het gebruikt gaat worden voor publicatie, kan het dus voorkomen dat herhaling van een experiment nodig is.

Binnen de onderzoeksgroep wordt altijd gecommuniceerd wanneer er een experiment met muis materiaal verricht gaat worden. Men zal dan nagaan of er nog andere experimenten gedaan moeten worden met dergelijk materiaal. Op deze manier kan het materiaal zo efficiënt mogelijk gebruikt worden. Dit houdt dus in dat wanneer er bijvoorbeeld muizenbloed nodig is voor een experiment, er nagegaan wordt of het beenmerg van dezelfde muis ook gebruikt kan worden. Momenteel worden er geen andere organen van muizen gebruikt in experimenten binnen de onderzoeksgroep.

Vanwege de korte duur en het geringe ongerief van de experimenten zijn er geen extra maatregelen nodig om het ongerief van de dieren nog verder te beperken.

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

De meeste dieren komen uit de fok, worden in groepsverband gehuisvest en verder volgens de reguliere welzijnscontrole dagelijks beoordeeld op basis van gedrag, houding, gang/mobiliteit, voedingstoestand en verzorgingstoestand.

Het oogsten van beenmerg zal gebeuren na het doden van het dier met cervicale dislocatie.

Het verkrijgen van bloedmateriaal zal geschieden door verbloeding via de orbital plexus of met een hartpunctie onder verdoving en pijnstilling om het risico op ongerief tijdens het verbloeden zo klein mogelijk te houden. Met beide methodes voor het verzamelen van muis materiaal zal het dier licht ongerief ondervinden.

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

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

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja

### **I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen**

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Vanwege de korte duur en de gecontroleerde en beproefde methodes welke worden toegepast worden er geen andere vormen van welzijnsaantasting voorzien gerelateerd aan dit type dierproef.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Niet van toepassing

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

Niet van toepassing

### **J. Humane eindpunten**

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

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

### **K. Classificatie van ongerief**

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

De dieren die verbloed worden zullen licht ongerief ondervinden. Dit is 80/120 → 67% licht ongerief.

De overige dieren zullen cervicale dislocatie ondergaan → 33% terminaal ongerief.

## **Einde experiment**

### **L. Wijze van doden**

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

Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

Deze proef heeft tot doel om uit de muis beenmerg en/of bloed te halen voor *ex vivo/in vitro* experimenten. Deze delen van de muis zijn essentieel en het dier zal daardoor na het oogsten van dit materiaal niet verder kunnen leven.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

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

#### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer                           | Type dierproef                             |
|--------------------------------------|--|
| <input type="text" value="3.4.4.3"/> | <input type="text" value="Tumormodellen"/> |

*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*

#### 2 Beschrijving dierproeven

##### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Binnen onze onderzoeksgroep genereren we o.a. nieuwe antistoffen voor de bestrijding van kanker. Geselecteerde antistoffen zullen altijd eerst *in vivo* getest moeten worden alvorens de stap naar de kliniek te maken. Daarom willen we nieuwe antistoffen eerst in muizen testen op hun tumor remmende werking. De onderzoeksgroep heeft al jarenlange ervaring met tumormodellen waarbij tumorcellen, die het eiwit target op hun oppervlak hebben, toegediend worden aan de muis. Afhankelijk van het eiwit target en de wetenschappelijke vraag, kan dit op verscheidene locaties van het dier gebeuren. Na toediening zullen we de uitgroei van de tumorcellen volgen in levende muizen m.b.v. bioluminescentie of door het volume van de tumor te bepalen met een schuifmaat, maar ook gebruiken we bijvoorbeeld flow-cytometrie om tumorcellen te kwantificeren na behandeling met antistof. De keuze hiervoor en de opzet voor deze

dierexperimenten zal mede bepaald worden door de beschikbaarheid en geschiktheid van de tumorcellijn(en) die het target eiwit hebben.

Bij onze tumormodellen maken we een onderscheid in kortlopende (2 tot 3 dagen) en langlopende (weken, ~80 dagen) tumormodellen. Bij kortlopende tumormodellen injecteren we target eiwit expresserende tumorcellen intraperitoneaal of intraveneus. Deze tumorcellen maken ook het luciferase eiwit zodat we de tumorcellen kunnen traceren met bioluminescentie. Binnen een dag volgt dan de behandeling met antistoffen via dezelfde toedieningsroutes. Na een dag tot enkele dagen na de behandeling zullen we het dier verbloeden en/of inhoud van het peritoneum oogsten. Analyse in het laboratorium (flow cytometrie, ELISA) zal daarna uitwijzen hoeveel van de antistof er terug te vinden is, welke afweercellen gerekruteerd zijn en hoeveel tumorcellen er nog aanwezig waren. Een kortlopend model in het peritoneum is geschikt om de *in vivo* ADCC (antibody dependent cellular cytotoxicity) en de CDC (complement dependent cytotoxicity) activiteit van antistoffen te bepalen. Fab gemedieerde tumorcel doding is een veel langzamer proces en het duurt minimaal een week en meestal langer voordat een effect aantoonbaar is. Een kortlopend model via de intraveneuze route kunnen we toepassen wanneer we bijvoorbeeld willen kijken naar antistoffen die bedoeld zijn tegen bloedkankers zoals B-cel lymfoom. Hierbij kunnen we tumorcellijnen afkomstig van dit soort kankers intraveneus toedienen aan de muis en vervolgens een behandeling starten. Vervolgens zullen we het bloed analyseren in het laboratorium voor de hoeveelheid antistoffen en tumorcellen.

Voor de langlopende tumormodellen gebruiken we ook vaak tumorcellen die het luciferase eiwit maken zodat de tumorgroei met bioluminescentie (BLI) metingen gevolgd kan worden. Tumorcellen welke subcutaan, intraperitoneaal, of orthotopisch worden toegediend groeien uit op de locatie van inspuiten. Wanneer er tumorcellen gebruikt worden zonder luciferase kan de tumorgroei ook bepaald worden met een schuifmaat waarmee we de grote van de tumor opmeten en daarmee het volume van de tumor kunnen berekenen. In dat geval zullen de tumorcellen subcutaan worden toegediend omdat de tumorgroei dan het makkelijkst bepaald kan worden met de schuifmaat. Muizen die tumorcellen intraveneus toegediend krijgen kunnen op meerdere plekken tumoren ontwikkelen. Dit geldt bijvoorbeeld voor het tumormodel met B16F10 melanoom cellen waar meerdere tumoren uitgroeien in de longen. De frequentie en grote van deze tumoren kan met bioluminescentie (BLI) worden gevolgd maar we zullen ook de longen na beëindiging van het dierexperiment oogsten en visueel scoren voor tumor frequentie en grote.

De dieren zullen via de intraperitoneale of de intraveneuze route behandeld worden met antistoffen. Al naar gelang het doel van het experiment zullen we materiaal van het dier verzamelen na beëindiging van de dierproef. Dit houdt in dat we bloed, organen zoals longen en tumorweefsel van het dier zullen oogsten en verder zullen onderzoeken in het laboratorium om de werking van de antistof nader te bepalen. Er zijn meerdere redenen om voor een langlopende tumormodel te kiezen. Dit kan o.a. zijn omdat we de werking van antistoffen tegen solide tumoren willen testen maar ook als verwacht wordt dat de antistof in kwestie met name een Fab-effect heeft. Dit is het effect waarbij alleen de binding van antistof aan zijn target eiwit leidt tot het uitschakelen van de tumorcel of het pathogeen. Het Fab-effect heeft veel meer tijd nodig dan ADCC en CDC om de dood van de tumorcel te veroorzaken.

We willen deze tumormodellen ook graag kunnen gebruiken in combinatie met afweersysteem modulerende behandelingen. Hier gaat het bijvoorbeeld om depletie van het complement systeem met cobra venom factor (CVF), T-cel depletie met anti-CD8/CD4 behandeling, granulocyten depletie met anti-Gr1 behandeling, cytokine behandeling om bepaalde afweercellen te stimuleren en depletie van macrophagen/monocyten met clodronate liposomen. Door delen van het afweersysteem op deze manier uit te schakelen of juist te stimuleren verwachten we meer inzicht in de werkingsmechanisme van antistoffen te krijgen.

Om een beter inzicht te krijgen in de werkingsmechanisme en interactie van afweercellen met tumorcellen, willen we tumormodellen gaan visualiseren in levende muizen met 2-foton fluorescentie microscopie (intravitale microscopie). De muis zal hiervoor m.b.v. operatieve handelingen een kijkvenster in de huid krijgen (1). De locatie van het venster zal afhangen van het tumor model, bijvoorbeeld op de buik voor een intraperitoneaal model, etc. Afweercellen en tumor cellen zullen met de microscoop te herkennen zijn door fluorescente markers die we de muis intraveneus of intraperitoneaal kunnen toedienen. Tevens kunnen we transgene muizen gebruiken die bijvoorbeeld een type afweercellen maakt waarin een fluorescent eiwit tot expressie komt. Uiteindelijk willen we op deze manier in de levende muis waarnemen hoe bepaalde afweercellen en antistoffen samen tumor cellen kunnen doden. Dit zal sterk bijdrage aan het inzicht in de werkingsmechanismen van antistoffen. De onderzoeksgroep heeft nog geen ervaring met intravitale microscopie. Dit zal dus eerst opgedaan

moeten worden m.b.v. een aantal pilot experimenten. Dit willen we uitvoeren onder begeleiding van Nienke Vrisekoop die werkzaam is binnen dezelfde afdeling als de onderzoeksgroep, ervaren is met deze techniek en co-auteur op de onderstaande literatuur referentie.

De beschreven tumormodellen hebben in het verleden al laten zien dat ze goed uitvoerbaar zijn en voldoende resultaten genereren waarmee vervolgonderzoek gedaan kan worden. Uiteindelijk verwachten wij dit onderzoek te transleren naar de kliniek waar de nieuwe antistoffen gebruikt kunnen worden voor de behandeling van patiënten.

#### Literatuur referentie

##### 1. Intravital microscopy through an abdominal imaging window reveals a pre-micrometastasis stage during liver metastasis

Ritsma L, Steller EJ, Beerling E, Loomans CJ, Zomer A, Gerlach C, Vrisekoop N, Seinstra D, van Gorp L, Schafer R, Raats DA, de Graaff A, Schumacher TN, de Koning EJ, Rinkes IH, Kranenburg O, van Rheenen J. *Science Translational Medicine*, 2012, 4, 158, 158ra145

---

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

- Bij volwassen muizen worden intraveneus (iv), subcutaan (sc), intraperitoneaal (ip) of orthotopisch (ot) tumor cellen ingebracht die het target eiwit van interesse expresseren. De tumor cellen zullen gedurende het hele experiment aanwezig zijn in de muizen.
- Afhankelijk van de vraag die het experiment moet beantwoorden kunnen er afweercel modulerende methodes worden toegepast. Bijvoorbeeld depletie van bepaalde afweercellen of complement om hun bijdrage aan het werkingsmechanisme van een antistof te onderzoeken. Dergelijk methodes zullen voor een deel van het experiment gelden en een tijdsduur van enkele dagen tot weken omvatten.
- De dieren gaan we behandelen met antistoffen welke iv, sc, ip of ot worden toegediend. Dit behandelings regime kan variëren van een eenmalige dosis tot één of meerdere antistof dosissen per week gedurende een aantal weken.
- We zullen de uitgroei van de tumor cellen visueel of met BLI volgen tot aan het gekozen eindpunt van het experiment of wanneer het humane eindpunt is bereikt. Voor het uitvoeren van BLI brengen we het dier onder verdoving met isofluraan omdat de muizen absoluut stil moeten liggen voor de metingen. BLI metingen nemen doorgaans 15 minuten in beslag en worden maximaal tweemaal per week uitgevoerd. Er zullen minimaal 2 dagen tussen opeenvolgende BLI metingen zitten. Voor visuele inspectie van de tumorgrote zullen we de tumoren opmeten met een schuifmaat. De muis dient hiervoor alleen met de hand gefixeerd te worden.
- Het aanbrengen van een kijkvenster in de huid van de muis zal gebeuren onder verdoving/pijnstilling. Er zal slechts één kijkvenster per muis aangebracht worden. Het kijkvenster kan tot een aantal weken zonder problemen in de huid van de muis zitten. De intravitale microscopie gebeurt onder isofluraan verdoving van de muis omdat het dier absoluut stil moet liggen tijdens de waarnemingen. We verwachten dat er maximaal tweemaal per week intravitale microscopie uitgevoerd zal worden met een muis gedurende maximaal 2 uur. Er zal een tussen periode van minimaal 2 dagen gehanteerd worden tussen de microscopie sessies.
- Aan het einde van het experiment zal er, onder verdoving/pijnstilling of na cervicale dislocatie en afhankelijk van het model, materiaal van de muis geogst worden voor verdere analyse in het laboratorium. Onder materiaal oogsten verstaan we hier verbloeden of het verwijderen van organen.

---

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

Er is binnen de onderzoeksgroep al behoorlijk veel ervaring opgedaan met deze tumor modellen. Doorgaans worden voorgaande resultaten gebruikt om de grote en het aantal van de experimentele groepen verantwoord in te schatten. Indien mogelijk maken we ook gebruik van statistische berekeningen zoals een power-analyse om de groepsgrote optimaal te kiezen. Voor deze statistische berekening gebruiken we het online programma



"<http://homepage.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/>". Hiermee willen we een betrouwbaar resultaat krijgen zonder dat daar teveel dieren voor gebruikt zijn.

## **B. De dieren**

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

Voor de tumor modellen gebruiken we o.a. wild type C57BL/6JRj of Balb/c muizen. Voor sommige doeleinden wordt ook de immuno-incompetente SCID muis gebruikt die geen T en B cellen heeft. T en B cellen zijn cruciaal voor het opwekken van een goede afweer reactie tegen lichaamsvreemde entiteiten. Sommige tumorcellen kunnen alleen uitgroeien in deze immuno-incompetente muizen. Tevens kan een eventuele verstoring of bijdrage van T en B cellen aan de werkingsmechanisme van antistoffen zo worden bepaald of uitgesloten. Deze muizen hebben logischerwijs voornamelijk granulocyten, en dan met name neutrofielen als de grootste populatie afweercellen. SCID muizen kunnen dus ook gebruikt worden wanneer er reden is om naar de rol van neutrofielen te kijken in antistof gemedieerde processen.

Om de rol van antistof receptoren (Fc receptoren, FcR) op afweercellen te bepalen maken we ook gebruik van FcR gamma KO muizen (geen FcR expressie om de rol van FcR te bepalen), NOTAM muizen (wel FcR expressie maar geen signalering via deze receptoren) en Fc alpha receptor I (FcaRI) transgene (Tg) muizen op een Balb/c en op een C57Bl/6JRj achtergrond.

Afhankelijk van de wetenschappelijke vraag kunnen er ook andere transgene of KO dieren gebruikt worden. We willen bijvoorbeeld graag humaan CD20 transgene muizen gaan gebruiken voor het testen van anti-CD20 antistoffen. Ook willen we gehumaniseerde muismodellen gaan gebruiken, daarbij worden humane cellen, leukocyten of voorlopers daarvan, in een immuun deficiënte muis gebracht, zoals een SCID muis of een IL2R $\gamma$  KO muis. De humane cellen groeien uit in deze muizen, zodat al zijn witte bloedcellen zullen zijn vervangen voor humane cellen. We zouden ook andere transgene of KO dieren kunnen gaan gebruiken maar het is op dit moment niet te voorspellen welke dit zouden zijn omdat dit afhangt het (nieuwe) target eiwit en de wetenschappelijk vraag.

FcR gamma KO, NOTAM en FcaRI Tg muizen op C57Bl/6JRj, Balb/c of SCID achtergrond worden verkregen uit eigen fok. Andere transgene of KO muizen stammen kunnen worden verkregen via samenwerkingen met andere academische groepen. Verder zullen we voor deze experimenten zoveel mogelijk surplus dieren uit de fok gebruiken.

Indien nodig zullen er wildtype dieren worden verkregen van een geregistreerd fok- of afleveringsbedrijf in de EU.

Bij voorkeur gebruiken we volwassen dieren tussen de 8 en 21 weken oud. Met name voor langlopende tumor modellen mogen de muizen niet te oud zijn omdat we het dierexperiment bij voorkeur beëindigen voordat de dieren 1 jaar oud zijn. Het kan ook voorkomen dat we het beoogde eindpunt van een experiment willen uitstellen om de tumor ontwikkeling langer te kunnen volgen. Ook voor deze situatie willen we dus niet te oude dieren gebruiken. We hebben geen voorkeur voor een geslacht maar indien mogelijk gebruiken we wel één geslacht per experiment. Ervaringen uit het verleden heeft al laten zien dat dit de minste variatie geeft tussen en binnen de experimentele groepen.

Gebaseerd op onze ervaringen varieert het aantal dieren van 6 tot maximaal 12 muizen per experimentele groep. Om de benodigde aantallen dieren per experimentele groep te bepalen maken we gebruik van een power analyse waarbij we rekening houden met de te verwachte verschillen en het aantal vergelijkingen dat we willen maken. Doorgaans komt het aantal dieren per experimentele groep niet boven de 12 dieren.

Voor een kortlopend tumormodellen worden er maximaal 6 experimentele groepen gebruikt (1x PBS controle groep, 1x positieve antistof controle groep en 4x test antistof groep) per experiment. Als we uitgaan van het maximale aantal dieren per groep zullen we dus 72 dieren per experiment nodig hebben. Rekening houdend met de praktische handelingen (verbloeden en/of spoelen van peritoneum), zal dit aantal in de praktijk niet snel overschreden worden om het experiment uitvoerbaar te houden. Gebaseerd op het verleden verwachten we niet meer dan 10 kortlopende tumormodellen per jaar uit te voeren. Dit is inclusief eventuele pilot studies wanneer er een nieuw kortlopend tumormodel opgezet moet worden. Dit maakt dat we voor vijf jaar maximaal  $72 \times 10 \times 5 =$

3600 muizen verwachten te gebruiken.

Voor de langlopende tumormodellen gebruiken we meestal meer experimentele groepen dan bij de kortlopende modellen. Dit komt omdat deze modellen langzamer verlopen en het makkelijker is om tumor uitgroei te volgen met BLI of met de schuifmaat. Daardoor kunnen er meerdere antistoffen, antistof concentraties/combinaties en/of afweersysteem modulerende behandelingen getest worden in een experiment. Gebaseerd op ruim 15 jaar ervaring weten we dat we gemiddeld 5 langlopende tumormodellen uitvoeren per jaar. Dit is inclusief een eventuele pilot studie wanneer er een nieuw langlopend tumormodel opgezet moet worden. In deze experimenten gebruiken we maximaal 156 dieren per experiment om het praktisch uitvoerbaar te houden. Dit komt neer op 13 experimentele groepen per experiment met maximaal 12 dieren per groep. Uiteraard kunnen er ook meerdere groepen met minder dieren per groep gebruikt worden mits de statistiek dit toelaat. Voor de langlopende tumormodellen komt het verwachte dierverbruik voor 5 jaar dus neer op maximaal  $156 \times 5 \times 5 = 3900$  muizen.

Voor de intravitale microscopie verwachten we niet meer dan 4 muizen nodig te hebben per experiment. De intravitale microscopie kost veel tijd per muis vanwege de voorbereidingen en de microscopie zelf (~2 uur per muis). In de muis zal het gedrag van afweercellen t.o.v. tumorcellen geobserveerd worden in de afwezigheid of aanwezigheid van een antistof. We schatten in dat we per jaar 15 experimenten zullen uitvoeren waarin we de antistof behandeling van een kortlopend of langlopend tumormodel willen observeren. De intravitale microscopie is een nieuwe techniek voor de onderzoeksgroep dus het is goed mogelijk dat één of meerdere pilot experimenten nodig zullen zijn om hiermee voldoende ervaring op te doen. In de schatting voor het aantal experimenten/dieren is hiermee al rekening gehouden. Voor vijf jaar zouden we dan  $4 \times 15 \times 5 = 300$  muizen nodig hebben.

In totaal schatten we dus in dat er voor onze tumormodellen maximaal 7800 muizen nodig zijn voor 5 jaar. Graag willen we hierbij opmerken dat het op voorhand erg lastig is te schatten is welk tumormodel en hoeveel dieren er precies nodig zijn. Dit is sterk afhankelijk van de te testen antistoffen, eiwit target en resultaten van de voorafgaande *ex vivo/in vitro* experimenten. Het geschatte aantal van 7800 muizen is wat er maximaal gebruikt zou kunnen gaan worden en op dit moment achten we het erg onwaarschijnlijk dat er meer dieren nodig zouden zijn.

---

### C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

---

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

Nee

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

---

#### D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Nieuwe therapeutische antistoffen worden ontwikkeld om uiteindelijk patiënten te kunnen behandelen in de kliniek. Daarvoor is het absoluut noodzakelijk om deze antistoffen eerst *in vivo* te testen in de muis alvorens deze te testen in de mens. Bij de behandeling van tumoren met therapeutische antistoffen zijn veel complexe interacties tussen verschillende cellen en moleculen betrokken. Het is niet mogelijk om deze interacties *in vitro* na te boosten en er is dus geen vervangende methode. Muizen zijn het meest geschikt omdat er hiervan ook de meeste transgene of KO dieren beschikbaar zijn die van nut zijn voor ons onderzoek.

Voordat we nieuwe anti-tumor antistoffen testen m.b.v. *in vivo* modellen wordt er al een strenge selectie gemaakt op basis van voorafgaande *ex vivo/in vitro* experimenten. Alleen de meest veelbelovende antistoffen worden uiteindelijk met *in vivo* modellen getest op hun werking.

De onderzoeksgroep heeft ruime ervaring met deze tumormodellen en alle resultaten worden vastgelegd in het dierproef dossier en gerapporteerd in het labjournaal van de betrokken medewerker(s). Dit labjournaal is digitaal en vrij toegankelijk voor alle medewerkers van de onderzoeksgroep. Tevens worden wetenschappelijke publicaties in het veld regelmatig bijgehouden om te voorkomen dat een reeds gepubliceerd dierexperiment niet door de onderzoeksgroep wordt herhaald. Overigens kan het zo zijn dat voor een controversieel resultaat een herhaling van een dierproef nodig is om de reproduceerbaarheid van een resultaat te bepalen.

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

De dieren worden in groepsverband gehuisvest en dagelijks beoordeeld op basis van gedrag, houding, gang/mobiliteit, voedingstoestand en verzorgingstoestand volgens de reguliere welzijnscontrole van het Gemeenschappelijk Dieren Laboratorium. We zullen het ongerief van de dieren verder beperken door standaard kooiverrijking te gebruiken.

Bij de kortlopende modellen verwachten we verder dat de kans op ongerief, ongerelateerd aan de handelingen met het dier, zeer klein is. Dit komt met name door de korte duur van deze modellen.

Bij de langlopende tumormodellen zullen we, afhankelijk van de te verwachte tumor groei, de dieren goed in de gaten houden, zowel visueel als met BLI. Als er een BLI signaal van  $>1 \times 10^7$  counts/min, een tumorvolume van  $>1500 \text{ mm}^3$  of meer dan 20% gewichtsverlies t.o.v. het gewicht aan het begin van het experiment geconstateerd wordt, is het humane eindpunt bereikt en zal het dier gedood worden om onnodig ernstig ongerief te voorkomen. In het geval dat tumorcellen intraveneus worden ingespoten is de kans aanwezig dat door de locatie van tumor uitgroei er zenuwen aangedaan raken wat kan leiden tot verlamingsverschijnselen. Als het gedrag van het dier dit doet vermoeden zal de cage-lid test uitgevoerd worden om te bepalen of het dier geëuthanaseerd moet worden. Bij de cage-lid test wordt de motoriek en kracht van het dier gecontroleerd door de verdachte muis op het rooster van de kooi te zetten en deze vervolgens om te keren. Hierna wordt geëvalueerd hoe goed het dier in staat is aan het rooster te blijven hangen. Dit kan eventueel vergeleken worden met een muis die in goed conditie lijkt te zijn.

Als we de dieren aan het einde van een tumormodel willen verbloeden, dan zullen we de dieren analgesie en anesthesie geven om het ongerief tijdens verbloeden zo klein mogelijk te houden.

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

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

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Het iv, sc, ip of ot inspuiten kan mogelijk pijn veroorzaken (licht ongerief). Dit is echter van korte duur dus het is onnodig om het dier hiervoor te verdoven of pijnstilling te geven. Waarschijnlijk zal het geven van pijnstilling en/of verdoving net zoveel ongerief veroorzaken als de methodes van inspuiten.

Ja

## I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Andere vormen van welzijnsaantasting betreffen de langlopende tumormodellen.

- Na het iv inspuiten van tumorcellen kunnen mogelijk verlamingsverschijnselen optreden bij de langlopende tumormodellen.
- Door de tumorgroei kan er gewichtsverlies optreden in de langlopende tumormodellen maar dit komt maar zelden voor in de gekozen duur van deze experimenten.
- Bijkomen uit verdoving na BLI metingen.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

- Het kan voorkomen dat iv toegediende tumorcellen uitgroeien op een locatie waar het zenuwstelsel aangetast wordt met eventueel verlamingsverschijnselen tot gevolg. Zodra we dit constateren zullen de dieren geëuthanaseerd worden.
- De tumor uitgroei kan op de lange termijn gaan interfereren met lichaamsfuncties waardoor de muis ziek wordt en gewicht gaat verliezen, bijvoorbeeld door problemen met darmfunctie.
- Voor de BLI moeten de muizen stil liggen en zullen daarom verdoofd worden met isofluraan.

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

We zullen de muizen goed in de gaten houden (dagelijks) en indien nodig (of bij hoog BLI signaal) de controle intensiveren en/of een cage-lid test uitvoeren.

## J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

- Verlamingsverschijnselen wanneer er een langlopend iv model wordt gebruikt.
- Meer dan 20% gewichtsverlies of meer dan 15% gewichtsverlies in twee dagen t.o.v. het gewicht aan het begin van het experiment.
- BLI signaal van  $>5 \times 10^6$  counts/min.

Bij een of combinaties van deze criteria zullen de dieren geëuthanaseerd worden m.b.v. cervicale dislocatie

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

- Bij langlopende iv modellen licht het percentage dieren dat verlamingsverschijnselen krijgt t.g.v. de tumor maximaal rond de 10%. Dit is gebaseerd op voorgaande studies en hangt af van de tumorcellijn die gebruikt wordt en de duur van het experiment.
- Uit onze ervaring blijkt dat er maar zelden gewichtsverlies optreed t.g.v. van deze langlopende tumormodellen. We schatten dit percentage op  $<1\%$ .
- Een BLI signaal van  $>5 \times 10^6$  counts/min is gebaseerd op onze ervaringen met meerdere tumorcellijnen. De hoogte van dit signaal geeft een duidelijke indicatie dat de tumorgroei een punt bereikt waardoor het risico op onverwacht ernstig ongerief vergroot is. Een dergelijk hoog BLI signaal komt echter bijna nooit voor binnen de duur van de langlopende tumormodellen. We schatten dit percentage op  $<1\%$ . In de meeste gevallen zal de dagelijkse visuele inspectie van dieren al eerder aangeven wanneer een humaan eindpunt geïndiceerd is maar de hoogte van het BLI signaal is een meetbare parameter die het naderen van het humane eindpunt kan aangeven teneinde onnodig lijden van het dier te voorkomen.

## K. Classificatie van ongerief

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

Voor het grootste gedeelte van de dieren wordt het ongerief als "licht" ingeschat. Het betreft hier het fixeren van het dier en het toedienen van tumorcellen of antistoffen met een injectiespuit maar ook het ondergaan van en het bijkomen uit de verdoving wanneer gebruik wordt gemaakt van BLI metingen. Zoals aangegeven is er bij de langlopende iv modellen een kans op verhoogd ongerief t.g.v. verlamingsverschijnselen. Het ongerief ten gevolge van verlamingsverschijnselen schatten we in als "matig". Studies uit het verleden geven aan dat dit in dit type tumormodel bij maximaal 10% van de dieren kan voorkomen.

Verder zou een zeer klein deel van de dieren (<1%) in de langlopende tumormodellen "matig" ongerief kunnen ervaren t.g.v. gewichtsverlies, een indicator die aangeeft dat een dier ziek kan zijn of verzwakt is.

Gebaseerd op deze ramingen verwachten we dat het cumulatief ongerief voor ~97% van de dieren licht is en voor ~3% matig. Hierbij houden we met name rekening met het relatieve aantal experimenten waarin langlopende iv modellen zijn gebruikt t.o.v. de hoeveelheid experimenten waarbij de overige lang- en kortlopende modellen zijn gebruikt.

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

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

Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

Afhankelijk van het tumor model dat gebruikt wordt willen we nog muis materiaal oogsten, bijvoorbeeld bloed, longen, inhoud van het peritoneum. Het dier zal na deze handelingen niet kunnen voortleven dus het doden van het dier is onvermijdelijk.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

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

#### 1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11500	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	UMC Utrecht	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		3.4.4.4	Respiratoire virus modellen

*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*

#### 2 Beschrijving dierproeven

##### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Met dit type dierproef willen we graag nieuwe antistoffen tegen respiratoire virussen (zoals influenza en RSV) testen in muizen. Deze antistoffen zijn gericht tegen eiwitten die zich op het oppervlak van deze virussen bevinden. Binding van antistoffen aan deze virus eiwitten voorkomt infectie en medeert neutralisatie van het virus.

Voor het *in vivo* testen van deze antistoffen willen we muizen via de neus infecteren met het beoogde respiratoire virus, omdat deze virussen normaliter ook via de luchtwegen infecteren. We willen hierbij de werking van de antistoffen niet alleen testen als behandeling na virus infectie, maar zeker ook als preventie middel (profylaxis). Dit laatste zal gedaan worden door de antistoffen met name via de luchtwegen op verschillende tijdstippen voor infectie met virus toe te

dienen. Vanuit de kliniek en literatuur weten we dat antivirale antistoffen intramusculair of intraveneus worden toegediend. Wij willen de antistoffen graag via de luchtwegen toedienen om te laten zien dat dit net zo effectief is. Toediening via de luchtwegen zal veel praktisch voordeel opleveren aangezien dit een veel minder invasieve toedieningsmethode is en waarschijnlijk ook door de patiënt zelf uitgevoerd zou kunnen worden.

We zullen gedurende het experiment het gewicht van de dieren volgen. Gewichtsverlies is een parameter voor de gezondheid of "mate van zieke zijn" van de dieren wat we kunnen correleren aan antistof behandeling, bijvoorbeeld wanneer gewichtsverlies uitblijft als er antistof behandeling is toegepast. Infectie van muizen met respiratoire virussen kan de dieren ziek maken. Een gewichtsverlies van >20% t.o.v. het startgewicht wordt gezien als humaan eindpunt, om onnodig ongerief te voorkomen.

Na beëindiging van het experiment willen we nasale en broncho-alveolaire lavages uitvoeren. De lavage vloeistoffen zullen in het laboratorium geanalyseerd worden voor antistof concentratie, virus activiteit en de aanwezigheid van afweercellen. Tevens zullen we longweefsel oogsten en eventueel bloed voor nader analyse in het laboratorium.

---

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

- De opgeloste antistoffen worden eenmaal tot meerdere malen toegediend via de neus of een intraveneuze injectie. De toediening zal per muis maximaal 1 minuut in beslag nemen en de antistoffen zullen gedurende het experiment aanwezig zijn in het dier. Afhankelijk van de biologische stabiliteit in het dier zal de antistof concentratie wel afnemen in de tijd.
- Het dier zal eenmaal via de neus geïnfecteerd worden met virus. De toediening zal per muis maximaal 1 minuut in beslag nemen en het virus kan gedurende het hele experiment aanwezig zijn.
- Tijdens het experiment moet het gewicht van de dieren periodiek bepaald worden. De muizen kunnen ziek worden na infectie met het virus. Dit leidt tot gewichtsverlies. Deze periodieke meting dient ook om te voorkomen dat de dieren extra ongerief ondervinden. Teveel gewichtsverlies geeft aan dat het dier ziek is t.g.v. van het virus en naar alle waarschijnlijkheid extra ongerief ondervindt of gaat ondervinden. De standaard aanvaarde grens van meer dan 20% gewichtsverlies t.o.v. van het gewicht aan de start van het experiment gebruiken we als ijkpunt. Indien we dus constateren dat een dier meer dan 20% van zijn oorspronkelijke gewicht heeft verloren dan is het humane eindpunt bereikt en zal de muis gedood worden.
- Eventueel willen we de dieren aan het einde van het experiment verbloeden via een hartpunctie of de orbital plexus. Dit zal gebeuren onder verdoving en pijnstilling om zoveel mogelijk ongerief te voorkomen en omdat de muis niet mag bewegen. Deze procedure zal 10 minuten in beslag nemen.
- Na beëindiging van het experiment zullen we de dieren euthanaseren met cervicale dislocatie. Hierna voeren we nasale en/of broncho-alveolaire spoelingen uit. Deze spoelingen gebruiken we om de antistof concentratie, virus activiteit en de aanwezigheid van afweercellen in de neusholten en longen vast te stellen.

---

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

Er is binnen de onderzoeksgroep al ervaring opgedaan met dit soort virus modellen. Doorgaans gebruiken we voorgaande resultaten om de grote en het aantal van de experimentele groepen verantwoord in te schatten. Indien mogelijk maken we gebruik van statistische berekeningen zoals een power-analyse om de groepsgrootte optimaal te kiezen. Voor deze berekeningen wordt het online programma "<http://homepage.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/>" gebruikt. Hiermee willen we een betrouwbaar resultaat krijgen maar ook het aantal benodigde dieren tot een minimum beperken.



## B. De dieren

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

Voor onze experimenten willen we muizen gebruiken. Het type muis dat we nodig hebben voor het experiment kan afhangen van het respiratoire virus waartegen de antistof gericht is. Ons onderzoek richt zich op dit moment op antistoffen tegen het respiratoir syncytieel virus (RSV) en het influenza virus. Voor RSV gebruiken we bij voorkeur Balb/c muizen omdat we weten dat het virus zich in deze stam goed kan repliceren. Voor influenza zullen we C57BL/6JRj muizen gebruiken. Omdat we naast IgG ook zeer geïnteresseerd zijn in de werking van IgA antistoffen willen we onze FcaRI transgeen ook graag gebruiken op de Balb/c of C57BL/6JRj achtergrond.

De Balb/c en C57BL/6JRj muizen worden verkregen van een geregistreerd fok- of afleveringsbedrijf in de EU. Indien mogelijk zullen we voor deze experimenten zoveel mogelijk surplus dieren uit de fok gebruiken. De FcaRI transgene dieren op een Balb/c of C57BL/6JRj achtergrond worden verkregen uit eigen fok.

Bij voorkeur maken we gebruik van volwassen dieren tussen de 8 en 21 weken oud. We hebben geen voorkeur voor een geslacht maar indien mogelijk gebruiken we wel één geslacht per experiment. Ervaringen uit het verleden heeft al laten zien dat dit de minste variatie geeft tussen en binnen de experimentele groepen.

Doorgaans gebruiken we experimentele groepen met gemiddeld 10 dieren per groep per experiment. Voor experimenten met RSV gebruiken we de virusconcentratie uit de lavage vloeistoffen als een van de primaire parameters. Uit onze ervaring blijkt dat we met deze parameter maximaal 6 dieren per groep hoeven te gebruiken om significante verschillen te krijgen. Bij experimenten met influenza geldt ook gewichtsverlies als een belangrijke parameter, gebaseerd op literatuur waar het *in vivo* influenza experimenten betreft. In onze handen zien we bij deze parameter wel meer variatie in de metingen. Hierdoor blijken we voor influenza experimenten in de praktijk meer dieren nodig te hebben per experimentele groep om de verschillen significant te krijgen. Recentelijke experimenten van onze onderzoeksgroep geven aan dat een groepsgrote tot maximaal 13 dieren nodig kan zijn voor significante resultaten. Buiten deze redenen voor de te kiezen groepsgrote hanteren we een restrictie van maximaal 80 dieren per experiment. Het verbloeden en/of het uitvoeren van de nasale en broncho-alveolaire lavages kosten 5 tot 10 minuten per muis. Om een experiment met 80 dieren te beëindigen zouden dus tussen de 400 en 800 minuten (6 tot 13 uur) nodig zijn en zou een dagvullende bezigheid zijn. Ervaring vanuit de onderzoeksgroep geeft aan dat we 8 experimenten per jaar zouden gaan doen. Dit komt dan uit op  $8 \times 80 = 640$  dieren maximaal per jaar. Over vijf jaar betekent dit dat we maximaal 3200 dieren nodig hebben voor dit type dierproef.

## C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

---

#### **D. Vervanging, vermindering en verfijning**

---

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

---

We zien ons genoodzaakt om dieren te gebruiken voor ons onderzoek. Ten eerste zijn er geen proefdier-vrije methodes om de complexe interacties tussen antistoffen, virussen en afweercellen in de luchtwegen na te bootsen. Ten tweede komt dit doordat de intranasale toedieningsroute nog niet gebruikt wordt in de kliniek en dus moeten we de werkzaamheid in deze context eerst in dieren onderzoeken.

Voordat we dierproeven doen met nieuwe antistoffen tegen een respiratoir virus zijn deze eerst met *ex vivo/in vitro* experimenten getest. Hierna maken we pas een selectie van de antistoffen die in vivo gebruikt gaan worden. Dit zal het gebruik van het aantal dieren al beperken. Verder maken we gebruik van statistische berekeningen zoals een power-analyse om de groepsgrootte optimaal te kiezen. Voor deze berekeningen wordt het online programma "<http://homepage.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/>" gebruikt. Hiermee willen we een betrouwbaar resultaat krijgen zonder dat daar teveel dieren voor gebruikt zijn.

De onderzoeksgroep heeft inmiddels 2 jaar ervaring met de RSV en de influenza virusmodellen en alle resultaten worden vastgelegd in het dierproef dossier en gerapporteerd in het labjournaal van de betrokken medewerker(s). Dit labjournaal is digitaal en vrij toegankelijk voor alle medewerkers van de onderzoeksgroep. Tevens worden wetenschappelijke publicaties in het veld regelmatig bijgehouden om te voorkomen dat een reeds gepubliceerd dierexperiment niet door de onderzoeksgroep wordt herhaald. Overigens kan het zo zijn dat voor een controversieel resultaat een herhaling van een dierproef nodig is om de reproduceerbaarheid van een resultaat te bepalen.

Behalve de standaard kooiverrijking zijn er geen extra maatregelen mogelijk om het ongerief van de dieren nog verder te beperken.

---

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

---

De dieren worden in groepsverband gehuisvest en dagelijks beoordeeld op basis van gedrag, houding, gang/mobiliteit, voedingstoestand en verzorgingstoestand volgens de reguliere welzijnscontrole van het Gemeenschappelijk Dieren Laboratorium. We zullen het ongerief van de dieren verder beperken door standaard kooiverrijking te gebruiken.

Het gewicht van de dieren zal meerdere keren per week bepaald worden. We kunnen een zorgelijke afname in gewicht op die manier snel opmerken en op tijd handelen wanneer het humane eindpunt van >20% gewichtsverlies t.o.v. het gewicht aan het begin van het experiment bereikt wordt.

---

### **Herhaling en duplicering**

#### **E. Herhaling**

---

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

---

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Het intraveneus of intramusculair inspuiten kan mogelijk pijn veroorzaken dat we inschatten als licht ongerief. Dit is echter van korte duur dus het is onnodig om het dier hiervoor te verdoven of pijnstilling te geven. Waarschijnlijk zal het geven van pijnstilling en/of verdoving net zoveel ongerief veroorzaken als deze methodes van inspuiten.

Ja

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Er kan ziekte en gewichtsverlies optreden.

Aangezien er in dit type dierproef muizen geïnfecteerd worden met respiratoire virussen die schade aan de luchtwegen kunnen veroorzaken, zouden we kunnen verwachten dat er ook benauwdheid optreedt bij de dieren. In de praktijk wordt dit echter maar zeer zelden waargenomen. Waarschijnlijk komt dit doordat dit symptoom pas later in het ziektebeeld optreedt. Voor die tijd zal het humane eindpunt voor het dier al bereikt zijn gebaseerd op een gewichtsverlies van >20% t.o.v. het startgewicht.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De infectie met het virus.

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

Het infecteren van de dieren met een respiratoir virus is een cruciaal onderdeel van het experiment en kan ziekte en gewichtsverlies veroorzaken. De dosering van het virus zullen we echter, gebaseerd op eerdere experimenten, zodanig kiezen dat vermeden wordt dat veel dieren het humane eindpunt zullen bereiken. Verder houden we de muizen tijdens het experiment zo veel mogelijk in de gaten bij enige tekenen van extra ongerief.

#### **J. Humane eindpunten**

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Een dier kan na de infectie met virus ziek worden. Wanneer dit tot gevolg heeft dat er >20% gewichtsverlies optreedt is het humane eindpunt (HEP) bereikt en zal het dier gedood worden met cervicale dislocatie.

Hoewel we het onwaarschijnlijk achten dat er benauwdheid zal optreden voordat het HEP van >20% gewichtsverlies bereikt is, kan het niet uitgesloten worden. Daarom beschouwen we het constateren van benauwdheid ook als een HEP.

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

Gebaseerd op onze ervaring met respiratoire virusmodellen verwachten we dat <5% van de dieren dit criterium haalt.

#### **K. Classificatie van ongerief**

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

We schatten het cumulatief ongerief in als "licht" voor >95% van de dieren. De handelingen zoals het gebruiken van de nasale toedieningsroute, het intraveneus of intramusculair toedienen van antistoffen of het verbloeden van de muis zal licht ongerief veroorzaken.

Voor <5% van de dieren schatten we het ongerief in als "matig". Dit ongerief zal met name ondervonden worden door een ziek dier dat veel gewicht verliest (>20% gewichtsverlies) of een dier dat benauwd is t.g.v. de virus infectie.

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

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

Nee > Ga verder met de ondertekening.

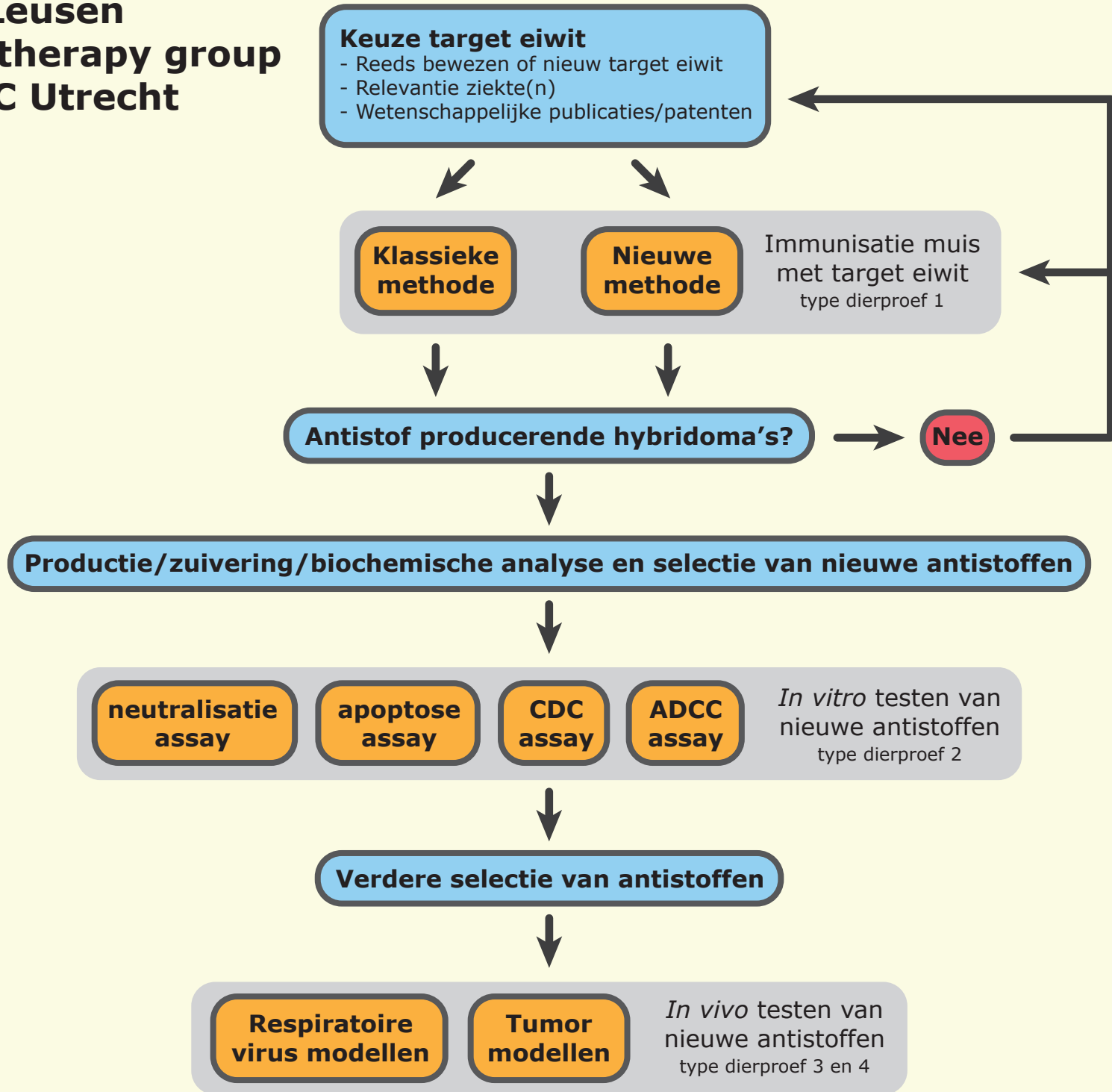
X Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

Als onderdeel van het experiment willen we de dieren verbloeden en/of de inhoud van de luchtwegen verzamelen. De muizen zullen deze procedures niet overleven en zullen dus gedood moeten worden.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

X Ja



### **A. Algemene gegevens over de procedure**

1. Aanvraagnummer : 2015.II.507.042
2. Titel van het project : Ontwikkeling, effectiviteit en werkingsmechanismen van therapeutische antistoffen
3. Titel van de NTS : Ontwikkeling, effectiviteit en werkingsmechanismen van antistoffen

#### 4. Type aanvraag:

- nieuwe aanvraag projectvergunning  
 wijziging van vergunning met nummer :

#### 5. Contactgegevens DEC

- Naam DEC : DEC Utrecht  
Telefoonnummer contactpersoon : 088 – 75 59 247  
Emailadres contactpersoon : dec-utrecht@umcutrecht.nl

#### 6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):

- ontvangen door DEC: 09-11-2015  
 aanvraag compleet:  
 in vergadering besproken: 18-11-2015, 16-12-2015 en 22-1-2016  
 anderszins behandeld: per mail: 07-12-2015 , 14-1-2016 en 22-1-2016  
 termijnonderbreking(en) van / tot : 20-11-2015 tot 07-12-2015  
22-01-2016 tot 22-01-2016  
 besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:  
 aanpassing aanvraag:  
 advies aan CCD: 29-01-2016

#### 7. Eventueel horen van aanvrager

- Datum:
- Plaats:
- Aantal aanwezige DEC-leden:
- Aanwezige (namens) aanvrager:
- Strekking van de vraag / vragen:
- Strekking van het (de) antwoord(en):
- Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag:

#### 8. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: 20-11-2015 , 14-1-2016 en 22-1-2016
- Strekking van de vragen:

Algemeen: De DEC gaat er vanuit dat binnen uw project geen antistoffen worden gemaakt die gebruikt gaan worden voor andere projecten (vraag op 20-11-2015). Zo ja, dan adviseert de DEC daarvoor een aparte aanvraag in te dienen (vraag /advies op 16-12-2015 ).

#### Projectvoorstel

- De DEC doet u de suggestie om de titel van uw aanvraag aan te passen: Ontwikkeling, effectiviteit en werkingsmechanismen van therapeutische antistoffen. Op 22-1 -2016 is nog het advies gegeven om de term auto immuunziekten uit de aanvraag te verwijderen omdat deze geen onderdeel zijn van de vraagstelling.
- 3.1 Achtergrond: Er wordt te weinig ingegaan op het feit dat het werkingsmechanisme alleen kan worden onderzocht in therapeutische modellen. De DEC doet u de suggestie om het verloop van het onderzoek te laten zien in een figuur en een beslisboom op te nemen in dit hoofdstuk ter illustratie.
- Pagina 3: Graag uitleggen waarom een kort effect wordt geprefereerd bij kinderen (noem bijvoorbeeld RSV).

#### Bijlage 1

- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Waarom kiest u standaard voor een immunisatieprotocol met Freund's Complete Adjuvans? Er zijn immers nieuwe, ook effectieve alternatieven hiervoor.
- I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen: Graag de twee vormen van ongerief beter duiden.

#### Bijlage 3

- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Pagina 2 van 9 (intravitale microscopie): Heeft u al ervaring met dit model? Of gaat u eerst een pilot uitvoeren? Graag dit model beter inbedden in de aanvraag zodat de rationale van dit model beter begrepen wordt.
- B. De dieren: In overleg met de IvD graag per experiment het geslacht bepalen en motiveren in de aanvraag.

#### Bijlage 4

- B. De dieren: In overleg met de IvD graag per experiment het geslacht bepalen en motiveren in de aanvraag.

#### Niet Technische Samenvatting

- 3.5 Indeling dierproeven naar de verwachte ernst. De term 'gering' graag wijzigen in 'licht'.
- 4.2 Vermindering: De zin: 'De antistoffen moeten etc.' graag aanpassen. Antistoffen 'doorstaan' niets.



- Datum antwoord: 07-12-2015
- Strekking van de antwoorden:

Algemeen: Als onderzoeksgroep werken wij natuurlijk samen met biotechnische en farmaceutische bedrijven en met andere academische groepen. Nieuw bereide antistoffen passend bij de vraagstelling van dit project testen we uitsluitend in ons eigen dierexperimenten project/aanvraag en niet in andere projecten. Deze antistoffen stellen we na karakterisering wel ter beschikking aan met ons samenwerkende onderzoeksgroepen (deels als antwoord op 7-12-2015 ). Voor de bereiding van antistoffen voor andere groepen zullen wij te zijner tijd een aparte aanvraag indienen (antwoord naar aanleiding van extra vraag op 16-12 -2015 ) .

#### Projectvoorstel

- Ik heb geen bezwaar tegen aanpassing van de titel en deze aanvulling zorgt ervoor dat de lading van het project beter gedekt wordt. Ook de term auto immuunziekten hebben wij uit de aanvraag verwijderd, omdat ons werk zich inderdaad primair richt op kanker en infectieziekten (antwoord op vraag van 22-1-2016).
- 3.1 Achtergrond: De noodzaak voor het gebruik van therapeutische modellen is nu beter aangegeven. Er is nu ter ondersteuning van de tekst een flowchart bijgesloten die de strategie van ons onderzoek aangeeft.
- Pagina 3: Er is nu beter uitgelegd waarom een kort effect bij kinderen geprefereerd wordt, met name als het gaat om antistoffen die aangrijpen op het immuunsysteem en dit geldt voor de meeste therapeutische antistoffen. Dit is niet zo zeer van toepassing voor de behandeling van RSV, omdat het daar een antistof betreft die de infectie van dit virus blokkeert en niet zo zeer de functie van het immuunsysteem.

#### Bijlage 1

- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Het primaire doel van deze immunisaties is om hoge antistof titers te verkrijgen tegen het subcutaan ingespoten antigeen. De antigenen die gekozen worden zijn in veel gevallen zwak immunogeen. Hiervoor wordt het gebruik van CFA nog altijd gezien als de gouden standaard en is in de meeste gevallen superieur als het gaat om het opwekken van hoge antistof titers. Ik heb mij ook verdiept in adjuvant studies en alternatieven (o.a. Titermax, Ribit, Specol, Montanide ISA, etc.) en ben geen nieuwe informatie tegenkomen die onomstotelijk aantoont dat er een beter adjuvant is dan CFA wanneer het gaat om antistof opwekking. Overigens lijken deze adjuvantia (afhankelijk van de studie en dier) ook een behoorlijk ongerief te kunnen veroorzaken, vergelijkbaar met CFA. Het lijkt mij onwenselijk om immunisaties uit te voeren met een alternatief adjuvant die geen antistoffen opleveren in de wetenschap dat, dat met CFA mogelijk wel gelukt zou zijn. Dit zou ook kunnen leiden tot het gebruik van meer dieren. Ik zie dus momenteel nog geen valide reden, het ongerief en doel van de proef in ogenschouw nemende, om over te stappen op een alternatief voor CFA.

- I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen: Dat is nu zo goed mogelijk aangegeven.

### Bijlage 3

- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: De onderzoeksgroep heeft nog geen eigen ervaring met de intra vitale microscopie. Er zal dus eerst een pilot uitgevoerd moeten worden. Dit zal gebeuren onder begeleiding van een collega (co-auteur op de aangegeven literatuur) die al wel ervaren is met deze techniek. De intravitale microscopie staat inmiddels op verscheidene plekken in de tekst benoemd en beredeneerd, zowel in het projectvoorstel als in bijlage 3.
- B. De dieren: Na overleg met de IvD zou ik de aanvraag op dit punt graag onveranderd laten. Ik heb begrepen dat de CCD graag ziet dat ook mannelijke muizen worden gebruikt. Zover ik weet geeft de DEC de voorkeur aan zo min mogelijk kans op ongerief wat dus neigt naar het gebruik van vrouwtjes omdat deze beter in groepsverband te houden zijn. Vanwege deze verschillende standpunten is er voor deze projectaanvraag besloten om voor een compromis te gaan waarbij zowel mannetjes als vrouwtjes gebruik worden onder de voorwaarden genoemd in de dierproef bijlagen. Wij zullen in onze dierexperimenten altijd ons best doen voor een efficiënt gebruik van de dieren met een zo beperkt mogelijk ongerief.

### Bijlage 4

- B. De dieren: Zie antwoord hierboven.

### Niet Technische Samenvatting

De NTS heb ik naar aanleiding van de commentaren van de DEC aangepast.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag: Ja

## 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 (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren
4. Er zijn geen DEC leden betrokken bij dit project

## **C. Beoordeling (inhoud):**

1. Het project is:

- uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord.
- uit onderwijskundig oogpunt verantwoord.
- uit het oogpunt van productiedoeleinden verantwoord.
- wettelijk vereist.

2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling.

3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Het wordt ingeschat als een substantieel belang, omdat dit onderzoek beoogt nieuwe therapeutisch effectieve antistoffen te ontwikkelen voor de behandeling van kanker en infectieziekten bij de mens. Dergelijke antistoffen worden in beperkte mate reeds ingezet bij de behandeling van kanker en infectieziekten, en deze vorm van therapie heeft als zodanig al bewezen dat ze effectief kan zijn. Echter over het mechanisme van de werking van de antistoffen valt nog veel onderzoek te doen. Ook de benodigde eigenschappen van de antistoffen zijn nog onvoldoende onderzocht. De onderzoeksgroep heeft bijzondere interesse en expertise in de ontwikkeling van antistoffen van de IgA klasse, waarvan inmiddels uit hun eigen onderzoek blijkt dat deze mogelijk effectiever zijn dan antistoffen van de IgG klasse. Belangrijk is ook aandacht voor de wijze van toediening (mucosaal of systemisch), verbeteren van de *in vivo* halfwaardetijd door modificaties aan te brengen, en het creëren van *in vivo* condities die de effectiviteit van de antistoffen doen toenemen. Al deze elementen zijn onderdeel van de studie en vormen met elkaar een homogeen geheel van onderzoek, dat naar verwachting fundamenteel inzicht in het werkingsmechanisme van therapeutische antistoffen genereert en resultaten oplevert die van belang zullen zijn voor toepassing bij de mens.

4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De DEC is ervan overtuigd dat de aanvrager bij uitstek over de expertise en voorzieningen beschikt om de projectdoelstelling met de gekozen strategie/aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren. De opbouw van het project is in fasen ingedeeld. In een voortraject worden op grond van literatuur en eigen ervaringen en inschattingen kandidaat antigenen benoemd en bereid. Men start met de immunisaties van muizen, waarna de gegenereerde antistoffen in *in vitro* testen worden gekarakteriseerd (zie flowchart). Op basis van de prestatie van de antistoffen in de diverse testen wordt een beperkt aantal geselecteerd voor de finale experimenten in tumor- en infectiemodellen. In het project wordt gebruik gemaakt van zogenaamd intravitale microscopie, hetgeen een relatief nieuwe en elegante methode is om het gedrag van afweercellen (al dan niet beladen met antistoffen) ten opzichte van tumorcellen te observeren en vast te leggen. De keuze van de tumormodellen berust grotendeels op de vraag of en in welke mate de cellijn het geselecteerde targeteiwit tot expressie brengt. De infectiemodellen betreffen de respiratoire infectieziekten veroorzaakt door RSV en Influenza A. Bij beide infectiemodellen zijn antistoffen van primair belang voor de afweer en met beide modellen hebben de onderzoekers reeds ervaring opgebouwd.

5. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
- Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
  - Niet-menselijke primaten (10e)
  - Dieren in/uit het wild (10f)
  - Gefokt voor dierproeven (11)
  - Zwerfdieren (10h)
  - Hergebruik (1e lid 2)
  - Huisvesting en verzorging
  - Locatie: instelling vergunninghouder (10g)
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. In bijlage 1 is het ongerief ten gevolge van de immunisatie ingeschat als licht voor 72% en matig voor 28% van de dieren. Het matige ongerief ten gevolge van immunisatie op de klassieke wijze wordt veroorzaakt door het gebruik van het adjuvans FCA. Immunisatie met de nieuw ontwikkelde methode kan in 12% van de dieren [REDACTED] [REDACTED] Het bijbehorende ongerief wordt ingeschat als matig. Alle overige handelingen bij immunisatie (zoals subcutane toediening van eiwit met IFA, [REDACTED] injecties, [REDACTED] onder anesthesie, bloedafname via wangprik, etc.) zijn ingeschat als licht ongerief. In bijlage 2 wordt celmateriaal geoogst ten behoeve van *in vitro* experimenten met de te onderzoeken antistoffen. Het ongerief in deze bijlage is voor 67% van de dieren licht en voor 33% terminaal. In bijlage 3 worden de antistoffen getest in kortlopende en langlopende tumormodellen. Rekening houdend met een relatief kleiner aantal langlopende experimenten komt men op een percentage van 3% matig ongerief en 97% licht ongerief. Matig ongerief komt met name in de langer lopende tumormodellen (bij maximaal 10% van de dieren) en wordt veroorzaakt door verlamingsverschijnselen ten gevolge van ingroei van de tumorcellen in het zenuwweefsel. In bijlage 4 worden twee infectiemodellen gebruikt, namelijk voor RSV en Influenza A. Het ongerief wordt voor 95% van de dieren ingeschat als licht en voor ongeveer 5% matig. Matig ongerief kan veroorzaakt worden door gewichtsverlies ten gevolge van de infectie en door benauwdheid. Het humaan eindpunt is derhalve benauwdheid en meer dan 20% gewichtsverlies. Ook de humane eindpunten in de andere bijlagen zijn goed omschreven.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen vervangen. Het testen van de effectiviteit van antistoffen tegen tumoren en levensbedreigende infecties kan - uiteraard na adequaat vooronderzoek - alleen worden getest in een omgeving waarin de benodigde effectorcellen (zoals granulocyten en monocyten/macrofagen) en factoren (zoals afkomstig van het complementsysteem) aanwezig zijn. Het uitvoeren van *in vivo* experimenten is dus noodzakelijk.

8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de vermindering van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken muizen is realistisch ingeschat. De aanvrager gebruikt zowel mannelijke als vrouwelijke dieren. Om te grote spreiding te voorkomen zullen binnen een experiment wel dieren van een en hetzelfde geslacht gebruikt worden.
9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. In de langlopende tumormodellen houden de onderzoekers zo veel als mogelijk is rekening met de leeftijd van de dieren.
10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd.

#### **D. Ethische afweging**

De doeleinden van het project zoals geformuleerd onder C 3 rechtvaardigen ten volle het gebruik van muizen. De schade die de dieren oplopen is verantwoord, omdat uit wetenschappelijk oogpunt verwacht wordt dat dit project inzicht in het werkingsmechanisme van therapeutische antistoffen zal opleveren, alsmede over de eisen waaraan dergelijke antistoffen moeten voldoen, en aan de *in vivo* condities die optimaal gebruik van deze antistoffen bewerkstelligen. Tevens wordt verwacht dat het project een aantal antistoffen zal opleveren die verder ontwikkeld kunnen worden voor toepassing bij de mens. Het gelijktijdig werken in zowel een infectiemodel als een tumormodel acht de DEC een sterk punt, omdat verwacht mag worden dat op onderdelen overeenkomstige bevindingen in de beide modellen zullen worden gevonden die de resultaten zullen versterken. Daarnaast zullen verschillen in de bevindingen meer inzicht geven in welke componenten in de effectorfase van de afweerreactie tegen een tumor dan wel tegen een virusinfectie van belang zijn. Dit alles overwegende oordeelt de DEC unaniem dat het belang van het doel van het project opweegt tegen het ongerief dat de muizen zullen ondervinden. De DEC acht het gebruik van de dieren voor dit project ethisch aanvaardbaar.

#### **E. Advies**

1. Advies aan de CCD
  - De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
  - De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
  - De DEC adviseert de vergunning te verlenen.
2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

#### **Dierexperimentencommissie Utrecht**



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



**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  
AVD115002016410

**Bijlagen**

2

Datum 3 februari 2016

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED],

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 2 februari 2016.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD115002016410. 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](http://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 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]

**Over uw aanvraag**

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

**Over uw project**

Geplande startdatum: 1 maart 2016  
Geplande einddatum: 1 maart 2021  
Titel project: Ontwikkeling, effectiviteit en werkingsmechanismen van therapeutische antistoffen  
Titel niet-technische samenvatting: Ontwikkeling, effectiviteit en werkingsmechanismen van therapeutische antistoffen  
Naam DEC: DEC Utrecht  
Postadres DEC: Postbus 85500 3508 GA Utrecht Kamernummer [REDACTED]  
E-mailadres DEC: dec-utrecht@umcutrecht.nl

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 1584,-  
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

Verplichte bijlagen:

- Projectvoorstel
- Beschrijving Dierproeven
- Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen:

- DEC-advies

**Ondertekening**

Naam:



Functie:



Plaats:

Utrecht

Datum:

1 februari 2016



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UU-ASC  
Postbus 80.011  
3508 TA UTRECHT  


**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  
AVD115002016410  
**Bijlagen**  
2

Datum 3 februari 2016  
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**  
Factuurdatum: 3 februari 2016  
Vervaldatum: 4 maart 2016  
Factuurnummer: 16700410  
Ordernummer: CB. 841910.3.01.011

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD115002016410	€ 1584,-

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL41RBOS0569996317 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

UMC Utrecht

██████████  
t.a.v. Instantie voor Dierenwelzijn  
Postbus 12007  
3501 AA Utrecht

**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
www.zbo-ccd.nl

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

**Onze referentie**  
AVD115002016410

**Uw referentie**

**Bijlagen**

Datum 17 maart 2016  
Betreft Aanvullende informatie vergunningsaanvraag

Geachte ██████████,

Op 3 februari 2016 hebben wij een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om het project "Ontwikkeling, effectiviteit en werkingsmechanismen van therapeutische antistoffen" met aanvraagnummer AVD115002016410.

**Welke informatie nog nodig**

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

-Uw aanvraag bestaat uit meerdere doelstellingen die onafhankelijk van elkaar kunnen worden onderzocht, waaronder het ontwikkelen van nieuwe antistoffen tegen verschillende soorten kanker en het ontwikkelen van nieuwe antistoffen tegen infectieziektes. Aangezien het om verschillende soorten ziekten gaat, maakt u gebruik van verschillende modellen. Uw wordt verzocht aan te geven wat de meerwaarde is van het in één aanvraag onderbrengen van deze twee onderzoeksvragen. U wordt verzocht daarbij ook aan te geven of en op welke wijze resultaten/bevindingen uit de ene onderzoeksvraag gebruikt kunnen worden voor de andere onderzoeksvraag.

-Uw geeft in uw aanvraag aan naast de voor de in uw aanvraag beschreven ziektes ook antistoffen te zullen ontwikkelen voor andere ziektes waarvoor nog geen antistof therapieën beschikbaar zijn. U geeft echter niet aan om welke ziektes het gaat en op basis van welke criteria u zult besluiten onderzoek naar een niet in de aanvraag beschreven ziekte te starten. U wordt verzocht dit toe te lichten. Deze vraag wordt gesteld om te kunnen beoordelen wat het belang en de haalbaarheid van het onderzoek is en welk ongerief dieren zullen ondergaan.

-Uw aanvraag bestaat uit zowel een fundamenteel deel als een translationeel deel. Uit uw aanvraag wordt niet geheel duidelijk of en op welke wijze de uitkomsten van het fundamentele onderzoek naar de werkingsmechanismen van bestaande therapeutische antistoffen gebruikt zullen worden bij het onderzoek naar nieuwe

therapeutische antistoffen. Ook wordt niet duidelijk hoeveel dieren gebruikt zullen worden voor het beantwoorden van deze fundamentele onderzoeksvraag. U wordt verzocht dit toe te lichten.

**Datum**

17 maart 2016

**Onze referentie**

AVD1150002016410

-In uw aanvraag beschrijft u dat uw onderzoek naar de werkingsmechanismen van therapeutische antistoffen zich richt op target eiwitten gerelateerd aan kanker of virus/bacterie infecties. In de rest van uw aanvraag wordt echter niet gesproken over bacteriële infecties. U wordt verzocht toe te lichten om welke bacteriële infecties het gaat en wat de relatie van deze specifieke onderzoeksvraag is met het rest van de aanvraag.

**Opsturen informatie**

U heeft 14 dagen de tijd om de ontbrekende informatie op te sturen. De CCD zou de gevraagde informatie echter graag uiterlijk **donderdag 24 maart 2016** van u ontvangen om uw aanvraag in de eerstvolgende vergadering te kunnen behandelen. U kunt deze informatie onder vermelding van het aanvraagnummer (AVD115002016410) aanleveren via NetFTP of per post. Indien u de informatie per post verstuurd, gebruik dan het bijgevoegde formulier.

**Wanneer een beslissing**

De beslistermijn op uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat bovengenoemde informatie is ontvangen. Na ontvangst van uw reactie/de ontbrekende informatie nemen wij uw aanvraag verder in behandeling. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

**Meer informatie**

Heeft u vragen, kijk dan op [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut). De CCD zou de gevraagde informatie graag uiterlijk donderdag 02 april 2015 van u ontvangen.

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

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.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl)
- Of bel met ons: 0900 28 000 28 (10 ct/min).

### 1 Uw gegevens

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

### 2 Bijlagen

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

### 3 Ondertekening

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



Centrale Commissie Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK s-GRAVENHAGE

bezoekadres  
Bolognalaan 50  
3584 CJ Utrecht

postadres  
Postbus 12007  
3501 AA Utrecht

T (030) 253 15 69  
info@ivd-utrecht.nl  
www.ivd-utrecht.nl

uw kenmerk  
ons kenmerk

datum 23 maart 2016  
onderwerp Antwoorden AVD115002016410

Mijne Dames en Heren,

Bijgaand zend ik u de antwoorden van de onderzoeker op uw brief d.d. 17 maart 2016.

Met vriendelijke groet



Centrale Commissie Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag

**Ons kenmerk** AVD115002016410  
**Datum** 18 maart 2016  
**Betreft** Aanvullende informatie vergunningsaanvraag

Geachte CCD,

Bedankt voor het in behandeling nemen van onze aanvraag voor een projectvergunning dierproeven getiteld "Ontwikkeling, effectiviteit en werkingsmechanismen van therapeutische antistoffen". Hieronder verlenen wij puntsgewijs de aanvullende informatie om de aanvraag verder te beoordelen. Daarbij wordt eerst een gedeelte van de tekst uit uw brief van 17 maart geciteerd (cursief), waarna wij de aanvullende informatie verschaffen.

*-Uw aanvraag bestaat uit meerdere doelstellingen die onafhankelijk van elkaar kunnen worden onderzocht, waaronder het ontwikkelen van nieuwe antistoffen tegen verschillende soorten kanker en het ontwikkelen van nieuwe antistoffen tegen infectieziektes. Aangezien het om verschillende soorten ziekten gaat, maakt u gebruik van verschillende modellen. Uw wordt verzocht aan te geven wat de meerwaarde is van het in één aanvraag onderbrengen van deze twee onderzoeksvragen. U wordt verzocht daarbij ook aan te geven of en op welke wijze resultaten/bevindingen uit de ene onderzoeksvraag gebruikt kunnen worden voor de andere onderzoeksvraag.*

De primaire doelstelling van onze aanvraag is de ontwikkeling van nieuwe effectievere therapeutische antistoffen. Het klopt dat de secundaire doelstellingen, zoals het ontwikkelen van nieuwe antistoffen tegen kanker enerzijds en infectieziektes anderzijds, uit onze aanvraag gedestilleerd kunnen worden. Dit achten wij ook belangrijk om de verschillende onderdelen van ons onderzoek aan te geven. Het opsplitsen van onze projectaanvraag naar meerdere projectaanvragen (een voor iedere secundaire doelstelling), zou echter sterk overlappende aanvragen opleveren. Een situatie waar we, naar onze mening, niet de voorkeur voor hebben. Type dierproef 1 en 2 zullen bijvoorbeeld zeker voor beide secundaire doelstellingen gebruikt worden. De transgene dieren zoals aangegeven in de projectaanvraag zullen bovendien in alle modellen gebruikt kunnen worden afhankelijk van de wetenschappelijke vraag. Alleen type dierproef 3 en 4 zijn meer toegespitst op therapeutische antistoffen gericht op



kanker (type 3) en virusinfecties (type 4). Daarnaast is het hier wel zo dat therapeutische antistoffen, ongeacht de ziekte waarvoor ze ontwikkeld worden, gemeenschappelijk mechanismen gebruiken. Resultaten met een antistof tegen een bepaalde kanker kunnen dus ook gebruikt worden voor onderzoek naar therapeutische antistoffen tegen andere kanker soorten en andere ziektes, zoals virusinfecties. Het gedrag van een antistof, bijvoorbeeld doding van virus geïnfecteerde cellen in dierproef type 4, zou dus ook vertaald kunnen worden naar doding van kankercellen. Het is zelfs zo dat één antistof zowel bij kanker als bij infectieziekten gebruikt zou kunnen worden. Denk hierbij bijvoorbeeld aan de reeds in de kliniek gebruikte antistoffen die het afweersysteem stimuleren, de "immune checkpoint" blokkerende antistoffen. Op deze manier zullen resultaten uit de ene secundaire onderzoeksvraag zeker gebruikt kunnen worden voor de andere secundaire onderzoeksvraag. Met deze voorbeelden hopen wij te verduidelijken dat het indienen van één projectaanvraag, met als primair doel om nieuwe effectievere therapeutische antistoffen te ontwikkelen, het meest voor de hand ligt.

*-Uw geeft in uw aanvraag aan naast de voor de in uw aanvraag beschreven ziektes ook antistoffen te zullen ontwikkelen voor andere ziektes waarvoor nog geen antistof therapieën beschikbaar zijn. U geeft echter niet aan om welke ziektes het gaat en op basis van welke criteria u zult besluiten onderzoek naar een niet in de aanvraag beschreven ziekte te starten. U wordt verzocht dit toe te lichten. Deze vraag wordt gesteld om te kunnen beoordelen wat het belang en de haalbaarheid van het onderzoek is en welk ongerief dieren zullen ondergaan.*

Momenteel richten wij ons op kanker en virusinfecties maar dit kan in de toekomst ook uitgebreid worden naar andere medische scenario's. Het is nu nog lastig te voorspellen bij welke ziektes een antistof therapie toepasbaar zal zijn. Dit zal afhangen van de kennis over een ziekte, of er al medicijnen voor beschikbaar zijn en of er bijvoorbeeld al belangrijke target eiwitten zijn geïdentificeerd die d.m.v. een antistof therapie geremd dan wel gestimuleerd kunnen worden om het ziektebeeld te verbeteren. Als een uitbreiding van ons onderzoek naar een nieuwe ziekte zich voordoet dan zullen wij via een amendement onze projectaanvraag aanpassen of een nieuwe projectvergunning aanvragen. Ook omdat hiervoor hoogstwaarschijnlijk een nieuw type dierproef nodig zal zijn.

*-Uw aanvraag bestaat uit zowel een fundamenteel deel als een translationeel deel. Uit uw aanvraag wordt niet geheel duidelijk of en op welke wijze de uitkomsten van het fundamentele onderzoek naar de werkingsmechanismen van bestaande therapeutische antistoffen gebruikt zullen worden bij het onderzoek naar nieuwe therapeutische antistoffen. Ook wordt niet duidelijk hoeveel dieren gebruikt zullen worden voor het beantwoorden van deze fundamentele onderzoeksvraag. U wordt verzocht dit toe te lichten.*

Het fundamentele en translationele deel van ons onderzoek zijn sterk in elkaar verweven. Dit is inherent aan het wetenschappelijk onderzoek in het huidige onderzoeksklimaat. Het is ook bijzonder moeilijk te bedenken op welke wijze nieuwe fundamentele kennis gebruikt kan worden bij het onderzoek naar betere therapeutische antistoffen, deze kennis was immers onbekend. De succesvolle ontwikkeling van therapeutische antistoffen is puur te danken aan vooraf vergaarde fundamentele

kennis. Dit is en blijft de drijvende motor achter nieuwe innovatieve toepassingen, ook op het gebied van therapeutische antistoffen. Als wij bijvoorbeeld constateren dat de binding van een antistof aan antistof-receptoren op afweercellen belangrijk is, dan kunnen wij de antistof aanpassen om de werking te verbeteren. Dit kan o.a. betekenen dat we mutaties aanbrengen in de antistof voor een betere binding aan de receptor. Dergelijke strategieën worden zelfs al toegepast in de kliniek, bijvoorbeeld bij de antistof Obinutuzumab, gebruikt voor behandeling van lymfoom. Een ander goed voorbeeld is onze onderzoekslijn waarbij we de immuunglobuline klasse van IgG naar IgA aanpassen. De fundamentele kennis rondom IgA gaf aan dat dit een goed of zelfs beter alternatief zou zijn voor IgG. Ons recente translationele onderzoek bevestigt dit.

Uit het verleden is gebleken dat wij vaak zowel translationele en fundamentele vraagstukken in ons onderzoek kunnen beantwoorden met dezelfde dierproef. Over het geheel genomen gebruiken wij dan ook maar een klein aantal dieren alleen voor fundamentele onderzoeksvragen. Wij schatten hierbij in dat 10% van ons diergebruik ten laste is van fundamentele vraagstukken. Het gaat hier met name om fundamenteel onderzoek naar antistof-receptoren die een belangrijke schakel zijn voor de werking van veel therapeutische antistoffen. Het overige en grootste deel van ons onderzoek rekenen wij tot translationeel onderzoek waarbij we de effectiviteit en werking van nieuwe therapeutische antistoffen bepalen.

*-In uw aanvraag beschrijft u dat uw onderzoek naar de werkingsmechanismen van therapeutische antistoffen zich richt op target eiwitten gerelateerd aan kanker of virus/bacterie infecties. In de rest van uw aanvraag wordt echter niet gesproken over bacteriële infecties. U wordt verzocht toe te lichten om welke bacteriële infecties het gaat en wat de relatie van deze specifieke onderzoeksvraag is met het rest van de aanvraag.*

Wij hebben momenteel niet de intentie om onderzoek te gaan doen aan therapeutische antistoffen tegen bacteriële infecties. Dit is abusievelijk in de projectaanvraag terecht gekomen en mag geschrapt worden. We hebben ook geen type dierproef in onze aanvraag waarin een bacterie infectie model is beschreven. Onze excuses voor de verwarring.

Wij hopen hiermee dat de gevraagde informatie zo volledig mogelijk is aangeleverd met dit schrijven en wachten de beoordeling van de CCD af.

Met vriendelijke groet,

[Redacted signature]

[Redacted signature]

**Van:** [REDACTED]  
**Verzonden:** dinsdag 22 maart 2016 14:32  
**Aan:** info@zbo-ccd.nl  
**Onderwerp:** Fwd: AVD115002016410: aanvullende informatie  
**Bijlagen:** winmail.dat

**Categorieën:** Dossier: [REDACTED]

Geachte [REDACTED]

Gaarne wil ik kort reageren op de vragen die u heeft voorgelegd aan de onderzoekers van bovenstaand project . Uw vragen raken ons inziens aan de vraag of het hier een toetsbare eenheid betreft. Dit punt is in de discussie in de DEC Utrecht uitdrukkelijk aan de orde geweest en we hebben ons best gedaan dat in het advies te verwerken .

Voor de volledigheid daarom nogmaals kort onze argumenten dienaangaande.

In de eerste twee bijlagen van het project wordt met name onderzocht wat het werkings mechanisme is van de antistoffen en waaraan antistoffen moeten voldoen willen ze effectief zijn .Ook is er aandacht voor de route van toediening en de in vivo condities die noodzakelijk zijn voor optimale werking ( zie ons advies onder punt 3 ).De resultaten van dit type onderzoek zijn van direct belang voor beide modellen ( bijlagen 3 en 4 ) waarin de therapeutische kwaliteiten van een aantal , op basis van het vooronderzoek , geselecteerde antistoffen worden uitgetest . Anders gezegd , bevindingen uit het vooronderzoek kunnen voor beide modellen van belang zijn maar dat moet dan wel bewezen worden . Gezien het feit dat de onderzoeksgroep een aantal unieke zaken uitzoekt zoals bijv het gebruik van antistoffen van de IgA klasse , het verbeteren van de halfwaardetijd van de antistoffen en het verbeteren van de in vivo condities is het , ook wetenschappelijk gezien , niet meer dan logisch om de bevindingen uit te willen testen in meer dan 1 model .

Ik hoop van harte dat u deze nadere uitleg kunt betrekken bij uw advies .

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

Verstuurd vanaf mijn iPad

Begin doorgestuurd bericht:

>  
 >  
 >  
 >  
 >  
 > P Denk s.v.p. aan het milieu voor u deze e-mail afdruckt.  
 > Van: Info-zbo [mailto:info@zbo-ccd.nl]  
 > Verzonden: donderdag 17 maart 2016 12:20  
 > Aan: dec-utrecht  
 > Onderwerp: RE: AVD115002016410: aanvullende informatie  
 >  
 > Geachte [REDACTED]  
 >  
 > Het gaat inderdaad om dat project.  
 >  
 > Met vriendelijke groet,  
 >  
 > [REDACTED]  
 >  
 >

> Centrale Commissie Dierproeven  
www.centralecommissiedierproeven.nl<http://www.centralecommissiedierproeven.nl/>

>  
> .....

> Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag

> .....

> T: 0900 2800028

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

>

>

>

>

>

>

> P Denk s.v.p. aan het milieu voor u deze e-mail afdruckt.

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

> Verzonden: donderdag 17 maart 2016 12:13

> Aan: dec-utrecht

> Onderwerp: AVD115002016410: aanvullende informatie

>

> Geachte DEC,

>

> Wij hebben een aanvraag voor een projectvergunning in behandeling waar u ons advies over heeft gegeven. Het gaat om het project met aanvraagnummer AVD115002016410.

>

> Ik wil u langs deze weg informeren dat we de aanvrager zojuist nog een aantal vragen gesteld hebben. Aangezien het hier ook echt een inhoudelijke vragen betreft, hebben we besloten deze niet eerst aan u voor te leggen. Zie onder voor de aan de aanvrager gestelde vragen.

>

> -Uw aanvraag bestaat uit meerdere doelstellingen die onafhankelijk van elkaar kunnen worden onderzocht, waaronder het ontwikkelen van nieuwe antistoffen tegen verschillende soorten kanker en het ontwikkelen van nieuwe antistoffen tegen infectieziektes. Aangezien het om verschillende soorten ziekten gaat, maakt u gebruik van verschillende modellen. Uw wordt verzocht aan te geven wat de meerwaarde is van het in één aanvraag onderbrengen van deze twee onderzoeksvragen. U wordt verzocht daarbij ook aan te geven of en op welke wijze resultaten/bevindingen uit de ene onderzoeksvraag gebruikt kunnen worden voor de andere onderzoeksvraag.

>

> -Uw geeft in uw aanvraag aan naast de voor de in uw aanvraag beschreven ziektes ook antistoffen te zullen ontwikkelen voor andere ziektes waarvoor nog geen antistof therapieën beschikbaar zijn. U geeft echter niet aan om welke ziektes het gaat en op basis van welke criteria u zult besluiten onderzoek naar een niet in de aanvraag beschreven ziekte te starten. U wordt verzocht dit toe te lichten. Deze vraag wordt gesteld om te kunnen beoordelen wat het belang en de haalbaarheid van het onderzoek is en welk ongerief dieren zullen ondergaan.

>

> -Uw aanvraag bestaat uit zowel een fundamenteel deel als een translationeel deel. Uit uw aanvraag wordt niet geheel duidelijk of en op welke wijze de uitkomsten van het fundamentele onderzoek naar de werkingsmechanismen van bestaande therapeutische antistoffen gebruikt zullen worden bij het onderzoek naar nieuwe therapeutische antistoffen. Ook wordt niet duidelijk hoeveel dieren gebruikt zullen worden voor het beantwoorden van deze fundamentele onderzoeksvraag. U wordt verzocht dit toe te lichten.

>

> -In uw aanvraag beschrijft u dat uw onderzoek naar de werkingsmechanismen van therapeutische antistoffen zich richt op target eiwitten gerelateerd aan kanker of virus/bacterie infecties. In de rest van uw aanvraag wordt echter niet gesproken over bacteriële infecties. U wordt verzocht toe te lichten om welke bacteriële infecties het gaat en wat de relatie van deze specifieke onderzoeksvraag is met het rest van de aanvraag.

>

>

>

> Mocht u ons over deze onderwerpen nog aanvullend willen adviseren, dan horen wij dat graag uiterlijk donderdag 24 maart 2016.

>

> Met vriendelijke groet,

>

> ██████████

>

>

> Centrale Commissie Dierproeven  
www.centralecommissiedierproeven.nl<http://www.centralecommissiedierproeven.nl/>  
>  
> .....  
> Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag  
> .....  
> T: 0900 2800028  
> E: info@zbo-ccd.nl<mailto:info@zbo-ccd.nl> (Let op: nieuw e-mail adres)  
>  
>  
>



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht

t.a.v. Instantie voor Dierenwelzijn  
Postbus 12007  
3501 AA Utrecht

**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**  
AVD115002016410

Datum 07 april 2016  
Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

**Bijlagen**  
1

Geachte [REDACTED]

Op 02 februari 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'Ontwikkeling, effectiviteit en werkingsmechanismen van therapeutische antistoffen' met aanvraagnummer AVD115002016410. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

### **Beslissing**

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet). U kunt met uw project 'Ontwikkeling, effectiviteit en werkingsmechanismen van therapeutische antistoffen' starten. De vergunning wordt afgegeven van 07 april 2016 tot en met 01 maart 2021.

### **Voorwaarden**

Aan deze vergunning zijn de voorwaarden verbonden zoals genoemd in de vergunning en hieronder toegelicht.

1) U heeft in uw aanvraag aangegeven dat u naast de voor de in uw aanvraag beschreven ziektes ook antistoffen gaat ontwikkelen voor andere ziektes waarvoor nog geen antistof therapieën beschikbaar zijn. Wij hebben u op 17 maart 2016 gevraagd toe te lichten om welke ziektes het gaat. In uw antwoord van 23 maart 2016 heeft u aangegeven dat een aanvullende aanvraag ingediend zal worden indien andere ziektes dan kanker en infectieziekten onderzocht zullen worden. U geeft in uw aanvraag echter aan dat de genoemde soorten kanker en respiratoire infectieziekten slechts voorbeelden zijn. Dit betekent dat u in uw aanvraag de mogelijkheid open heeft gelaten om andere niet beschreven soorten kanker en respiratoire infectieziekten te onderzoeken.

Aangezien deze soorten kanker en infectieziekten niet benoemd zijn, kan er geen inschatting gemaakt worden van het belang van het onderzoek naar antistof therapieën voor deze ziektes. Daarnaast kan er geen inschatting gemaakt worden van het ongerief dat de dieren in dergelijke proeven zouden ondergaan, omdat de benodigde modellen niet zijn beschreven. Dit betekent dat wij geen schade-baten analyse kunnen maken zoals vereist in Art.10a2, lid2 sub d van de Wet. Gezien bovenstaande zijn wij van mening dat uw aanvraag alleen te beoordelen is voor de daadwerkelijk beschreven ziektes. De vergunning wordt daarom beperkt tot onderzoek naar antistof therapieën voor de in de aanvraag genoemde respiratoire infectie ziektes (RSV en influenza) en soorten kanker (B cel maligniteiten, borstkanker en dikke darm kanker).

2) In artikel 4 lid 2 Richtlijn 2010/63/EU als in artikel 1d juncto artikel 10 lid 2 aanhef en onder sub a van de Wod is opgenomen dat, indien er verschillende methoden bestaan om een dierproef te verrichten, wordt gekozen voor de dierproef waarbij een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt. Wij zijn van mening dat hieronder ook het aantal in voorraad gedode proefdieren valt. Wij hechten er daarom aan het aantal in voorraad gedode dieren te beperken.

U heeft in uw aanvraag aangegeven dat in principe zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt worden. Echter per proef zal één geslacht geselecteerd worden. U heeft in uw aanvraag niet aangegeven of dieren in evenredige aantallen gebruikt kunnen worden. Om dit te borgen, hebben wij een voorwaarde toegevoegd aan deze vergunning. Indien gedurende het project blijkt dat er overige geslachts-specifieke effecten zijn, kunt u deze informatie als wijziging rapporteren aan de CCD. Deze rapportage kan voor de CCD aanleiding zijn om de voorwaarde van gelijk gebruik van beide geslachten te wijzigen of in te trekken. Deze voorwaarde is toegevoegd om het aantal in voorraad gedode dieren te beperken.

#### **Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Utrecht gevoegd zoals ontvangen op 02 februari 2016. Op 22 maart 2016 heeft de DEC ons naar aanleiding van een aan u gestelde vraag over de samenhang binnen het project een aanvullend advies toegestuurd. Bij de beoordeling van uw aanvraag is zowel het advies van de DEC als het aanvullend advies betrokken overeenkomstig artikel 10a lid 3 van de wet. Deze adviezen en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving liggen ten grondslag aan dit besluit. Wij nemen het advies van de Dierexperimentencommissie grotendeels over met uitzondering van bovenstaande afwijkingen. In aanvulling op het DEC advies hebben wij ook een algemene voorwaarde opgenomen in de vergunning.

Wij hebben u op 17 maart 2016 om aanvullende informatie gevraagd over de samenhang en de te onderzoeken ziektes. Op 23 maart 2016 heeft u per e-mail gereageerd op onze vragen. Wij kunnen ons vinden in de nadere verduidelijking van uw aanvraag.

#### **Bezwaar**

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen. Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

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

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

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

**Datum**  
07 april 2016  
**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD115002016410

**Meer informatie**

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

De Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze



ir. G. de Peuter  
Algemeen Secretaris

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

**Bijlagen**

- Vergunning

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





## Projectvergunning

### gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: UMC Utrecht  
Postbus: 12007  
Postcode en woonplaats: 3501 AA Utrecht  
Deelnemersnummer: 11500

deze projectvergunning voor het tijdvak 07 april 2016 tot en met 01 maart 2021, voor het project 'Ontwikkeling, effectiviteit en werkingsmechanismen van therapeutische antistoffen' met aanvraagnummer AVD115002016410, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Utrecht. Hierbij is afgeweken van het DEC advies om te borgen dat het onderzoek zich beperkt tot de in de aanvraag beschreven ziekten en dat mannelijke en vrouwelijke dieren in evenredige aantallen gebruikt worden.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 02 februari 2016
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 02 februari 2016;
  - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 02 februari 2016;
  - c. Advies van Dierexperimentencommissie, zoals ontvangen per digitale indiening op 02 februari 2016;
  - d. Aanvullend advies van de Dierexperimentencommissie, zoals ontvangen per digitale indiening op 22 maart 2016;
  - e. Aanvullende informatie, zoals ontvangen per digitale indiening op 23 maart 2016.

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst
Immunisaties van muizen	Muizen	440	Licht 72% Matig 28%
Verzamelen van muis materiaal	Muizen	600	Licht 67% Terminaal 33%
Tumor modellen	Muizen	7800	Licht 97% Matig 3%
Respiratoire virus modellen	Muizen	3200	Licht 95% Matig 5%

### Voorwaarden

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

- 1) De vergunning beperkt zich tot de in de aanvraag beschreven soorten kanker (B cel maligniteiten, borstkanker en dikke darmkanker) en infectieziekten (Influenza en RSV).
- 2) Mannelijke en vrouwelijke dieren moeten in evenredige aantallen gebruikt worden. Indien gedurende het project blijkt dat er geslachts-specifieke effecten zijn, kunt u deze informatie als wijziging rapporteren aan de CCD. Deze informatie kan voor de CCD aanleiding zijn om bovenstaande voorwaarde van gelijk gebruik van beide geslachten te wijzigen of in te trekken. Indien voorafgaand aan de proeven al informatie in de literatuur beschikbaar is waaruit blijkt dat een model of proces geslachtsafhankelijk zou zijn, is het ook mogelijk om deze informatie te gebruiken om wetenschappelijk te onderbouwen dat het gebruik van zowel mannelijke als vrouwelijke dieren zou leiden tot een grote toename van het benodigd aantal dieren en dit aan ons te rapporteren.

**Datum**

07 april 2016

**Onze referentie**

Aanvraagnummer

AVD115002016410

**Algemene voorwaarde**

3) In artikel 10, lid 1a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

## **Weergave wet- en regelgeving**

### **Dit project en wijzigingen**

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

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

### **Verzorging**

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

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

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

### **Pijnbestrijding en verdoving**

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

### **Einde van een dierproef**

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

**Datum**

07 april 2016

**Onze referentie**

Aanvraagnummer

AVD115002016410

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

Uit artikel 13c volgt dat het doden van dieren door een deskundig persoon moet worden gedaan, wat zo min mogelijk pijn, lijden en angst met zich meebrengt. De methode om te doden is vastgesteld in de Europese richtlijn artikel 6.

In artikel 13d is vastgesteld dat proefdieren geadopteerd kunnen worden, teruggeplaatst in hun habitat of in een geschikt dierhouderijsysteem, als de gezondheidstoestand van het dier het toelaat, er geen gevaar is voor volksgezondheid, diergezondheid of milieu en er passende maatregelen zijn genomen om het welzijn van het dier te waarborgen.

