

	Inventaris Wob-verzoek W16-16S								
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTS2016467								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel oud				x		x	x	
3	Niet-technische samenvatting oud			x					
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1 oud				x		x	x	
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2 oud				x		x	x	
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3 oud				x		x	x	
7	DEC-advies				x			x	
8	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
9	Verzoek aanvulling aanvraag				x		x	x	
10	Projectvoorstel herzien				x		x	x	
11	Niet-technische samenvatting herzien	x							
12	Bijlage beschrijving dierproeven 1 herzien				x		x	x	
13	Bijlage beschrijving dierproeven 2 herzien				x		x	x	
14	Bijlage beschrijving dierproeven 3 herzien				x		x	x	
15	Advies CCD		x						x
16	Beschikking en vergunning				x		x	x	



Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	☒ Ja > Vul uw deelnemernummer in 10800 ☐ Nee > U kunt geen aanvraag doen																
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">Naam instelling of organisatie</td> <td>Universiteit Utrecht</td> </tr> <tr> <td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td> <td>[Redacted]</td> </tr> <tr> <td>KvK-nummer</td> <td>30275924</td> </tr> <tr> <td>Straat en huisnummer</td> <td>Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht</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>	Naam instelling of organisatie	Universiteit Utrecht	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]	KvK-nummer	30275924	Straat en huisnummer	Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht	Postbus	12007	Postcode en plaats	3501AA Utrecht	IBAN	NL27INGB0000425267	Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Utrecht
Naam instelling of organisatie	Universiteit Utrecht																	
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]																	
KvK-nummer	30275924																	
Straat en huisnummer	Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht																	
Postbus	12007																	
Postcode en plaats	3501AA Utrecht																	
IBAN	NL27INGB0000425267																	
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Utrecht																	
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>																	
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 80%;">(Titel) Naam en voorletters</td> <td>[Redacted]</td> <td style="width: 20%; text-align: right;"> ☐ Dhr. ☒ 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]	☐ Dhr. ☒ Mw.	Functie	[Redacted]		Afdeling	[Redacted]		Telefoonnummer	[Redacted]		E-mailadres	[Redacted]		
(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	☐ Dhr. ☒ Mw.																
Functie	[Redacted]																	
Afdeling	[Redacted]																	
Telefoonnummer	[Redacted]																	
E-mailadres	[Redacted]																	
1.5	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 80%;">(Titel) Naam en voorletters</td> <td></td> <td style="width: 20%; text-align: right;"> ☐ Dhr. ☐ Mw. </td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td></td> <td></td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters		☐ Dhr. ☐ Mw.	Functie			Afdeling			Telefoonnummer			E-mailadres			
(Titel) Naam en voorletters		☐ Dhr. ☐ Mw.																
Functie																		
Afdeling																		
Telefoonnummer																		
E-mailadres																		

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- | | |
|------------|--------------|
| Startdatum | 1 - 5 - 2016 |
| Einddatum | 1 - 5 - 2021 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- | |
|--|
| Nieuwe immuuntherapie voor chronische ontstekingen |
|--|
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- | |
|--|
| Nieuwe therapie voor chronische ontstekingsziekten |
|--|
- 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

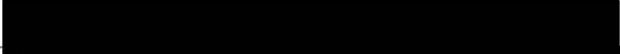
- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? ☒ Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1441,- Lege
☐ Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.
☐ Via een eenmalige incasso
☐ Na ontvangst van de factuur

5 Checklist bijlagen

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

6 Ondertekening

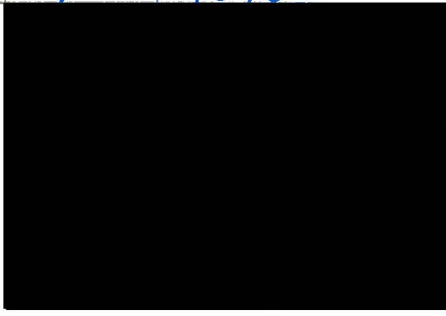
- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:
- Centrale Commissie
 Dierproeven
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag
- Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondergetekende verklaart:
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
 - dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
 - dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
 - dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
 - dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam 

Functie 

Plaats Utrecht

Datum 14-03-2016

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.centralecommissiedierproeven.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
- ☐ 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.

In de westerse wereld is er toename aan patiënten met **chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten** (zoals bijvoorbeeld reumatoïde artritis en dermatitis). Alleen reumatoïde artritis treft ongeveer 1% van

alle volwassenen. Het probleem in deze chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten is de foutieve immuun regulatie in deze patiënten, die zorgt voor het ontwikkelen van een auto-immune ontsteking gericht tegen lichaamseigen antigenen. De huidige therapie in deze patiënten is gebaseerd op algehele aspecifieke immuun suppressie. Het levenslange gebruik van deze medicatie gaat gepaard met een toegenomen kans op infecties, tumoren en het ontwikkelen van therapie resistentie, en is helaas niet effectief in alle patiënten.

De ideale therapie in dergelijke chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten is het herstellen van de immuun balans door het herstellen van tolerantie specifiek tegen de lichaamseigen antigenen. Helaas blijkt het induceren van tolerantie *tijdens* chronische ontstekingen lastig.

Regulerende [REDACTED] cellen zijn cruciaal in de immuun balans. In veel chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten is beschreven dat de regulerende [REDACTED] cellen verminderd aanwezig zijn of verminderd functioneel zijn. Door het activeren of induceren van regulerende [REDACTED] cellen gericht tegen het ziekte inducerend-antigeen kan de immuun balans hersteld worden¹. [REDACTED] zijn hierbij van groot belang. DCs spelen een centrale rol in het immuunsysteem en zijn essentieel voor de inductie van een effectieve [REDACTED] cel response tegen pathogenen maar ook voor het induceren van [REDACTED] in de periferie en hierdoor dragen ze bij aan het behoud van de immuun balans².

Het exploiteren van [REDACTED] cellen als target voor immuuntherapie kan op verschillende manieren. Ten eerste kan je [REDACTED] cellen die zogeheten tolerogene eigenschappen hebben gebruiken als **celtherapie**. Initiële studies laten zien dat met behulp van deze [REDACTED] cellen ([REDACTED]) ziekte kan worden voorkomen in diermodellen voor chronische ontstekingen^{3,4,5}. Daarnaast heeft een initiële fase I trials in New Castle in de mens laten zien dat het geven van [REDACTED] therapie in principe veilig is in arthritis patiënten. Zij hebben geen bijwerkingen gezien tijdens de trial maar de effectiviteit kon niet beoordeeld worden in deze trials (persoonlijke communicatie).

Het probleem is dat het onduidelijk is wat de effectiviteit van een dergelijke [REDACTED] therapie tijdens chronische ontstekingen bepaald en aan welke criteria, op zowel moleculair als eiwit niveau, de [REDACTED] moet voldoen om in een patiënt met een chronische (auto-immuun) ziekte effectief en veilig te zijn. Een tweede manier om [REDACTED] cellen te gebruiken als mogelijk therapeutische route is door het ontwikkelen van een [REDACTED] **vaccin**. Wat we hiermee bedoelen is een vaccinatie die zorgt dat er regulerende [REDACTED] cellen geïnduceerd worden in vivo tegen het vaccin eiwit, bijvoorbeeld door de aanwezigheid van een tolerogeen adjuvans of het gericht vaccineren via tolerogene routes. Vele studies hebben laten zien dat profylactisch vaccineren via mucosale routes met zelf-antigenen ziekte inductie kan voorkomen. Het therapeutisch vaccineren tijdens ziekte is echter veel minder effectief. De hypothese is dat de in vivo aanwezige [REDACTED] tijdens een chronische ontsteking veranderd zijn, maar ook hier zijn de exacte eigenschappen van de dendritische cellen onbekend.

Voor dat een effectieve immuuntherapie met behulp van [REDACTED]s in chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten ontwikkeld kan worden is het dus cruciaal dat de eigenschappen van [REDACTED] goed in kaart worden gebracht en dat de effectiviteit van verschillende directe en indirecte therapieën vergeleken worden **tijdens** chronische ontsteking.

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?

1. Wat zijn de karakteristieken van en in vitro gekweekte [REDACTED] die effectief regulerende [REDACTED] cellen induceert tijdens chronische ontsteking.
Het beantwoorden van deze vraag zal een grote stap voorwaarts opleveren voor het ontwikkelen van [REDACTED] therapie. Voor het veilig en effectief ontwikkelen van [REDACTED] therapie is het essentieel

om te weten welke factoren een [] definiëren op eiwit niveau en moleculair niveau en op het niveau van cel-cel interactie. Momenteel is het niet bekend welke eigenschappen van de [] cruciaal zijn om [] te induceren tijdens chronische ontstekingen. Ook is onbekend welke factoren bepalen dat een [] niet verandert van functie na inspuiten bij een chronische ontsteking. Dit laatste is natuurlijk cruciaal voor veilige therapie, want als een [] kan veranderen kan de effectiviteit van de therapie verminderen of in het ergste geval zelfs de ziekte verergeren⁴. Andere vragen die beantwoord moeten worden voordat een effectieve [] celtherapie in de mens kan worden toegepast tijdens ziekte, is wat de ideale omstandigheden zijn voor therapie zoals, route van toediening, frequentie van behandeling, dosis van behandeling, antigeen belading van de [] en welk kweek protocol het meest effectief is.

2. Kunnen we tijdens chronische ontsteking een [] vaccin inzetten om in vivo via [] regulerende [] cellen te induceren en zo de immuun balans te herstellen. In dit deel van het onderzoek zal gekeken worden of het mogelijk is een therapeutisch vaccin te ontwikkelen waarmee in vivo [] getarget kunnen worden en aan welke voorwaarden een dergelijk vaccin moet voldoen. Dit zal gedaan worden op basis van het maken van verschillende combinaties eiwit adjuvans en/of verschillende routes van toediening van het therapeutisch vaccin. Daarnaast zal ook gekeken worden naar het [] dat tijdens de vaccinatie bereikt wordt in vivo en welke [] essentieel zijn voor een [] vaccinatie.

Haalbaarheid:

In dit project willen we een aantal fundamentele vragen beantwoorden die nodig zijn voor het ontwikkelen van [] therapie in de toekomst. Binnen de onderzoeksgroep hebben we al aangetoond met behulp van in vitro onderzoek dat een bepaald type in vitro gekweekte [] (), maar of deze cellen ook in vivo effectief zijn is onbekend.



Figuur 1: [] zijn gekweekt vanuit beenmerg van muizen in aanwezigheid van [] en []. Deze [] hebben [] zorgen voor activatie van [] cellen. Daarnaast bleken [] cellen gestimuleerd met deze []

In het verleden hebben we meer onderzoek gedaan naar [] therapie in artritis binnen onze onderzoeksgroep. Uit dit onderzoek is gebleken dat [] artritis kunnen onderdrukken wanneer profylactisch toegediend, helaas bleken deze [] niet in staat chronische (auto-immuun) ziekte te onderdrukken. In de literatuur zijn momenteel meerdere [] kweek protocollen beschreven die mogelijk wel een chronische ontsteking kunnen onderdrukken en juist deze zouden we in detail willen bestuderen in dit project^{3,7}. Door het vergelijken van verschillende [] protocollen en analyseren van de effectiviteit van verschillende [] subsets in het induceren van regulerende [] cellen tijdens chronische ontsteking, zowel in vitro als in vivo, kunnen we in dit project duidelijk aantonen welke [] kunnen induceren tijdens chronische ontsteking. Door het vergelijken van

de moleculaire en eiwit profielen van deze cellen kunnen we zeer gedetailleerd in kaart brengen aan welke eigenschappen een effectieve [REDACTED] moet voldoen. Deze kennis kan gebruikt worden om een biomarker te ontwikkelen voor het testen van [REDACTED] voor humane therapeutische toepassing. In humane geneeskunde is het belangrijk om, voordat de therapie wordt toegepast, te weten of de celtherapie effectief en veilig is iedere keer dat een individuele patiënt behandeld wordt.

Daarnaast is binnen de onderzoeksgroep de afgelopen jaren veel onderzoek gedaan naar het ontwikkelen van mogelijke [REDACTED] vaccinaties. [REDACTED] hierbij onder andere gekeken naar mucosale toediening van zelf eiwitten ter voorkoming van ziekte⁸, of specifiek gericht targeten van [REDACTED]⁹. Via beide routes werd het ontstaan van artritis verminderd door het induceren van [REDACTED]. Helaas bleken beide methoden minder effectief als therapie dan profylactisch. Wat de oorzaak is van deze verminderde effectiviteit willen we graag uitzoeken door de [REDACTED] goed in kaart te brengen.

Een laatste punt waar we binnen de onderzoeksgroep naar gekeken hebben is of er mogelijk [REDACTED] adjuvantia beschikbaar zijn. Eerste aanwijzingen naar het gebruik van PLGA (poly-lactic-co-glycolic acid) partikels wees uit dat deze gebruikt kunnen worden om tolerantie inducerende capaciteit van een vaccin te verhogen¹⁰, door het moduleren van [REDACTED]. [REDACTED] die behandeld werden met PLGA partikels brachten meer retinaldehyde dehydrogenase tot expressie, wat mogelijk een rol speelt in het induceren van regulerende [REDACTED] cellen¹¹.

Deze [REDACTED] studies die aansluiten bij de huidige aanvraag geven aan dat binnen de [REDACTED] de ervaring aanwezig is die noodzakelijk is voor het succesvol uitvoeren van het project.

Naast het gebruik van technieken en vaardigheden die beschikbaar zijn binnen de onderzoeksgroep zullen we gebruik maken van uitgebreide samenwerkingen nationaal en internationaal. Binnen het onderzoek naar [REDACTED] therapie is er vanuit de EU een werkgroep opgericht die AFFACT heet. In deze werkgroep wordt 2 maal per jaar overlegd over het onderzoek naar [REDACTED] en de problemen en oplossingen die men heeft gevonden. Als actieve deelnemers aan deze werkgroep zijn we snel op de hoogte van de nieuwste ontwikkelingen en kunnen hier actief op inspringen.

Voor het ontwikkelen van een [REDACTED] model zoals verderop beschreven in [REDACTED] zullen we gebruik maken van de expertise van de groep uit Nijmegen die dit model heeft opgezet en daar eerst de techniek en het model leren voordat we dit zelf zullen toepassen.

3.3 Belang

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

Het wetenschappelijk belang van deze studie is dat momenteel niet bekend is aan welke parameters een [REDACTED] moet voldoen om veilig en effectieve therapie te effectueren tijdens een chronische ontsteking. Ook is momenteel niet bekend of het mogelijk is een [REDACTED] vaccin in te zetten als therapie tijdens chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten. Deze kennis is van groot belang om deze therapie in de toekomst mogelijk te maken. De ontwikkeling van een mogelijke biomarker die vooraf effectiviteit en veiligheid van de celtherapie kan voorspellen bij de individuele patiënt is van groot belang om deze vorm van therapie in de toekomst mogelijk te maken. Het maatschappelijk belang zit in het induceren van langdurige tolerantie in de groter wordende groep mensen met chronische (auto-immuun) ontsteking ziekten, zoals patiënten met reumatoïde artritis, dermatitis, diabetes, colitis of MS. De kennis vanuit deze studie kan bijdragen aan de toekomstige ontwikkeling van een langdurig herstel van de immuun balans in vele patiënten met chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten op de lange termijn.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

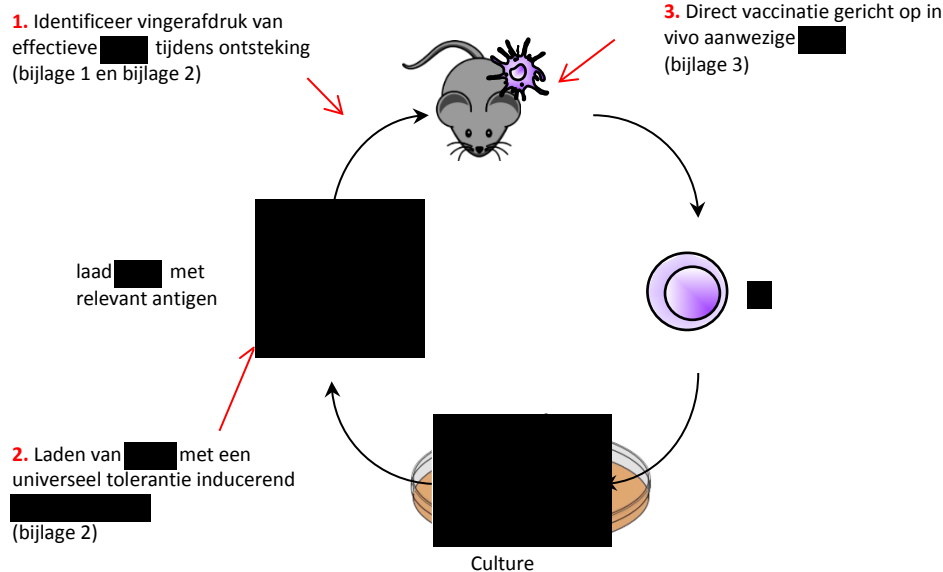
Binnen de studie willen we kijken of we een therapie kunnen ontwikkelen die een chronisch (auto-immuun) ontstekingsmodel zoals artritis kan onderdrukken.

In het eerste deel (bijlage 1) van het onderzoek willen we verschillende in vitro kweek protocollen voor het kweken van mogelijke [REDACTED] met elkaar vergelijken. In de literatuur zijn verschillende [REDACTED] protocollen beschreven^{3,7}. Het betreft vaak een gemengde cel populatie waarin ook [REDACTED] aanwezig zijn¹³. Hoewel het voor het onderzoek belangrijker is dat de cellen [REDACTED] zijn dan welk subtype [REDACTED] exact aanwezig is, zal dit wel meegenomen worden in de karakterisatie van de cellen. Door de protocollen met elkaar in vitro te vergelijken kunnen we de meest veelbelovende selecteren voor verder in vivo onderzoek. [REDACTED] zullen in vitro gekweekt worden en hun oppervlakte markers zullen gekarakteriseerd worden met behulp van flowcytometrie analyse. Tevens zullen we eiwit productie en [REDACTED] analyseren. Deze eiwitten [REDACTED] zijn van groot belang voor inter-cel communicatie en geven informatie over het functioneren van de [REDACTED]. Door het gebruik van qPCR, mRNA analyse en het gebruik van microarrays zullen we tevens de moleculaire vingerafdruk van deze cellen in kaart brengen. Juist deze laatste gedetailleerde analyse zal informatie geven welke unieke eigenschappen een [REDACTED] heeft. Naast het in kaart brengen van het fenotype van de gekweekte [REDACTED] willen we ook analyseren of de [REDACTED] in vitro regulerende [REDACTED] cellen kan induceren. Hiertoe zullen naïeve antigeen specifieke [REDACTED] cellen (geïsoleerd uit een [REDACTED] muis) gekweekt worden in aanwezigheid van [REDACTED] en antigeen. Na afloop zullen we de [REDACTED] cellen analyseren op expressie van markers die specifiek zijn voor [REDACTED] cellen, zoals [REDACTED] en hun [REDACTED] activiteit meten in een in vitro [REDACTED] assay.

In het verlengde (bijlage 2) hiervan willen we de twee typen [REDACTED] die in bijlage 1 getest zijn en daar effectief bleken om [REDACTED] cellen te induceren gebruiken, als celtherapie in vivo in chronische ontsteking. Door de [REDACTED] geladen met een [REDACTED] antigeen in te spuiten in diermodellen voor chronische ontstekingen zoals artritis, dermatitis en transplantatie, kan het ziekteverloop worden bestudeerd. Met behulp van [REDACTED] muizen kunnen we ook de [REDACTED] in vivo in detail volgen. Hiertoe worden [REDACTED] cellen geïsoleerd uit [REDACTED] muizen, gelabeld met een vitale fluorescente kleurstof en ingespoten in dieren met artritis. Deze cellen kunnen we aan het eind van de studie isoleren uit de immuun organen en bestuderen of ze [REDACTED] eigenschappen hebben gekregen.

In dit deel zullen we ook de effectiviteit van tolDCs geladen met het [REDACTED] inducerend [REDACTED] ([REDACTED]) vergelijken met [REDACTED] geladen met [REDACTED] eiwitten. Eerdere studies hebben laten zien dat [REDACTED] eiwitten verschillende chronische ontstekingen kunnen remmen en mogelijk als therapie ingezet zouden kunnen worden om [REDACTED] te induceren tegen chronische ontstekingen¹². Om dit te bevestigen zullen we de met [REDACTED] inspuiten in andere modellen voor chronische ontsteking zoals dermatitis in de muis. Om een translationele stap te zetten naar de mens willen we ook gebruik maken van een [REDACTED] model voor transplantatie. In dit model worden [REDACTED] immuun cellen in een muis gespoten na een transplantatie en [REDACTED], de immuunreactie (afstotingsreactie) die hierdoor ontstaat is te onderdrukken met [REDACTED] cellen. Dit model is opgezet in Nijmegen¹⁵ en zal ook in nauwe samenwerking worden uitgevoerd. Dit model zal uitwijzen of [REDACTED] eiwit ook humaan effectief zijn in een gecompliceerde in vivo immuunreactie, deze stap is cruciaal voor toekomstige toepassing in humane geneeskunde.

Het laatste deel van de studie (bijlage 3) zal zich meer richten op het induceren van [REDACTED] cellen door direct te vaccineren met een [REDACTED] vaccin. Hiervoor willen we verschillende adjuvantia¹⁴ (bijvoorbeeld gemodificeerde [REDACTED] liganden, nanoparticles, nanoparticles met immuun [REDACTED] eiwitten¹² of [REDACTED]⁸ in het geval van chronische ontstekingen of artritis specifiek) en dieren behandelen tijdens de ziekte. Het voordeel van deze aanpak is dat een directe vaccinatie therapie niet afhankelijk is van celkweek in gespecialiseerde ziekenhuizen en dus breder ingezet kan worden en

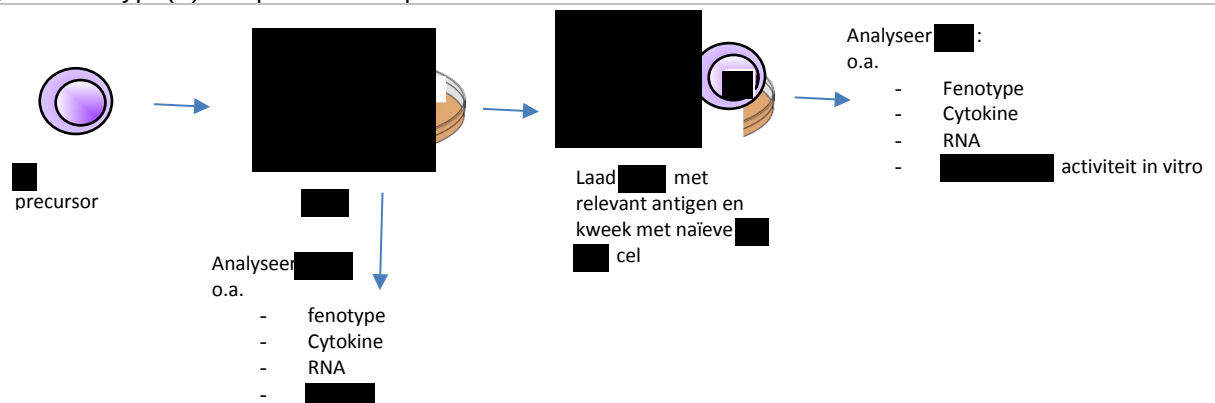


mogelijk meer patiënten kan bereiken. Met de kennis verkregen uit de andere twee delen kan gericht gekeken worden welke [] cellen getarget moeten worden met een vaccin.

Figuur 2:

Schematische weergave van [] kweek en therapie en de interactie tussen de verschillende bielagen. [] voorloper cellen worden geïsoleerd, in vitro gekweekt tot [], geladen met antigeen. Na analyse in bielage 1 worden de cellen ingespoten in muizen met een chronische ontsteking in bielage 2. In bielage 3 wordt de mogelijkheid van celvrije therapie onderzocht door direct [] in vivo te bereiken met behulp van een [] vaccin.

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



Deel 1: In dit deel zullen we beenmerg en andere lymfoïde organen uit naïeve muizen gebruiken als donor cellen voor het kweken van [] in vitro. Het fenotype van de [] zal beoordeeld worden met behulp van verschillende analyses zoals fluorescence activated cell sorting (FACS), microarray, luminex (voor eiwit en RNA productie), quantitative polymerase chain reaction (qPCR) en []. De in vitro functionaliteit zal beoordeeld worden met behulp van [] cellen uit native donor muizen. Door [] te laden met een antigeen en [] te stimuleren kan beoordeeld worden wat voor [] cel reactie [] in vitro induceren.

Figuur 3: schematische weergave van de kweek en de analyse van [] in bielage 1.

[] precursors uit beenmerg worden gekweekt tot [] in vitro, vervolgens worden deze direct geanalyseerd op uiterlijke kenmerken en vervolgens functioneel geanalyseerd door te kijken of ze

_____ cellen kunnen induceren. Dit wordt geanalyseerd door de _____ cellen te bestuderen op fenotype, cytokine productie en ook _____ e capaciteit in een _____ assay.

Deel 2: In het tweede deel zal bekeken worden of _____ zoals gekweekt in het eerste deel, functioneel zijn in vivo tijdens chronische ontstekingsreacties. Hier worden maximaal twee kweekmethoden gekozen, op basis van de effectiviteit van de _____ om in vitro _____ cellen te induceren. In eerst instantie zullen we dit in het proteoglycaan geïnduceerde artritis model testen. In dit model voor chronische artritis in de muis wordt een immuunreactie tegen het kraakbeen opgewekt door inspuiten van het kraakbeeneiwit proteoglycaan en met dit model hebben we veel ervaring binnen de vakgroep^{o.a. 6,8,9,12}. Verder hebben we de beschikking over _____ muizen met een specificiteit voor het ziekte inducerend proteoglycaan. _____

_____ ¹². Hier zullen we verschillende routes van toediening (intradermaal, s.c., i.v. etc.), timing, frequenties (enkelvoudig of meervoudig) en de verschillende antigenen (bijvoorbeeld proteoglycaan en heat shock eiwit) met elkaar vergelijken en uitlezen op effectiviteit om de ontsteking te onderdrukken. Hierbij willen we ook het mechanisme van de therapeutische effectiviteit in kaart brengen met behulp van _____ cel transfers naar de dieren met artritis en kijken of er inderdaad _____ cellen geïnduceerd worden en mogelijk de ziekte wordt geremd door deze cellen. Door de verschillende transgene _____ cellen met congene markers te gebruiken en voor het transfereren te labelen met verschillende vitale fluorescente labels kunnen we deze in vivo vervolgen en aan het einde van het experiment in vitro verder analyseren. De protocollen die het meest effectief blijken willen we vervolgen ook testen in andere modellen voor chronische ontsteking zoals bijvoorbeeld humane transplantatie¹⁵ en atopische dermatitis¹⁶. Voor het _____ model is gekozen omdat dit een _____ muis model is waarin de humane afweerreactie en _____ inductie bestudeerd kan worden. Dit model zal in nauwe samenwerking met een onderzoeksgroep in _____ worden uitgevoerd, omdat deze groep ervaring heeft met dit model. Het dermatitis model is gekozen omdat dit een chronisch ontstekingsmodel is waarmee ervaring is binnen de vakgroep en omdat dit model een ander type ontsteking geeft dan artritis. Artritis is een meer Th1 type ontsteking, terwijl dermatitis een meer gemengd Th2, Th1 beeld geeft. Door juist verschillende typen ontsteking te kiezen kunnen deze experimenten de vraag beantwoorden of _____ therapie voor meerdere chronische ontstekingen gebruikt kan worden in de toekomst. In het geval van onderzoek bij dermatitis zal het _____) vergeleken worden met _____

Deel 3: In het laatste deel willen we een _____ vaccin testen. Het is bekend dat via bepaalde routes _____ in vivo getarget kunnen worden. Bijvoorbeeld via _____ of _____ vaccinatie routes. Het is echter moeilijk om tijdens chronische ontsteking deze _____ te bereiken. Om dit te verbeteren willen we een vaccin combineren met een ziekte relevant antigen _____ en een mogelijk _____ adjuvans. De keuze voor de _____ adjuvantia zal gemaakt worden op basis van literatuur en eerdere resultaten vanuit de onderzoeksgroep. Een voorbeeld is nanoparticles (_____, deze induceren een _____ fenotype in _____ ^{10,11}. Door _____ partikel te combineren met _____ peptide via een tolerogene route is het mogelijk een tolerogeen vaccin te maken. Naast PLGA willen we ook _____ TLR liganden _____ en andere nanopartikels al dan niet geladen met anti-inflammatoire hulpstoffen (denk hierbij aan antilichamen of siRNA tegen _____) of nieuwe tolerogene adjuvantia testen. Ook in dit deel van de studie zullen we het mechanisme van het vaccin en de effectiviteit van regulerende _____ inductie monitoren met behulp van de verschillende _____ receptor transgene muismodellen. Tevens zal met behulp van verschillend conditionele knock-out muizen waarin specifieke subsets _____ kunnen worden uitgeschakeld gekeken worden welke _____ in vivo essentieel is voor het bereiken van een _____ effect. Wanneer het _____ effectief is als _____ vaccin willen we dit herhalen in andere chronische ontstekingsmiddelen zoals, transplantatie en atopische dermatitis. Dit zijn ook modellen waar in de _____ een belangrijke rol speelt tijdens de ontstekingen¹⁷.

Referentielijst DEC aanvraag

Referenties:

1. Sakaguchi, S. (2004). Naturally arising CD4⁺ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.*, 22, 531-562
2. Ohnmacht, C., Pullner, A., King, S. B., Drexler, I., Meier, S., Brocker, T., & Voehringer, D. (2009). Constitutive ablation of dendritic cells breaks self-tolerance of CD4 T cells and results in spontaneous fatal autoimmunity. *The Journal of experimental medicine*, 206(3), 549-559.
3. Hilkens, C. M., Isaacs, J. D., & Thomson, A. W. (2010). Development of dendritic cell-based immunotherapy for autoimmunity. *International reviews of immunology*, 29(2), 156-183.
4. Hilkens, C. M. U., & Isaacs, J. D. (2013). Tolerogenic dendritic cell therapy for rheumatoid arthritis: where are we now?. *Clinical & Experimental Immunology*, 172(2), 148-157.
5. Stoop, J. N., Harry, R. A., von Delwig, A., Isaacs, J. D., Robinson, J. H., & Hilkens, C. M. (2010). Therapeutic effect of tolerogenic dendritic cells in established collagen-induced arthritis is associated with a reduction in Th17 responses. *Arthritis & Rheumatism*, 62(12), 3656-3665.
6. [Redacted]
7. Manicassamy, S., & Pulendran, B. (2011). Dendritic cell control of tolerogenic responses. *Immunological reviews*, 241(1), 206-227.
8. [Redacted]
9. [Redacted]
10. [Redacted]
11. [Redacted]
12. [Redacted]
13. Helft, Julie, et al. "GM-CSF mouse bone marrow cultures comprise a heterogeneous population of CD11c⁺ MHCII⁺ macrophages and dendritic cells." *Immunity* 42.6 (2015): 1197-1211.
14. Keijzer, Chantal, et al. "Treg inducing adjuvants for therapeutic vaccination against chronic inflammatory diseases." *Frontiers in immunology* 4 (2013).
15. [Redacted]
16. Spergel, Jonathan M., et al. "Roles of TH1 and TH2 cytokines in a murine model of allergic dermatitis." *Journal of Clinical Investigation* 103.8 (1999): 1103.
17. Van Eden, Willem, Ruurd Van der Zee, and Berent Prakken. "Heat-shock proteins induce T-cell regulation of chronic inflammation." *Nature Reviews Immunology* 5.4 (2005): 318-330.
18. Glant, Tibor T., Alison Finnegan, and Katalin Mikecz. "Proteoglycan-induced arthritis: immune regulation, cellular mechanisms, and genetics." *Critical Reviews in Immunology* 23.3 (2003).
19. Hawkins, Penny, et al. "Applying refinement to the use of mice and rats in rheumatoid arthritis research." *Inflammopharmacology* 23.4 (2015): 131-150.
20. Hish Jr, Gerald A., et al. "Effects of Analgesic Use on Inflammation and Hematology in a Murine Model of Venous Thrombosis." *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS* 53.5 (2014): 485.

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.

Deel 1: De data uit deel 1 zullen gebruiken om de [Redacted] kweek methoden voor deel 2 te optimaliseren.
Deel 2: slechts twee van de [Redacted] protocollen die in deel 1 het meest effectief [Redacted] cellen [Redacted] zullen ook daadwerkelijk in vivo getest worden op therapeutische effectiviteit. De meest [Redacted] zal vervolgens in deel 1 in nog meer detail bekeken worden met behulp van microarray analyse
Deel 3: De kennis van de eigenschappen van [Redacted] uit 1 en 2 zal bijdragen aan mogelijkheid om in vivo [Redacted] te karakteriseren, daarnaast zullen de kritische eigenschappen voor een [Redacted] helpen in de zoektocht naar een effectief toleroegen vaccin.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	In vitro kweek van ████████ en analyse van fenotype en functie
2	██████ therapie in chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten
3	Ontwikkelen van een ████████ vaccin voor chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Format

Niet-technische samenvatting

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

1 Algemene gegevens

1.1 Titel van het project	Nieuwe therapie voor chronische ontstekingsziekten
1.2 Looptijd van het project	1-2-2016 t/m 1-2-2021
1.3 Trefwoorden (maximaal 5)	Chronische auto-immuunziekten, therapie, vaccin, cel therapie

2 Categorie van het project

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

3 Projectbeschrijving

3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)	Chronische ontstekingsziekten, zoals reuma, diabetes en colitis, zijn een zware belasting voor patiënten. Dit soort chronische ontstekingen zijn het gevolg van een fout in het immuunsysteem waardoor de balans verstoord is. Het immuunsysteem reageert dan op lichaamseigen eiwitten. De huidige medicatie is gericht op het geheel onderdrukken van het immuunsysteem. Langdurig gebruik gaat gepaard met bijwerkingen, zoals meer infecties en tumoren. Bovendien komt het voor dat de therapie na verloop van tijd minder goed of helemaal niet meer werkt. Beter zou zijn om de balans in het immuunsysteem te herstellen. Ons onderzoek is gericht op het vinden van een nieuwe therapie die de
---	---

immuunbalans kan herstellen bij patiënten met een chronische ziekte. Dit is helaas een steeds groter wordende groep patiënten in de westerse wereld, alleen al reumatoïde artritis treft ongeveer 1% van de gehele bevolking. Een therapie die de immuunbalans kan herstellen is dus van grote maatschappelijke waarde.

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

In het eerste deel van het onderzoek kijken we of het mogelijk is de balans in het immuunsysteem te herstellen via een zogeheten celtherapie. Hiervoor maken we in het laboratorium een bepaalde witte bloedcel na die belangrijk is voor het in stand houden van de immuunbalans bij gezonde mensen en dieren. Tijdens ziekte geven we de cel terug aan het zieke dier en kijken we of we daarmee de balans herstellen. Ook willen we een antwoord krijgen op de vraag aan welke voorwaarden een goede, effectieve en veilige celtherapie moet voldoen. Deze voorwaarden kunnen in de toekomst gebruikt worden om cellen te testen voordat ze in de patiënt gebruikt worden.

Het tweede deel van het onderzoek geeft antwoord op de vraag of het mogelijk is een vaccin te ontwikkelen voor chronische ontstekingsziekte. Het voordeel van een vaccin is dat we er geen cellen voor hoeven te kweken, waardoor we in de toekomst meer patiënten kunnen behandelen. Een nadeel is dat vaccins juist tijdens chronische ontstekingen moeilijk inzetbaar zijn, zo blijkt uit eerder onderzoek. In dit project zullen we de vraag onderzoeken waarom het zo moeilijk is een chronische ontsteking te doorbreken.

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

In totaal zullen we voor de verschillende delen van het onderzoek maximaal 8569 muizen gebruiken.

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

De dieren waar we de nieuwe therapie op testen zullen een chronische ziekte ontwikkelen zoals bijvoorbeeld artritis. Het geven van injecties geeft kort ongemak. Daarna ontwikkelen de dieren ziekteverschijnselen. Het onderzoeken en behandelen brengt stress voor de muizen met zich mee.

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

Ongeveer 30% van de dieren zal zonder voorafgaande handelingen worden gedood en dat geldt als licht ongerief. De dieren met chronische ziekten zullen maximaal matig ongerief ervaren.

3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?

De dieren die celdonor zijn voor het onderzoek naar de celtherapie zullen zonder voorafgaande handelingen worden gedood zodat we de cellen van het immuunsysteem kunnen onderzoeken. Aan het eind van het onderzoek zullen alle andere dieren worden gedood om ze te kunnen onderzoeken.

4 Drie V's

4.1 Vervanging Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.	Het onderzoek naar een complex orgaansysteem als het immuunsysteem is helaas niet mogelijk met behulp van celkweeksystemen alleen, of door middel van computermodellen, omdat we nog niet voldoende kennis bezitten over de ingewikkelde interactie tussen de cellen.
4.2 Vermindering Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.	We maken gebruik van gedegen statische berekeningen vooraf en van ziektemodellen waarmee we veel ervaring hebben, zodat we minder dieren nodig hebben om betrouwbare resultaten te verkrijgen. We maken gebruik van de expertise van de onderzoekers binnen de afdeling en werken samen met andere groepen met ervaring. Dit zorgt voor betrouwbaardere resultaten en vermindering van experimenten die om technische redenen minder succesvol zijn. Daarnaast zullen we voor de ontwikkeling van de celtherapie eerst in het laboratorium kijken welke cellen het meest veelbelovend lijken en daar slechts enkele van testen in muizen.
4.3 Verfijning Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diermodel(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project. Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.	In dit onderzoek hebben we gekozen voor muizen. Hiermee hebben we veel ervaring en door het gebruik van verschillende soorten muizen kunnen we meer informatie uit het onderzoek halen dan met het gebruik van andere diersoorten. Tijdens de chronische ziekte zal de huisvesting van de dieren worden aangepast. In het geval van artritis bijvoorbeeld door de bedding in de kooi te verhogen en voer en water laag aan te bieden om belasting van de pootjes zo klein mogelijk te maken. Tevens zullen dieren regelmatig worden gecontroleerd op mate van ziekte en dieren die te veel last hebben van de ziekte volgens vooraf opgestelde normen zullen uit het experiment worden gehaald.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10800	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Universiteit Utrecht	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
	<i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>	1	In vitro kweek van [REDACTED] en analyse van fenotype en functie

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

In auto-immuun ziekten valt het immuunsysteem cellen van het lichaam zelf aan. De belangrijkste reden voor dit probleem is dat de regulatie van het immuunsysteem niet goed meer werkt. Om deze regulatie weer op orde te krijgen kunnen [REDACTED] worden gebruikt. Deze [REDACTED] cellen zijn in het lichaam van groot belang bij het herstellen van de regulatie en [REDACTED]. Eén van de mechanismen die de [REDACTED] kunnen gebruiken is het induceren van antigeen specifieke [REDACTED] cellen [REDACTED]. Op deze manier kunnen specifieke immuun responsen worden onderdrukt.

In het eerste deel zullen we verschillende in vitro kweek methoden om [REDACTED] te kweken met elkaar vergelijken. Hiertoe worden [REDACTED] precursors geïsoleerd uit naïeve muizen die worden gedood zonder voorafgaande handelingen en vervolgens worden de cellen gekweekt in vitro. De effectiviteit van de [REDACTED] in vitro zal uitgelezen worden met behulp van FACS, PCR en luminex, waarbij expressie van oppervlakte markers, productie van cytokines of [REDACTED] en gebruik van verschillende transcriptie factoren wordt beoordeeld. Daarnaast zal ook worden bestudeerd hoe effectief de [REDACTED] zijn in het induceren van [REDACTED] cellen. Dit zal worden getest via een co-culture van de [REDACTED] met [REDACTED] cel receptor transgene [REDACTED] cellen welke een bekende specificiteit hebben, zoals weergegeven in figuur [REDACTED] van de projectaanvraag. [REDACTED] cellen met een transgene [REDACTED] cel receptor worden geïsoleerd uit naïeve muizen specifiek voor de [REDACTED] cel receptor die gedood worden zonder voorafgaande handelingen. Daarnaast is er momenteel geen helder raamwerk bekend waaraan een veilige effectieve [REDACTED] moet voldoen, de zogeheten [REDACTED] vingerafdruk. Deze vingerafdruk zullen we in kaart brengen van de 2 meest effectieve kweek methoden, die het best [REDACTED] cellen induceren in vitro en tevens effectief zijn in vivo (getest in bijlage 2). Het in kaart brengen zal gebeuren door een uitgebreide analyse uit te

voeren met behulp van microarrays en RNA sequencing. Deze vraagstukken zullen beantwoord worden door middel van de experimenten zoals beschreven in deze bijlage.

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.

Alle dieren in dit deel van de projectaanvraag zullen zonder voorafgaande handelingen worden gedood en vervolgens zullen de lymfoïde organen gebruikt worden voor het isoleren van [REDACTED] voorloper cellen en [REDACTED] cellen.

Alle analyses zullen in vitro worden uitgevoerd.

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

Er is overwogen hoeveel dieren er nodig zijn om een aan te tonen effect te bewijzen (true difference of the means). De calculatie van de hoeveelheid dieren is gedaan met de software behandeld in de proefdiercursus (<http://www.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/>). De parameters zijn per primaire uitkomst parameter voor de power analyse zijn toegelicht hieronder.

B. De dieren

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

Voor deze experimenten zal als diersoort de muis (tussen 6-12 weken oud) gebruikt worden. In eerdere experimenten is gebleken dat het kweken van [REDACTED] van muizen van deze leeftijd het meest succesvol is en de hoogste opbrengst gegenereerd. Als donor muizen voor de [REDACTED] wordt gebruik gemaakt van veel gebruikte muizen stammen zoals Balb/c, C57BL of F1 van beide stammen. Deze dieren worden aangekocht van erkende proefdierleveranciers. Deze stammen worden gebruikt omdat op deze manier de data vergelijkbaar zijn met data uit de literatuur en omdat deze stammen ook gevoelig zijn voor de ontstekingsmodellen beschreven in bijlage 2. Zo wordt het proteoglycaan artritis model geïnduceerd in Balb/c en beide stammen zijn gevoelig voor dermatitis, maar met een hogere incidentie in C57BL model. De [REDACTED] receptor transgene muizen die hieronder besproken worden zijn afkomstig uit eigen fok. De muizen zijn transgeen voor een [REDACTED] cel receptor specifiek voor bijvoorbeeld proteoglycaan, [REDACTED] eiwit of ovalbumine, de [REDACTED] eiwitten voor de modellen die in bijlage 2 getest zullen worden.

Om [REDACTED] te kweken zijn [REDACTED] donoren nodig aangezien de [REDACTED] worden gekweekt.

In het project willen we maximaal 10 verschillende (reeds in de literatuur beschreven) [REDACTED] protocollen vergelijken³. Verschillende kweekmethoden geven verschillende type cellen, en van enkele in het verleden beschreven [REDACTED] kweekprotocollen is bekend dat deze profylactisch [REDACTED] zijn, maar niet functioneel [REDACTED] kunnen induceren tijdens ontsteking⁶. Juist dit laatste is cruciaal om effectief als [REDACTED] therapie ingezet te kunnen worden bij patiënten. Door meerdere protocollen en de verschillende cellen die tijdens de kweek ontstaan gedetailleerd te onderzoeken in vitro onder artificiële ontstekingscondities (toevoeging van o.a. ontstekingsmediatoren aan het kweekmedium) voor we deze in vivo testen willen we het aantal gebruikte dieren zoveel mogelijk beperken en alleen de meest veelbelovende cellen in vivo testen.

In het verleden is gebleken dat we voor het opzetten van een nieuwe kweek methode ongeveer 5 muizen nodig hebben als [REDACTED] donor ($5 \times 10 = 50$ muizen). Dit aantal is gebaseerd op de vergelijking van verschillende kweekmedia om de meest optimale cel aantallen na afloop van de kweek te verkrijgen, juist het kweken in aanwezigheid van [REDACTED] condities zorgt voor verminderde celopbrengsten (persoonlijke observatie). Naast het optimaliseren van de kweek condities is ook aantal cellen dat na afloop van de kweek beschikbaar is belangrijk voor analyse van oppervlakte markers, deze oppervlakte markers (bijvoorbeeld [REDACTED]) geven inzicht of de kweek daadwerkelijk [REDACTED] cellen heeft voortgebracht¹³.

Om voldoende [REDACTED] te kweken voor de analyse van de oppervlakte markers met behulp van FACS, cytokine productie en RNA met qPCR of [REDACTED] hebben we 5 donor dieren nodig. Dit is op basis van cel opbrengsten zoals we die in het verleden bepaald hebben binnen onze vakgroep na het kweken van [REDACTED] in aanwezigheid van [REDACTED]. Het mogelijk is dat niet alle kweekmethoden een zelfde hoeveelheid cellen zullen opleveren maar dit is vooraf niet met zekerheid vast te stellen.

Door ervaring uit eerdere experimenten met dergelijke parameters als cytokine productie en qPCR resultaten gaan we uit van een variatie (sigma (standaarddeviatie) tweezijdig) in uitkomst tussen de experimentele groepen van minimaal 30%. De power wordt vastgesteld op 90% om de kans op een type II fout te verkleinen, dit gezien de variatie.

Het aan te tonen effect (true difference of means, effect size) tussen de testgroepen wat we willen bereiken is 50%. Het betrouwbaarheidsinterval (alfa) wordt gesteld op 5% omdat we in deze experimenten voornamelijk geïnteresseerd zijn in het effect ten opzichte van de controle en niet tussen de groepen onderling. Wanneer we deze gegevens invullen in de software behandeld in de proefdierkunde cursus (<http://www.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/>) geeft dit dat we per analyse 9 experimentele eenheden moeten gebruiken. ($9 \times 5 \times 10 = 450$ muizen)

Maximaal 2 meest veelbelovende kweekprotocollen zullen vervolgens worden getest in vivo in deel 2. Voor het transfereren van [REDACTED] met verschillende doses en frequenties zoals beschreven in deel 2 zullen gemiddeld [REDACTED] per ontvanger muis worden door gespoten. Uit een donor muis kunnen we ongeveer [REDACTED] kweken dus dit komt neer op 10 ontvanger dieren per donor en voor de 1176 ontvanger dieren in deel 2 betekend dit dus **118** muizen in totaal.

Ook zal van deze 2 methoden een microarray of een RNAseq analyse worden uitgevoerd op de [REDACTED] om een gedetailleerd beeld te krijgen van de genen die specifiek zijn voor [REDACTED]. Om voldoende RNA te verkrijgen voor de microarray analyse van de meest effectieve [REDACTED] (en de benodigde positieve en negatieve controles) zijn [REDACTED] cellen nodig van minimaal 3 afzonderlijke kweken. Het aantal cellen is gebaseerd op de benodigde hoeveelheid RNA die uit de cellen geïsoleerd kan worden voor de analyse en de kwaliteitscontrole vooraf. De resultaten van drie afzonderlijke kweken worden vergeleken om de uniformiteit en reproduceerbaarheid van de resultaten te bevestigen. Zonder de analyse van 3 afzonderlijke kweken kunnen de resultaten het gevolg zijn van variatie tussen de kweken en niet specifiek voor de vingerafdruk van de [REDACTED].

Inclusief alle controles (met en zonder [REDACTED] protocol, met en zonder pro-inflammatoire cytokines, met en zonder maturatie en negatieve controle) zijn dit 7 condities. In totaal zijn hiervoor dus 6 dieren nodig per conditie dus **12** dieren in totaal.

Naast donoren voor het kweken van de [REDACTED] zijn ook donor dieren nodig om de effectiviteit van de [REDACTED] te analyseren op basis van [REDACTED]. Hiervoor zullen we [REDACTED] muizen gebruikt worden. Uit eerdere experimenten is gebleken dat uit 1 donor muis ongeveer [REDACTED] geïsoleerd kunnen worden. Om het effect van [REDACTED] cellen te onderzoeken zullen we [REDACTED] cellen samen kweken met verschillende [REDACTED] en vervolgens analyseren op oppervlakte markers, cytokines en expressie van transcriptie factoren. Op basis van eerdere experimenten weten we dat voor deze analyses ongeveer [REDACTED] cellen nodig zijn per conditie (= 3 donoren). Het aantal condities dat we willen testen zijn de 10 verschillende [REDACTED] kweek protocollen in aan- of afwezigheid van proinflammatoire cytokines (om ontsteking na te bootsen in vitro), in aanwezigheid van enkele [REDACTED] liganden (om verschillende infecties na te bootsen) en in aanwezigheid van [REDACTED] (een gemodificeerd [REDACTED] ligand) zoals dit ook bij humane [REDACTED] wordt gebruikt voordat de cellen ingespoten worden bij de patiënten^(3,4).

In totaal komt dit dus neer op 5 verschillende condities * [REDACTED] protocollen * [REDACTED] cel donoren = **150** [REDACTED] donor muizen.

Aantal dieren:

Opzet: 50

Analyse oppervlakte markers etc.: $10 \times 5 \times 9 = 450$

[REDACTED] in vivo: 118

Microarray: 12 muizen

[REDACTED] donoren: $5 \times 10 \times 3 = 150$

Totaal aan tal dieren:

WT: 630 muizen

Tg: 150 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 welk keuzes daarbij zijn gemaakt.

Door alle verschillende [REDACTED] kweekmethoden uit te testen in vitro en te kijken of de [REDACTED] onder deze condities [REDACTED] cellen kunnen induceren kunnen we het aantal verschillende [REDACTED] dat we in vivo zullen testen in modellen voor chronische ontsteking verminderen.

Het gebruik van een [REDACTED] cellijn is niet mogelijk. [REDACTED] cellijnen zijn zogenaamde 'end-stage' cellen en de bekende cellijnen ([REDACTED]) zijn allen representatief voor proinflammatoire [REDACTED] zoals die in de milt van de muis gevonden niet representatief voor [REDACTED]

Voor de muis zijn bij ons geen antigeen specifieke [REDACTED] cellijnen bekend die kunnen differentiëren tot [REDACTED] cellen, omdat deze cellen niet naïef zijn. Het gebruik van [REDACTED] cel hybridoma's is ook niet wenselijk omdat we dan alleen [REDACTED] cel activatie kunnen analyseren en geen inductie van [REDACTED] cellen of effectiviteit van een [REDACTED] cel.

In deze dierproef kiezen we muizen stammen die relevant zijn in het verdere onderzoek als ook het gebruik van [REDACTED] muizen om in meer detail het effect op [REDACTED] cel differentiatie te kunnen bekijken. Vanwege de complexiteit van de immuunrespons is het niet mogelijk dit te vervangen door bijvoorbeeld computer modellen. In alle gevallen zal eerst gedegen literatuur onderzoek gedaan worden om de meest veelbelovende [REDACTED] protocollen te selecteren.

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.

Alle dieren zullen zonder voorafgaande handelingen gedood worden volgens de geldende richtlijnen. De dieren zullen in groepen worden gehuisvest conform geldende normen van huisvesting en kooiverrijking.

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

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Er worden geen andere vormen van welzijnsaantasting voorzien.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

n.v.t.

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

n.v.t.

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?

X 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.

Het ongerief van alle dieren in dit deel worden geclassificeerd als licht. Alle dieren gebruikt in deze dierproef worden zonder handelingen gedood en bij fok van XXXXXXXXXX receptor transgene muizen die in deze bijlage beschreven zijn geen klinische verschijnselen bekend of beschreven.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

☐ Nee

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

Het doden van de dieren is noodzakelijk om donor cellen te verzamelen voor het uitvoeren van de experimenten zoals beschreven

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

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

☒ Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10800	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Universiteit Utrecht	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
	<i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>	2	███ therapie in chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

In dit deel van het project zal gekeken worden naar de effectiviteit van ███ als gekweekt onder deel 1 in het onderdrukken van een chronische ontsteking met de nadruk op het therapeutisch effectiviteit. In de literatuur zijn meerdere experimenten beschreven waarin gekeken is naar het effect van ███ therapie om chronisch ontstekingen voorkomen, maar nog weinig data is beschikbaar over het onderdrukken **tijdens** de ziekte. In dit deel zullen we kijken wat het ideale behandel protocol is van een chronisch ontsteking zoals artritis, met behulp van het proteoglycaan geïnduceerde artritis model^{0.a. 6, 8, 9, 11, 12}. Dit is een chronisch model waarbij het ziekte verloop intermitterend en relatief mild verloopt, vergelijkbaar als bij de mens. We hebben gekozen voor dit chronische model om juist het effect tijdens chronische ontsteking van ███ therapie te onderzoeken. Daarnaast hebben ███ met dit relatief lichte model.

Tevens zullen we in dit model ook het mechanisme onderzoeken met behulp van ███ muizen specifiek voor het ziekte inducerend antigeen, ███. Door zowel de effector ███ cellen (die de ziekte veroorzaken) als naïeve ███ cellen te labelen met een zogeheten 'vital dye' kunnen we deze cellen terug vinden in het dieren en met behulp van o.a. FACS analyse bepalen hoe de cellen beïnvloed zijn door de tolDC therapie. Op deze manier kunnen we beoordelen of ███ ook in vivo ███ cellen ███ specifiek kunnen induceren.

Om ███ cellen te induceren zullen we gebruik maken van peptiden die ███ kunnen induceren. Hierbij zullen we een ███ peptide gebruiken, waarvan bekend is dat het ziekte geïnduceerd tegen ███ kan voorkomen⁸. Maar ook een eerder door ███ peptide het ███ peptide. Dit ███ peptide kan antigeen specifieke ███ celen induceren in het proteoglycaan geïnduceerde artritis muis model onafhankelijk van het ziekte inducerend antigeen¹². De hypothese is dat dit ███ cellen induceert tegen verschillende

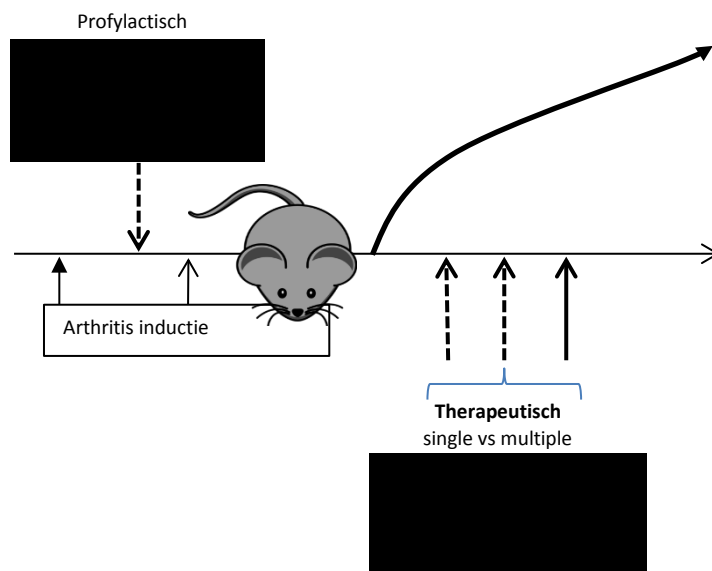
chronische ontstekingen. Initiële experimenten in transplantatie modellen in de muis laten inderdaad [] cel gemedieerde bescherming zien []). Juist dit aspect van [] therapie in combinatie met een peptide dat [] cellen induceert in verschillende chronische ontstekingsziekten zou van grote meerwaarde zijn voor het ontwikkelen van [] therapie voor humane patiënten. Om te onderzoeken of de hypothese correct is willen we 1 type [] in 1 dosering die effectief is gebleken in het artritis model testen in andere ontstekingen modellen. Aangezien artritis een overwegend Th1 type ontsteking is hebben we gekozen om een chronisch (auto-immuun) ontstekingen model te nemen met een ander type ontsteking, het dermatitis model. Dermatitis een meer gemengde Th2 ontsteking, door juist duidelijk verschillende typen ontsteking te kiezen kunnen deze experimenten de vraag beantwoorden of [] therapie voor meerdere chronische ontstekingen gebruikt kan worden in de toekomst. Als derde model willen we de mogelijke translatie naar de humane patiënt beter in kaart brengen en hiervoor hebben we gekozen voor een zogeheten gehumaniseerd muis model. In dit wordt gebruik gemaakt van een [] muis waarin humane immuuncellen worden getransplanteerd om deze muis een humaan immuunsysteem te geven en vervolgens te kijken naar een transplantatie afstotingen. Ook in dit model is de ontsteking overwegend een Th1 type ontsteking. De [] therapie zal alleen in de laatste 2 genoemde modellen getest worden als blijkt dat deze effectief is in het onderdrukken van de ziekte in het artritis model.

In deel 2 zullen we de volgende vragen beantwoorden:

2a: Welke, dosis, frequentie, route, en timing van [] therapie is het meest efficiënt in het onderdrukken van chronisch ziekte. Als referentie zullen we een eenmalige profylactische (voor ziekte inductie) voor de toediening van [] nemen als vergelijking.

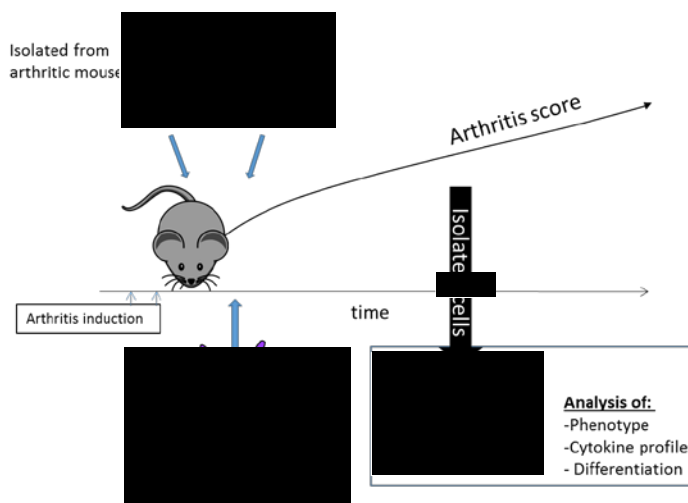
2b: Is [] therapie in staat om in vivo [] cellen te induceren en effector [] cellen te onderdrukken?

2c: werkt [] therapie ook in andere chronisch ontstekingsmodellen?



Figuur 1: [] worden op verschillende tijdstippen en in verschillende doses door gespoten.

Profylactisch zal slechts 1 dosis gekozen worden voordat de dieren ziekte ontwikkelen. Therapeutische toediening bij andere dieren zal starten zodra de eerste ziekte verschijnselen zichtbaar zijn, ongeveer een week na de 2^e immunisatie. Vervolgens zal het effect op artritis verloop worden beoordeeld door de dieren meerdere keren per week te beoordelen op artritis verschijnselen.



Figuur 2: Artritis wordt geïnduceerd door 2 injecties met humaan proteoglycaan in met adjuvans DDA. Vervolgens worden [redacted] cel receptor [redacted] cellen uit verschillende muizen gelabeld met verschillende "Vital Dyes" en door gespoten net als de [redacted]. Door proteoglycaan [redacted] cellen door te spuiten kan het effect op [redacted] cellen worden geanalyseerd en de [redacted] cellen geven een beeld van de [redacted] cellen.

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.

- Het artritis model:
- Proteoglycaan geïnduceerde artritis (PGIA) zal geïnduceerd worden met 2 injecties van proteoglycaan uit kraakbeen in DDA. Hiervoor zullen vrouwelijke dieren gebruikt worden op een balb/c achtergrond. Deze dieren hebben een hogere gevoeligheid voor het ontwikkelen van artritis waardoor een hogere incidentie wordt gehaald, minder injecties en minder dieren nodig zijn ¹⁸.
- De twee injecties worden i.p. toegediend met een tussen periode van 21 dagen. Vervolgens worden de dieren 2x per week bekeken op de ontwikkeling van artritis verschijnselen (roodheid en zwelling van de pootjes). Indien de dieren artritis krijgen wordt het klinisch onderzoek geïntensiveerd afhankelijk van de ernst van het verloop.
- Tijdens artritis zal bloed afgenomen worden doormiddel van een wang prik, waarbij maximaal 100 ul er muis wordt afgenomen en maximaal 1 x per 3 weken.

Dieren die behandeld worden met [redacted] therapie zullen tussen de 1 en maximaal 5 injecties krijgen afhankelijk van welke experimentele groep de dieren zitten . Deze injecties met tussen de [redacted] (zoals bij de mens in de [redacted]) gegeven worden. Voor profylactische controle behandeling zullen dieren eenmalig ongeveer [redacted] krijgen vlak voor de 2^e immunisatie voor artritis inductie.

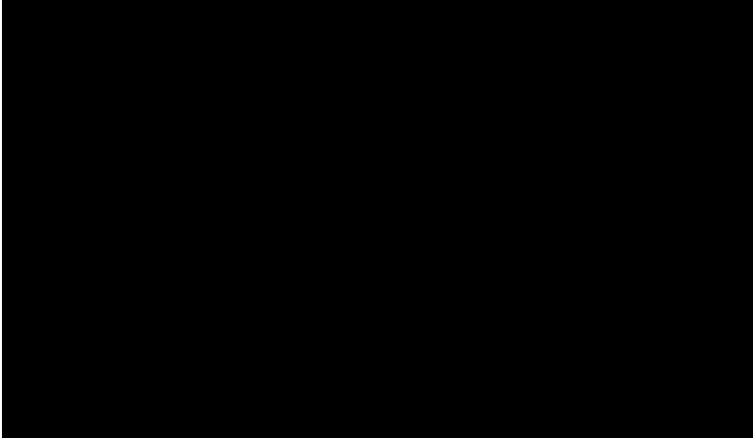
Dieren uit deel 2b waarbij het effect op [redacted] cellen wordt bekeken zullen een dag voor de [redacted] therapie [redacted] cellen gelabeld met een vital dye i.v. krijgen toegediend. In deze experimenten zullen alleen effectieve routes en een eenmalige toediening van [redacted] gebruikt worden.

In het laatste deel zal gekeken worden naar de effectiviteit van [redacted] therapie in andere modellen voor chronische ontsteking. Hierbij zal 1 dosis [redacted] gekozen worden die effectief was in artritis (deel 2a) en met een zo laag mogelijk frequentie van doorspuiten. Ook in de andere modellen van chronische ontsteking zal het ziekte verloop op meerdere dagen per week worden vervolgd (minimaal 2x per week).

De andere modellen voor chronische ontsteking waar mee gewerkt zal worden zijn een [redacted] model en atopische dermatitis.

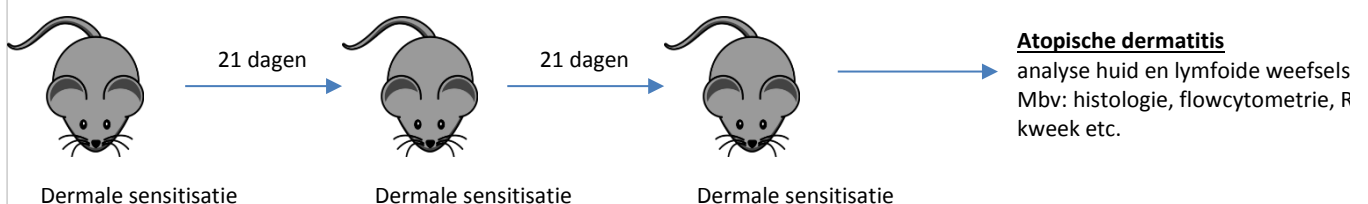
Het [redacted] model wordt uitgevoerd in samenwerking met de universiteit Nijmegen waar het

model ontwikkeld is. In dit model wordt op een immunodeficiënte muis onder narcose. Na 3 weken als de graft geaccepteerd is worden humane cellen toegespoten en op dat moment zal ontsteking ontstaan in het transplantaat. Vervolgens zal de therapie worden ingezet door door te spuiten (in dit geval natuurlijk humane). Deze dieren worden vervolgens regelmatig (tot zelfs dagelijks) beoordeeld op afstoting van de huid. Na 3 weken zal de huid en de lymfoïde organen van de dieren geïsoleerd worden en beoordeeld op ontsteking, infiltraat en functionele differentiatie van de T cellen zoals te meten aan cytokine productie en transcriptie factor gebruik.



Figuur 3: Schematische weergave van het model. wordt onder narcose op een muis. Na 3 weken is de graft geaccepteerd en wordt een in de muis gebracht door het bloed cellen van een bloeddonor. Gedurende 3 weken wordt gekeken naar het ontwikkelen van ontsteking. Na 3 weken worden de en de lymfoïde organen geïsoleerd en de en immuunrespons geanalyseerd met behulp van flowcytometrie en histologie.

Het tweede model is een dermatitis model, hiervoor is gekozen omdat het hier een gemengde Th2/Th1 gemedieerde response betreft en bij artritis of transplantatie met name een Th1/Th17 response en dit zal laten zien of therapie breed inzetbaar is bij een disbalans van het immuunsysteem. In dit model wordt de ziekte geïnduceerd met 2 tot 3 dermale sensitisaties met het allergeen in adjuvans met 3 weken tussen tijd. Na afloop wordt de huid geanalyseerd op infiltratie van ontstekingscellen en worden de lymfoïde organen geïsoleerd om de inductie van cellen te analyseren tegen het allergeen met o.a. kweek en flowcytometrie¹⁶. De therapie zal worden toegediend tussen de 2^e en de 3^e.



Figuur 4: schematische weergave van het dermatitis model.

Muizen worden geschoren onder anesthesie en dermaal gesensitiseerd. Sensitisatie wordt 3 maal herhaald met tussenpozen van 3 weken en vervolgens worden huid en lymfoïde organen geïsoleerd voor analyse op ontwikkelen van celen en huidontsteking.

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

Er is overwogen hoeveel dieren er nodig zijn om een aan te tonen effect te bewijzen (true difference of the means). De calculatie van de hoeveelheid dieren is gedaan met de software behandeld in de proefdiercursus (<http://www.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/>). De aannames en vergelijkingen zijn onder B nader

toegelicht.

B. De dieren

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

In dit deel van het project zal gebruik gemaakt worden van muizen afkomstig van commerciële proefdierleveranciers of vanuit eigen fok indien het specifieke transgene muizen betreft. In alle gevallen zullen volwassen dieren van beide sexen gebruikt worden waarbij in het algemeen dieren tussen de 6-12 weken aangekocht zullen worden, omdat in deze dieren het immuunsysteem volledig ontwikkeld is. Alleen in het geval van artritis inductie zal gekozen worden voor muizen van meer dan >16 weken oud en bij voorkeur gepensioneerde fokvrouwen, omdat deze de hoogste gevoeligheid hebben voor het ontwikkelen van artritis¹⁸.

Aantallen deel 2a:

In dit deel willen we maximaal 3 verschillende doses, maximaal 3 verschillende frequenties (1x, 3x of 5x), meerdere routes (maximaal 3) testen als therapeutische mogelijkheden en dat vergelijken met een enkele profylactische dosis. Er is gekozen voor verschillende doses en verschillende frequentie om te kijken of hoger of herhaaldelijk doseren de effectiviteit kan verhogen. In de literatuur zijn meerdere routes beschreven voor het toedienen van celtherapie, het is echter nog niet bekend of het effect van celtherapie afhankelijk is van de route van toedienen.

Hierbij willen we 2 typen [] die in bijlage 1 effectief [] cellen induceerde in vitro testen op effectiviteit om in vivo [] cellen te induceren en chronische ontsteking te onderdrukken.

Om de effectiviteit te bepalen worden [] vergeleken met conventionele [] in aan- en afwezigheid van het ziekte inducerend antigeen [] of een anti-inflammatoir antigeen (zoals [] eiwit). Om [] te matureren en stabiliseren wordt in de literatuur gebruik gemaakt van een non-toxisch [] ligand [] ter controle zullen de [] ook behandeld worden met dit humaan [] ligand, hiermee beantwoorden we de vraag of dit inderdaad de effectiviteit en stabiliteit in vivo verhoogd..

Groepen:

1. conventionele [] met antigeen
2. conventionele [] zonder antigeen
3. [] 1 met antigeen
4. [] 2 met antigeen
5. [] 1 met [] en antigeen
6. [] 2 [] en antigeen

Per toedieningsroute zullen deze 6 testgroepen met elkaar vergeleken worden. In dit geval is groep 1 de referentie populatie die beschreven is als effectieve profylactische toediening van [] conventionele [] en groep 2 een negatieve controle.

In totaal zijn dit dus $3 \times 3 \times 3 = 27$ therapie verschillende manieren van toedienen voor de 6 test groepen. In de analyse willen we groep 3 statistisch vergelijken met groep 1,2 en 5 en groep 4 met groep 1,2 en 6. Op deze manier analyseren we het effect van 2 [] groepen afzonderlijk en niet direct met elkaar op deze manier zijn minder dieren nodig per analyse. De vergelijking tussen de groepen op basis van effectiviteit om [] cellen te induceren zal in deel 2b bepaald worden.

Door ervaring uit eerdere experimenten gaan we uit van een standaarddeviatie (sigma, tweezijdig) in artritis score van minimaal 30%. De power wordt vastgesteld op 90% om de kans op een type II fout te verkleinen, dit gezien de variatie. Het aan te tonen effect (true difference of means) tussen de testgroepen wat we willen bereiken is 50%. Omdat we 3 vergelijkingen willen maken hebben we een Bonferoni correctie toegepast op de alfa, waardoor we een alfa van 0.017 verkrijgen. Wanneer we deze gegevens invullen in de software behandeld in de proefdierkunde cursus (<http://www.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/>) geeft dit dat we per analyse 11 dieren nodig hebben.

In totaal zou dat voor dit deel $11 \times 6 \times 27 = 1782$ acceptor muizen

Aantallen deel 2b:

In dit deel willen we de effectiviteit van de in bijlage 1 geselecteerde [] beoordelen om in vivo

█ cellen te induceren tijdens ziekte.

Hier kiezen we voor een eenmalige toediening van de █ om de timing van █ cel activatie met zekerheid vast te kunnen stellen. Na transfer van █ cellen zullen maximaal 2 routes van █ worden geanalyseerd en zal de █ injectie op maximaal 3 verschillende tijdstippen gegeven worden. De keuze voor de routes zal gemaakt worden op basis van de resultaten uit deel 2a, hierbij zullen 2 effectieve routes geselecteerd worden. De verschillende tijdstippen zijn om te kijken of █ therapie meer █ cellen induceert wanneer deze vroeg in het ziekte verloop wordt gegeven ten opzichte van op latere tijdstippen. Het is de hypothese dat vroeg behandelen van patiënten net na ontwikkelen van de ziekte effectiever is dan later, deze hypothese kunnen we in dit experiment testen.

De derde vraag die we in dit deel willen beantwoorden is of een ziekte inducerend antigeen vergelijkbare █ cellen induceert als een █ antigeen zoals █ en we zullen deze direct met elkaar vergelijken.

Test groepen:

1. Conventionele █ met antigeen 1
2. Conventionele █ met antigeen 2
3. conventionele █ zonder antigeen (negatieve controle)
4. █ 1 met antigeen 1
5. █ 1 met antigeen 2
6. █ 2 met antigeen 1
7. █ met antigeen 2
8. █ met █ en antigeen
9. █ met █ en antigeen

In totaal hebben we hier dus 9 testgroepen, waarbij we 2 routes vergelijken en 3 tijdstippen van █ therapie. Voor het bepalen van de groepsgrootte gelden dezelfde aannames als in het vorige deel, met als verschil dat we in dit experiment meerdere vergelijkingen hebben. Hier willen we zowel de █ met █ met elkaar vergelijken en betreft het 5 vergelijkingen, bijvoorbeeld groep 4 vergelijken we met groep 1,3,5,6 en 8. En groep 6 vergelijken we met groep 2,3,4,7 en 9.

Door ervaring uit eerdere experimenten gaan we uit van een standaarddeviatie (sigma, tweezijdig) in artritis score van minimaal 30%. De power wordt vastgesteld op 90% om de kans op een type II fout te verkleinen, dit gezien de variatie. Het aan te tonen effect (true difference of means) tussen de testgroepen wat we willen bereiken is 50%. Omdat we 5 vergelijkingen willen maken hebben we een Bonferoni correctie toegepast op de alfa, waardoor we een alfa van 0.01 verkrijgen. Wanneer we deze gegevens invullen in de software behandeld in de proefdierkunde cursus (<http://www.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/>) geeft dit dat we per analyse 12 dieren nodig hebben.

Dit geeft dus $12 \times 9 \times 2 \times 3 = 648$ acceptor dieren

Deze dieren ontvangen ook █ cellen naast de █ therapie. Hiervoor zullen we █ cel receptor █ muizen gebruikt worden. Uit eerdere experimenten is gebleken dat uit 1 donor muis ongeveer █ █ cellen geïsoleerd kunnen worden. Dus om █ cellen te kunnen doorspuiten hebben we 2 donor muizen nog. Dit geeft dus $648 \times 2 = 1296$ donor dieren die gedood worden zonder voorafgaande handelingen.

Aantallen voor deel 2c:

In dit deel willen we aantonen dat █ therapie ook effectief is in andere chronische ontstekingen waar een ander type ontsteking aan ten grondslag ligt. In dit geval is gekozen voor een atopische dermatitis model omdat dit een meer Th2/Th1 type ontsteking is en artritis een Th17/Th1 type.

Groepen:

1. Conventionele █ met antigeen
2. conventionele █ zonder antigeen
3. █ 1 met antigeen
4. █ 2 met antigeen
5. █ 1 met █ en antigeen
6. █ 2 █ en antigeen

In dit deel zullen we slechts 2 therapie schema's testen die effectief [REDACTED] induceren in het artritis model. In het dermatitis model gaan we uit van een standaard deviatie (sigma, tweezijdig) in ziekte score van minimaal 25%. De power wordt vastgesteld op 90% om de kans op een type II fout te verkleinen, dit gezien de variatie. Het aan te tonen effect (true difference of means) tussen de testgroepen wat we willen bereiken is 50%. Omdat we 3 vergelijkingen willen maken hebben we een Bonferoni correctie toegepast op de alfa, waardoor we een alfa van 0.017 verkrijgen. Wanneer we deze gegevens invullen in de software behandeld in de proefdierkunde cursus (<http://www.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/>) geeft dit dat we per analyse 8 dieren nodig hebben.

In totaal betreft het dan $8 \times 6 \times 2 = 96$ dieren

Om een translationele stap te kunnen maken is het essentieel om aan te tonen dat [REDACTED] therapie ook in het humane immuunsysteem in staat is [REDACTED] cellen te induceren. Hiertoe willen we gebruik maken van een muis transplantatie model, waarbij in immuundeficiënte muizen humane immuun cellen worden ingespoten samen met de [REDACTED] injectie.

Voor het humane transplantatie model is bekend dat de variatie rond de 20% ligt, de power wordt gesteld op 90% om de kans op een type II fout te verkleinen en het at te tonen verschil houden we op 50%. Bij een alfa van 0.017 door de bonferoni correctie, geeft dit een groeps grootte van 7 dieren per groep.

Groepen:

1. Conventionele [REDACTED] met antigeen
2. Geen celtherapie
3. [REDACTED] 1 met antigeen
4. [REDACTED] 2 met antigeen
5. [REDACTED] 1 met [REDACTED] en antigeen
6. [REDACTED] 2 [REDACTED] en antigeen

In deze proeven willen we de therapie van [REDACTED] met [REDACTED] vergelijken met [REDACTED] en een negatieve controle groep zonder therapie.

Omdat het hier experimenten betreft die afhankelijk zijn van humane donoren speelt ook donor variatie mee in de uitkomst van het experiment. Om eventuele donor variatie te kunnen beoordelen zal het experiment 3 maal uitgevoerd worden met 3 afzonderlijke donoren.

In totaal betreft het dan $6 \times 7 \times 3 = 126$ muizen

In totaal voor deel 2:

Donor dieren: 1296

Artritis dieren: $1782 + 594 = 2376$

Overige ontstekingsmodellen: $96 + 127 = 223$

Totaal: **3895**

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☐ Nee, ga door met vraag D.

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

Indien surplus dieren beschikbaar zijn van de juiste leeftijd en achtergrond is hergebruik van dieren te overwegen. Het is echter van belang dat dieren niet eerder zijn gebruikt voor studies waarbij het immuunsysteem gemanipuleerd is omdat dit de uitkomst kan beïnvloeden

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

☐ Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

De vraagstelling vereist de bestudering van de immuunrespons in vivo, namelijk kunnen [REDACTED] [REDACTED] Wat is de meest effectieve therapie voor wat betreft dosering, frequentie van toediening of de timing tijdens het ziekte verloop voor een [REDACTED] therapie? Vanwege de complexiteit van de immuunrespons is het niet mogelijk dit te vervangen door bijvoorbeeld computer modellen. Waar mogelijk worden wel eerst in vitro experimenten uitgevoerd voordat er wordt getest in muizen en met materiaal afkomstig uit deze dieren worden in vitro tests gedaan om zo de resultaten beter te kunnen interpreteren. Dit is gebaseerd op experimenten beschreven in de literatuur en ervaring binnen onze groep met diermodellen en de te analyseren parameters.

In het laatste deel wordt alleen gekeken naar het effect van op dat moment reeds bewezen therapeutisch toepassing van [REDACTED] in diermodellen voor chronische ontsteking waarmee ervaring is op gedaan door partners waarmee direct wordt samengewerkt of ervaring mee is binnen de eigen onderzoeksgroep.

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.

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 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.

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

☒ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Artritis inductie en de ontwikkeling van ontsteking bij dermatitis en transplantatie geven ongerief bij de dieren. Echter het toepassen van pijnstillers bij deze dieren zal het immuunsysteem beïnvloeden¹⁹. Het is bekend dat NSAIDs de ontstekingsreactie direct beïnvloeden en daarmee het ziekte model nadelig beïnvloeden. Maar ook het gebruik van opioïden kan de immuunreactie beïnvloeden. Buprenorfine wordt vaak beschreven als een veilig alternatief met weinig effect op het immuunsysteem, echter ook buprenorfine kan de inductie van artritis nadelig beïnvloeden in sommige modellen, aangezien voor de modellen die gebruikt worden in deze aanvraag het effect van buprenorfine niet voldoende onderzocht is zal dit niet worden toegepast. Aangezien immunologische parameters bepalen zijn voor de uitkomsten van het onderzoek is het in deze dieren net mogelijk pijnstilling toe te passen.

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

In het geval van het transplantatie model zal het transplanteren van de huid onder algehele anaesthesie plaatsvinden met passende analgesie.

In het dermatitis model zullen de dieren onder gas anesthesie worden geschoren en gesensitiseerd.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

1. Het ontwikkelen van dermatitis en transplantatie reactie zal aanleiding zijn voor het ontwikkelen van ongerief. Het ontwikkelen van anafylactische reacties in het dermatitis model zijn niet beschreven.
2. Handeling van de dieren meerdere malen per week ten behoeven van artritis score.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

1. Ontsteking van de huid geeft irritatie en mogelijk jeuk.
2. Handeling geeft stress, echter het mogelijk ongerief van de artritis maakt vaker hanteren van de dieren noodzakelijk

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

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.

Voor de artritis score geldt een maximum score van 16 per dier. Ieder poot kan een score van 4 punten halen. Score 1 matige roodheid en zwelling aan 1 teen of de poot. Score 2 roodheid en zwelling aan de poot of aan maximaal 2 tenen. Score 3: roodheid en zwelling aan de poot en maximaal 3 tenen of milde zwelling van de poot en maximaal 4 tenen. Score 4: roodheid en zwelling aan zowel de poot als 4 tenen. Een score van 12 wordt beschouwd als een humaan eindpunt.

Voor het transplantatie model wordt als humaan eindpunt necrose ten gevolge van afstoting van het transplantaat aangehouden.

Voor het dermatitis model wordt gekeken naar het ontwikkelen van dermatitis, duidelijke jeuk (continue krabben) en het openkrabben van de huid worden aangehouden als humaan eindpunt. Het dermatitis model is een progressief model en bij het ontwikkelen van jeuk zal deze niet verdwijnen, om de ontwikkeling van mogelijke secundaire infecties ten gevolge van krablaesies aan de huid te voorkomen beschouwen we de ontwikkeling van chronische jeuk als HEP.

Naast model specifieke humane eindpunten wordt ook gekeken naar algemeen welbevinden van de dieren, op basis duidelijke veranderingen in uiterlijk, gewicht of gedrag zullen de dieren worden geuthenaseerd. Hierbij wordt gelet op bol zitten, roodheid rond de ogen en lusteloosheid voor een periode van > 24 uur

wordt beschouwd als humaan eindpunt. In het geval van een indicatie van gewichtsverlies worden de dieren gewogen en bij >15% gewichtsverlies in 2 dagen is het HEP bereikt.
Welk percentage van de dieren loopt kans deze criteria te halen?
In het geval van artritis en transplantatie is het te verwachten aantal dieren dat het HEP bereikt ongeveer 10%
In het geval van dermatitis is het ontwikkelen van de ziekte gelijk aan het bereiken van het HEP in dit geval zal tussen de 25 en maximaal 70% van de dieren het HEP bereiken (afhankelijk van de effectiviteit van de therapie).
Voor donor dieren is niet te verwachten dat het HEP bereikt wordt.
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.
Donor dieren : licht ongerief
Het ongerief van de experimentele dieren is afhankelijk van de effectiviteit van de therapie. Voor de inschatting gaan we ervan uit dat slechts de helft van de therapie effectief zal zijn om zo het ongerief niet te onderschatten.
Artritis model: 25% licht, 75% van de dieren zullen tot maximaal matig ongerief hebben
Dermatitis model: 56% licht ongerief en in maximaal 44% van de dieren tot matig ongerief
Transplantatie model: 40% licht ongerief en 60% tot matig ongerief

Einde experiment

L. Wijze van doden
Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?
☐ Nee
☒ Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.
Na afloop van het experiment worden de immuun relevante organen geïsoleerd uit de dieren voor verder analyses.
Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?
☐ Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.
☒ Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10800	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Universiteit Utrecht	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
	<i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>	3	Ontwikkelen van een [REDACTED] vaccin voor chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

In dit deel van het project zal gekeken worden naar de effectiviteit van een therapeutisch vaccin bij chronische ziekten. In dit deel zullen de initiële experimenten ook weer gedaan worden in het proteoglycaan geïnduceerde arthritis model waarmee veel ervaring is (een typisch Th17/Th1 model) en zal in het vervolg ook gekeken worden naar de effectiviteit van een dergelijk [REDACTED] vaccin in een model voor dermatitis (een typisch Th2/Th1 model).

Om [REDACTED] cellen te induceren zijn verschillende methoden beschreven in de literatuur. Zo is het mucosaal immuunsysteem bekend om zijn [REDACTED] inducerende capaciteit in een profylactische setting. Recent zijn er meerdere aanwijzingen in de literatuur beschreven dat ook dermale toediening een goede route is om [REDACTED] cellen te krijgen. In dit deel van het project willen we ons voornamelijk richten op of we via de meest veelbelovende routes ([REDACTED]) [REDACTED] cellen kunnen induceren tijdens de aanwezigheid van een ontsteking, zoals bijvoorbeeld arthritis of dermatitis.

Door gebruik te maken van een [REDACTED] cel transfer model kunnen we het effect van de vaccinatie op [REDACTED] cel differentiatie in detail volgen. Daarnaast zullen we gebruik maken van een eerder [REDACTED] geïdentificeerd peptide: het [REDACTED] peptide. Dit peptide kan [REDACTED] celen induceren in het [REDACTED] geïnduceerde arthritis muis model [REDACTED] en mogelijk ook in andere ontstekingsziekten.

In deel 3 zullen we de volgende vragen beantwoorden:

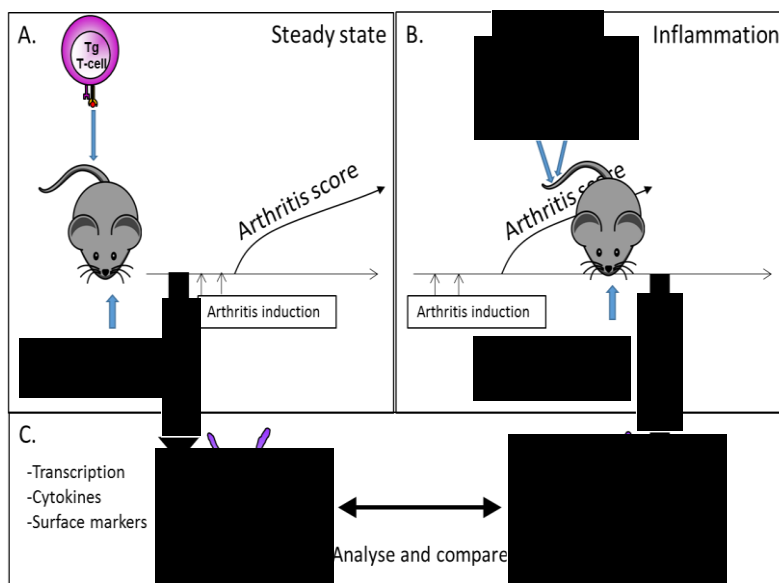
3a: is het mogelijk een chronische ontsteking te onderdrukken met een therapeutisch peptide vaccin met een tolerogeen adjuvans. Om deze vraag te beantwoorden zullen we verschillende adjuvantia testen. In ieder geval zullen we verschillende [REDACTED] onderzoeken omdat we eerder hebben aangetoond dat bijvoorbeeld PLGA nano-partikles tolerogene markers opreguleren in vitro in [REDACTED]. Maar ook [REDACTED] liganden en gemodificeerde [REDACTED] liganden worden in de literatuur aangewezen als potentiële [REDACTED]

adjuvantia

Om het effect van de vaccinatie in vivo te beoordelen zullen we hierbij gebruik maken van adoptieve transfer modellen waarin we cellen gelabeld met een vita dye doorspuiten en aan het eind van het experiment hun differentiatie en lokalisatie de muis kunnen beoordelen met behulp van FACS analyse.

De dieren zullen voor het ontwikkelen van ziekte gevaccineerd worden om de steady state vaccinatie te beoordelen en na induceren van de ziekte (na de laatste immunisatie) om de therapeutische effectiviteit vast te stellen.

3b. De andere belangrijke vraag die wil in dit deel van het project willen beantwoorden is wat is er anders is aan de in vivo tijdens steady state en chronische ontsteking. In veel modellen is het goed mogelijk een profylactisch vaccinatie toe te passen door bijvoorbeeld gebruik te maken van inductie. Echter tijdens ontsteking is dit veel minder effectief. Om deze verschillen in kaart te brengen willen we kijken welke een rol spelen tijdens inductie door een vaccinatie te geven in conditionele knock-out muizen waarin we specifieke subset kunnen uitschakelen met behulp van). Daarnaast zullen we isoleren na vaccinatie uit de drainerende lymfeknopen en deze vergelijken tussen dieren met een chronische ziekte en dieren zonder een chronische ontstekingsziekte.



Figuur 1:

Therapeutische en profylactische vaccinatie wordt vergeleken met de focus op en vaccinatie routes. Hierbij wordt het type dat betrokken is bij de inductie in kaart gebracht met behulp van specifiek transgene muizen, maar ook door te isoleren uit de drainerende lymfeklieren.

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.

- **Het arthritis model:**
- Proteoglycaan geïnduceerde arthritis (PGIA) zal geïnduceerd worden met 2 injecties van proteoglycaan uit kraakbeen in DDA. Hiervoor zullen vrouwelijke dieren gebruikt worden op een balb/c achtergrond. Deze dieren hebben een hogere gevoeligheid voor het ontwikkelen van arthritis waardoor een hogere incidentie wordt gehaald, minder injecties en minder dieren nodig zijn¹⁸.
- De twee injecties worden i.p. toegediend met een tussen periode van 21 dagen. Vervolgens worden de dieren 2x per week bekeken op de ontwikkeling van arthritis verschijnselen (roodheid en zwelling van de pootjes). Indien de dieren arthritis krijgen wordt het klinisch onderzoek geïntensiveerd afhankelijk van de ernst van het verloop.
- Tijdens arthritis zal bloed afgenomen worden doormiddel van een wang prik, waarbij maximaal 100 ul

er muis wordt afgenomen en maximaal 1 x per 3 weken.

- Dieren waarbij het [] wordt bekeken zullen een minimaal dag voor toediening van het vaccin [] cellen gelabeld met een vital dye i.v. krijgen toegediend.
- [] vaccinatie [] met ziekte inducerend antigeen [] of [] eiwit in aanwezigheid van een [] adjuvant zal voor of na de 2^e vaccinatie plaatsvinden om het onderscheid te maken tussen [] vaccinatie in de steady state en tijdens ontsteking.
- Het tweede model is een **dermatitis model**, hiervoor is gekozen omdat het hier een voornamelijk Th2 gemedieerde response betreft anders dan bij artritis dit zal laten zien of [] vaccinatie breed inzetbaar is bij een disbalans van het immuunsysteem. In dit model wordt de ziekte geïnduceerd met 2 of 3 sensitisatie met allergeen met 3 weken tussen tijd gevolgd door een challenge op de huid. De sensitisatie wordt [] afhankelijk van het antigeen ([]). Vervolgens worden de dieren gechallengeerd en wordt de ontwikkeling van huidontsteking op de plek van de challenge visueel beoordeeld. Alle dieren zullen aan het eind van het experiment gedood worden om de immuun relevante organen te isoleren voor verdere analyse in het laboratorium.
- [] vaccinatie (mucosaal of dermaal) met ziekte inducerend antigeen (ovalbumine of huisstofmijt) of [] eiwit in aanwezigheid van een [] adjuvant zal voor of na de 2^e/3^e vaccinatie plaatsvinden om het onderscheid te maken tussen [] vaccinatie in de steady state en tijdens ontsteking.

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

Er is overwogen hoeveel dieren er nodig zijn om een aan te tonen effect te bewijzen (true difference of the means). De calculatie van de hoeveelheid dieren is gedaan met de software behandeld in de proefdiercursus (<http://www.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/>). De exacte afwegingen en statistische berekeningen zijn hieronder verder uitgewerkt.

B. De dieren

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

In dit deel van het project zal gebruik gemaakt worden van muizen afkomstig van commerciële proefdier leveranciers of vanuit eigen fok indien het specifieke transgene muizen betreft. In alle gevallen zullen volwassen dieren gebruikt worden waarbij in het algemeen dieren tussen de 6-12 weken aangekocht zullen worden, omdat in deze dieren het immuunsysteem volledig ontwikkeld is. Alleen in het geval van artritis inductie zal gekozen worden voor muizen van meer dan >16 weken oud en bij voorkeur gepensioneerde fokvrouwen, omdat deze de hoogste gevoeligheid hebben voor het ontwikkelen van artritis.

In het geval van dermatitis is er geen geslachtsvoorkeur voor de dieren.

Aantallen deel 2a:

In totaal kunnen naar verwachting maximaal 10 verschillende adjuvantia testen. Enkele voorbeelden zijn [] (mogelijk geladen met een []), anti-inflammatoire compounds als [] of [] liposomale formuleringen, anti-lichaam gemedieerde targeting van []⁴.

Hierbij willen we gebruik maken van 2 peptiden. Ten eerste het [] waarvan [] aangetoond dat het [] in artritis en een tweede ziekte relevant peptide (bijvoorbeeld proteoglycaan peptide in artritis of ovalbumine in dermatitis).

Om de effectiviteit van het vaccin te testen zullen we maximaal 3 verschillende doseringen testen per verschillend adjuvans. Het aantal doseringen is afhankelijk van de formulering van het vaccin en de concentratie peptide die hierin beschikbaar is voor het immuunsysteem en meetbare [] cel activatie geeft van de ingespoten [].

Per experiment hebben we een positieve controle nodig met een bekend immuunsuppressieve stof (bijvoorbeeld dexamethason) en een onbehandelde negatieve controle en kunnen we in totaal 5 testgroepen analyseren (met 2 controles erbij zijn dat 7 groepen per experiment).

Groepen:

- Groep 1: positieve controle
- Groep 2; negatieve controle
- Groep 3: test vaccin 1 dosis 1
- Groep 4: test vaccin 1 dosis 2
- Groep 5: test vaccin 1 dosis 3

Artritis model:

Door ervaring uit eerdere experimenten gaan we uit van een standaard deviatie (sigma, tweezijdig) van artritis hebben tussen de experimentele groepen van minimaal 30%. De power wordt vastgesteld op 90% om de kans op een type II fout te verkleinen, dit gezien de variatie. Het aan te tonen effect (true difference of means) tussen de testgroepen wat we willen bereiken is 50%. We vergelijken alle behandelingen met de negatieve controle en hebben dus 4 vergelijkingen. Door het toepassen van de Bonferoni correctie op de alfa, hebben we een alfa van 0.0125. Wanneer we deze gegevens invullen in de software behandeld in de proefdierkunde cursus (<http://www.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/>) geeft dit dat we per analyse 12 dieren nodig hebben.

In totaal dus 10 vaccins * 5 groepen* 12 dieren= **600** muizen).

Omdat we in deze dieren ook de █ cel response willen vervolgd hebben maximaal **1200** donor muizen nodig, aangezien we 2 donor muizen nodig hebben om voldoende █cellen uit te isoleren voor een transfer (zie bijlage 2).

Dermatitis model:

Voor het dermatitis model gaan we uit van een standaard deviatie (sigma, tweezijdig) van artritis hebben tussen de experimentele groepen van minimaal 25%. De power wordt vastgesteld op 90% om de kans op een type II fout te verkleinen, dit gezien de variatie. Het aan te tonen effect (true difference of means) tussen de testgroepen wat we willen bereiken is 50%. We vergelijken alle behandelingen met de negatieve controle en hebben dus 4 vergelijkingen. Door het toepassen van de Bonferoni correctie op de alfa, hebben we een alfa van 0.0125. Wanneer we deze gegevens invullen in de software behandeld in de proefdierkunde cursus (<http://www.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/>) geeft dit dat we per analyse 12 dieren nodig hebben.

In totaal dus 10 vaccins * 5 groepen* 9 dieren= **450** muizen).

Omdat we in deze dieren ook de █ cel response willen vervolgd hebben maximaal **900** donor muizen nodig, aangezien we 2 donor muizen nodig hebben om voldoende █cellen uit te isoleren voor een transfer (zie bijlage 2).

Aantallen deel 3b:

In deel 3b zullen we ons richten op de █ die nodig is voor de inductie van de █ cel. In dit deel zullen we █ isoleren uit dieren die een chronische ontsteking en controle dieren kort na vaccinatie om de verschillen tussen deze █ in kaart te brengen. In deze vraagstelling is het niet noodzakelijk om verschillende diersmodellen met verschillende ontstekingen te testen en beperken we ons tot het artritis model.

Hier willen we 2 effectieve vaccins testen (getest in 3a) via beide routes (█). Hierbij zullen de lymfeknopen geïsoleerd worden op 3 tijdstippen na vaccinatie om te analyseren of de █ veranderen over tijd na vaccinatie.

Groepen per experiment:

- Groep 1: positieve controle
- Groep 2: negatieve controle
- Groep 3: vaccin1 █
- Groep 4: vaccin 1 █

Artritis model:

Door ervaring uit eerdere experimenten gaan we uit van een standaard deviatie (sigma, tweezijdig) van artritis hebben tussen de experimentele groepen van minimaal 30%. De power wordt vastgesteld op 90% om de kans op een type II fout te verkleinen, dit gezien de variatie. Het aan te tonen effect (true difference

of means) tussen de testgroepen wat we willen bereiken is 50%. We vergelijken alle behandelingen met de negatieve controle en hebben dus 3 vergelijkingen. Door het toepassen van de Bonferoni correctie op de alfa, hebben we een alfa van 0.017. Wanneer we deze gegevens invullen in de software behandeld in de proefdierkunde cursus (<http://www.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/>) geeft dit dat we per analyse 11 dieren nodig hebben.

- Dit zijn dus **44** dieren per experiment.
- Per vaccin wordt dit experiment **6** maal uitgevoerd, namelijk de dieren worden op 3 tijdstippen na vaccinatie geanalyseerd en zowel tijdens steady state als tijdens een ontsteking.
- We willen 2 succesvolle (in 3a) vaccinaties testen

In totaal dus 2 vaccins * 6 experimenten * 44 dieren = **528** muizen).

En tevens zullen we 2 effectieve vaccin routes () en 2 effectieve formuleringen (bewezen in 3a) testen, samen met de juiste positieve (immunosuppressivum) als negatieve (ongevaccineerde) controle in zowel conventionele als conditionele knock-out muizen (2 stammen). In totaal zijn dit dus 6 groepen per stam dus 18 groepen van 12 dieren in totaal **216** dieren

In totaal voor deel 2:

Donor dieren: 2100

Artritis/dermatitis met vaccinatie: 600+450+528+216=1794

Totaal: **3894**

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☐ Nee, ga door met vraag D.

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

Indien surplus dieren beschikbaar zijn van de juiste leeftijd en achtergrond is hergebruik van dieren te overwegen. Het is echter van belang dat dieren niet eerder zijn gebruikt voor studies waarbij het immuunsysteem gemanipuleerd is omdat dit de uitkomst kan beïnvloeden

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

☒ Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

De vraagstelling vereist de bestudering van de immuunrespons in vivo, namelijk kunnen () Kunnen deze ()? Via welke route is het mogelijk therapeutisch te vaccineren voor () Vanwege de complexiteit van de immuunrespons is het niet mogelijk dit te vervangen door bijvoorbeeld computer modellen. Waar mogelijk worden wel eerst in vitro experimenten uitgevoerd voordat er wordt getest in muizen en met materiaal afkomstig uit deze dieren worden in vitro tests gedaan om zo de resultaten beter te kunnen interpreteren. Dit is gebaseerd op experimenten beschreven in de literatuur en ervaring binnen onze groep met diermodellen en de te analyseren parameters.

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.

Voor muizen waarbij artritis geïnduceerd is wordt er extra op gelet dat deze muizen extra voer in de kooi hebben liggen zodat ze niet per se op hun achterpoten hoeven staan om erbij te kunnen. Verder worden de muizen regelmatig gecheckt zodat het ongerief tot het minimum beperkt blijft. Bij de andere muizen is de standaard kooiverrijking aanwezig.

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.

Artritis inductie en de ontwikkeling van ontsteking bij dermatitis en transplantatie geven ongerief bij de dieren. Echter het toepassen van pijnstillers bij deze dieren zal het immuunsysteem beïnvloeden¹⁹. Het is bekend dat NSAIDs de ontstekingsreactie direct beïnvloeden en daarmee het ziekte model nadelig beïnvloeden. Maar ook het gebruik van opioïden kan de immuunreactie beïnvloeden. Buprenorfine wordt vaak beschreven als een veilig alternatief met weinig effect op het immuunsysteem, echter ook buprenorfine kan de inductie van artritis nadelig beïnvloeden in sommige modellen, aangezien voor de modellen die gebruikt worden in deze aanvraag het effect van buprenorfine niet voldoende onderzocht is zal dit niet worden toegepast. Aangezien immunologische parameters bepalen zijn voor de uitkomsten van het onderzoek is het in deze dieren net mogelijk pijnstilling toe te passen.

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

Scheren en sensibiliseren van de dieren voor dermatitis zal onder anaesthesie plaatsvinden

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

1. Het ontwikkelen van dermatitis zal aanleiding zijn voor het ontwikkelen van ongerief. Het ontwikkelen van anafylactische reacties in het dermatitis model zijn niet beschreven.
2. Handeling van de dieren meerdere malen per week ten behoeven van artritis score

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

1. Ontsteking van de huid geeft irritatie en mogelijk jeuk.
2. Handeling geeft stress, echter het mogelijk ongerief van de artritis maakt vaker hanteren van de dieren noodzakelijk

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

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.

Voor de artritis score geldt een maximum score van 16 per dier. Ieder poot kan een score van 4 punten halen. Score 1 matige roodheid en zwelling aan 1 teen of de poot. Score 2 roodheid en zwelling aan de poot of aan maximaal 2 tenen. Score 3: roodheid en zwelling aan de poot en maximaal 3 tenen of milde zwelling van de poot en maximaal 4 tenen. Score 4: roodheid en zwelling aan zowel de poot als 4 tenen. Een score van 12 wordt beschouwd als een humaan eindpunt.

Voor het dermatitis model wordt gekeken naar het ontwikkelen van dermatitis, duidelijke jeuk (continue krabben) en het openkrabben van de huid worden aangehouden als humaan eindpunt.

Naast model specifieke humane eindpunten wordt ook gekeken naar algemeen welbevinden van de dieren, op basis duidelijke veranderingen in uiterlijk, gewicht of gedrag zullen de dieren worden geuthenaseerd. Hierbij wordt gelet op bol zitten, roodheid rond de ogen en lusteloosheid voor een periode van > 24 uur wordt beschouwd als humaan eindpunt. In het geval van een indicatie van gewichtsverlies worden de dieren gewogen en bij >15% gewichtsverlies in 2 dagen is het HEP bereikt..

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

In het geval van artritis is het te verwachten aantal dieren dat het HEP bereikt ongeveer 10%

In het geval van dermatitis is het ontwikkelen van de ziekte gelijk aan het bereiken van het HEP in dit geval zal tussen de 25 en maximaal 70% van de dieren het HEP bereiken (afhankelijk van de effectiviteit van de therapie).

Voor donor dieren is niet te verwachten dat het HEP bereikt wordt.

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.

Artritis model: 25% licht, 75% van de dieren zullen tot matig ongerief hebben

Dermatitis model: 56% licht ongerief en in maximaal 44% van de dieren tot matig ongerief

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

☐ Nee

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

Na afloop van het experiment worden de immuun relevante organen geïsoleerd uit de dieren voor verder analyses.

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

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer : 2015.II.811.050
2. Titel van het project : "Nieuwe immuun therapie voor chronische ontstekingen"
3. Titel van de NTS : Nieuwe therapie voor chronische ontstekingsziekten

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: 15-01-2016
☐ aanvraag compleet:
☒ in vergadering besproken: 20-01-2016
☒ anderszins behandeld: per mail: 28-01-2016
☒ termijnonderbreking(en) van / tot : 22-01-2016 tot 28-01-2016
☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
☐ aanpassing aanvraag:
☒ advies aan CCD: 08-03-2016

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: 22-01-2016
- Strekking van de vragen:

Niet Technische Samenvatting

- 3.2 Opbrengsten project en wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang: In de vijfde regel spreekt u over de patiënt, terwijl het over de muis gaat. Graag aanpassen, bijvoorbeeld naar 'het zieke dier'.

Projectvoorstel

- 3.1 Achtergrond: De DEC adviseert u 'chronische ontstekingsziekten' te vervangen door 'chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten'. Graag aanpassen.
- 3.1 Achtergrond: De DEC merkt op dat de grafiek onvolledig is opgenomen in de aanvraag (assen en invulling ontbreken), graag aanpassen.
- 3.4 Onderzoeksstrategie: Deel 2: U noemt hier dat u maximaal twee kweekmethodes kiest, maar spreekt in bijlage 1 over drie methodes. Graag consistent invullen.

Bijlage 2

- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: De DEC adviseert u meer aandacht te besteden aan de ratio van het opnemen van de twee andere ontstekingsmodellen. Tevens verzoekt de DEC u een go/no go-moment te beschrijven worden voor het gebruik van de andere modellen, inclusief de criteria. Graag aanpassen.
- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: De DEC verzoekt u te benoemen dat het door u te gebruiken artritismodel een relatief licht model is.
- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: De DEC adviseert u de samenhang tussen de verschillende modellen beter te beschrijven in de aanvraag.
- J. Humane eindpunten: De DEC acht het feit dat maximaal 70% van de dieren in het dermatitismodel het HEP bereikt, erg hoog. Graag uw visie.
- K. Classificatie van ongerief: De DEC verzoekt u toe te lichten dat de 75% gaat over de dieren in het dermatitismodel. Graag de classificatie uitsplitsen per model.

Bijlage 3

- J. Humane eindpunten: De DEC verzoekt u de humane eindpunten uit te splitsen naar de verschillende modellen.
- Datum antwoord: 28-01-2016
- Strekking van de antwoorden:

Niet Technische Samenvatting

3.2 Opbrengsten project en wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang: Dit is aangepast.

Projectvoorstel

- 3.1 Achtergrond: In alle gevallen is dit aangepast en met geel gemarkeerd.
- 3.1 Achtergrond: In de door ons her-ingediende versie zijn de assen zichtbaar.
- 3.4 Onderzoeksstrategie: Aangepast en met geel gemarkeerd.

Bijlage 2

- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: De keuze voor de 2 modellen is gebaseerd op de hypothese dat [REDACTED] therapie bij meerdere typen ontstekingen effectief kan zijn in het induceren van [REDACTED] cellen en het herstellen van de immuun balans. We willen dit bevestigen door een [REDACTED] therapie die effectief is in het onderdrukken van artritis (een overwegend Th1 type ontsteking) te testen in een chronisch ontsteking model waaraan een ander type ontsteking ten grondslag ligt, namelijk het dermatitis model dat uitgaat van een TH2 type ontsteking. Daarnaast willen we ook bevestigen dat de door ons effectief geteste [REDACTED] therapie in de muis humaan relevant kan zijn. Hiervoor willen we gebruik maken van het humane transplantatie model waarbij een humaan immuunsysteem in de muis wordt gebracht en vervolgens de ontsteking reactie en de onderdrukking hiervan wordt geanalyseerd. Hoewel het hier wel een muis model betreft, krijgen we een beter beeld van de complexe interacties van het humane immuunsysteem. Juist dit aspect van [REDACTED] therapie in combinatie met een [REDACTED] in verschillende chronische ontstekingsziekten zou van grote meerwaarde kunnen zijn voor het ontwikkelen van [REDACTED] therapie voor humane patiënten. Om te onderzoeken of de hypothese correct is willen we 1 type [REDACTED] in 1 dosering die effectief is gebleken in het artritis model testen in andere ontstekingsmodellen. Aangezien artritis een overwegend Th1 type ontsteking is hebben we gekozen om een chronisch (auto-immuun) ontstekingen model te nemen met een ander type ontsteking, het dermatitis model. Dermatitis een meer gemengde Th2 ontsteking. Door juist duidelijk verschillende typen ontsteking te kiezen kunnen deze experimenten de vraag beantwoorden of [REDACTED] therapie voor meerdere chronische ontstekingen gebruikt kan worden in de toekomst. Als derde model willen we de mogelijke translatie naar de humane patiënt beter in kaart brengen en hiervoor hebben we gekozen voor een zogeheten gehumaniseerd muis model. In dit wordt gebruik gemaakt van [REDACTED] muis waarin humane immuuncellen worden getransplanteerd om deze muis een humaan immuunsysteem te geven en vervolgens te kijken naar een transplantatie afstotingen. Ook in dit model is de ontsteking overwegend een Th1 type ontsteking. De [REDACTED] therapie zal alleen in de laatste 2 genoemde modellen getest worden als blijkt dat deze effectief is in het onderdrukken van de ziekte in het artritis model.
- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Dat is toegevoegd aan de tekst.
- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: We hopen dat met het antwoord op de eerste vraag m.b.t. bijlage 2 en de bijbehorende aanpassingen in de projectaanvraag de samenhang tussen de modellen helderder is geworden.
- J. Humane eindpunten: Het klopt dat het aantal dieren dat in het dermatitis model het HEP bereikt erg hoog is. Dit is het gevolg van de formulering van het HEP. Het dermatitis model is een chronisch en progressief ontstekingsmodel en de ontsteking van de huid gaat samen met het ontwikkelen van jeuk. Het progressieve karakter van de ziekte betekend dat zodra de dieren jeuk krijgen gaat deze niet meer weg en zullen de dieren blijven krabben, met als gevolg dat dieren uiteindelijk ook de huid kunnen openkrabben. Aangezien we willen

voorkomen dat dieren eventueel secundaire infecties ontwikkelen hebben we gekozen voor een vroeg HEP, namelijk het ontwikkelen van de ziekte. Om dit te verduidelijken hebben we de tekst iets aangepast.

- K. Classificatie van ongerief: Dit is aangepast en toegelicht.

Bijlage 3

- J. Humane eindpunten: In bijlage 3 hebben we het ongerief van beide modellen genoemd. In bijlage 3 worden allen het artritis model en dermatitis model getest.
- 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 het betreffende project.

C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:

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

2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstellingen.

3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. In chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten is sprake van een foutieve immuun-regulatie waardoor een auto-immuun ontsteking plaatsvindt tegen lichaamseigen antigenen. De huidige therapie bestaat uit algehele aspecifieke immuun-suppressie en gaat gepaard met een toegenomen kans op infecties, tumoren en het ontwikkelen van therapie resistentie. Om de immuun-regulatie weer in balans te krijgen kunnen [REDACTED] worden gebruikt. Deze [REDACTED]

█ cellen zijn in het lichaam van groot belang bij het herstellen van de immuunregulatie █. Er zijn verschillende manieren om █ in te zetten als mogelijke therapie voor chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten, namelijk als celtherapie of als vaccin. In diermodellen voor chronische ontsteking is aangetoond dat █ ziekte kunnen voorkomen en een initiële humane fase I trial dat het toedienen van █ in principe veilig is in artritis patiënten. Momenteel is het alleen niet bekend welke eigenschappen van de █ cruciaal zijn █ chronische ontstekingen. Het huidige project beoogt om de eigenschappen van *in vitro* gekweekte █ in kaart te brengen voor de ontwikkeling van een effectieve en veilige celtherapie. Daarnaast zal in dit project worden onderzocht of het mogelijk is een █ vaccin in te zetten om *in vivo* via █ █ en daarmee de immuun-balans te herstellen. De vaccinatie zorgt dat █ cellen geïnduceerd worden *in vivo* tegen het vaccin eiwit, bijvoorbeeld door de aanwezigheid van een █ adjuvans. Het ontwikkelen van mogelijke nieuwe therapieën om langdurige tolerantie te creëren en daarmee langdurig herstel van de immuun-balans in patiënten met chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten wordt ingeschat als een substantieel belang.

4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De onderzoeksgroep heeft ervaring met het kweken van █ afkomstig uit het beenmerg van muizen en aangetoond dat een bepaald type *in vitro* gekweekte █-cellen kan induceren. Het is nog onbekend of dit type *in vitro* gekweekte █ ook *in vivo* effectief is tijdens chronische ontstekingen. Op dit moment zijn verschillende protocollen gepubliceerd voor het kweken van █ die mogelijk *in vivo* chronische ontsteking kunnen onderdrukken. In het eerste deel van dit project (bijlage 1) zullen de verschillende protocollen met elkaar worden vergeleken en de effectiviteit en karakteristieken van de verschillende typen █ worden bepaald. De twee typen █ die het meest effectief zijn in het █-cellen zullen vervolgens worden ingezet als celtherapie in een model voor artritis (bijlage 2). Alleen het type █ (in 1 dosering) dat effectief is gebleken in het onderdrukken van ziekte in het artritis model zal vervolgens worden onderzocht in dermatitis en een gehumaniseerd muizenmodel (go/no-go moment). In de verschillende chronische ontstekingsmodellen die onderzocht worden zal een ander type ontsteking plaatsvinden, overwegend Th1 type ontsteking in artritis en een meer gemengde Th2 ontsteking in dermatitis. Voor het █ wordt █ huid naar █ muizen getransplanteerd waarna █ immuuncellen worden toegediend om zo in de muizen een █ immuunsysteem te creëren, vervolgens wordt de ontstekingsreactie bestudeerd. Door de effectiviteit van █ therapie in verschillende ontstekingstypen te onderzoeken kan bepaald worden of deze therapie in de toekomst voor verschillende chronische ontstekingsziekten kan worden ingezet. Met de kennis verkregen uit de *in vitro* en eerdere *in vivo* studies kan gericht bepaald worden welke █ cellen getarget moeten worden met een █ vaccin (bijlage 3). Hiervoor zullen █ gecombineerd worden met ziekte relevante antigenen en worden toegediend tijdens chronische

ontsteking *in vivo* (arthritis en dermatitis model). De DEC is ervan overtuigd dat de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen beschikt om de projectdoelstelling met de gekozen aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren.

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. De muizen die dienen als donor voor de [REDACTED] die gebruikt zullen worden in de experimenten beschreven in bijlagen 1 (100%), 2 (33%) en 3 (54%) ondervinden licht ongerief. Deze donormuizen worden zonder voorafgaande handelingen getermineerd. Het ongerief van de experimentele dieren is afhankelijk van de effectiviteit van de therapie. Voor de inschatting van het ongerief wordt ervan uitgegaan dat de helft van de therapieën effectief zal zijn om zo het ongerief niet te onderschatten. Het ongerief dat muizen ondervinden waarin chronische ontstekingsziekten worden geïnduceerd wordt als volgt ingeschat, in bijlage 2: 18% licht ongerief en 49% tot maximaal matig ongerief en in bijlage 3: 15% licht ongerief en 31% tot maximaal matig ongerief. Binnen het gehele project zal 62% van de muizen licht ongerief ondervinden en 28% maximaal matig ongerief.

Binnen het arthritis en transplantatie model wordt verwacht dat ongeveer 10% van de muizen het humane eindpunt bereikt. Binnen het dermatitis model wordt verwacht 25-70% van de muizen het humane eindpunt bereikt. Het dermatitis model is een chronisch en progressief ontstekingsmodel en de ontsteking van de huid gaat samen met het ontwikkelen van jeuk. Het progressieve karakter van de ziekte heeft tot gevolg dat wanneer de dieren jeuk krijgen deze niet meer weggaat en de dieren zullen blijven krabben, met als gevolg dat dieren uiteindelijk ook de huid kunnen openkrabben. Daarom is ervoor gekozen dat met het ontwikkelen van ziekte het humane eindpunt is bereikt.

7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen vervangen. Door de complexiteit van een immuunrespons is het niet mogelijk deze met een computermodel te simuleren. Zowel voor [REDACTED] cellen zijn geen cellijnen beschikbaar die *in vivo* studies kunnen vervangen. Het gebruik van [REDACTED] hybridoma's is niet wenselijk omdat in deze hybridoma's alleen [REDACTED]-cel activatie geanalyseerd kan worden en niet de inductie of effectiviteit van [REDACTED] cellen.

8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de vermindering van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat. Om het aantal *in vivo* te testen [REDACTED] te beperken, zullen de verschillende typen [REDACTED] eerst uitvoerig *in vitro* worden bestudeerd en gekarakteriseerd.
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. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten. Alleen de effectief gebleken therapeutische toepassing van [REDACTED] zal in diermodellen voor chronische ontsteking worden bestudeerd. Het gehumaniseerde muizenmodel voor transplantatie is gekozen om de complexe interacties van het humane immuunsysteem beter te kunnen onderzoeken wat essentieel is voor de translatie naar de humane patiënt.

Voor het dermatitis en transplantatie model zullen volwassen muizen van beide seksen gebruikt worden met een leeftijd tussen de 6-12 weken, omdat in deze dieren het immuunsysteem volledig ontwikkeld is. Alleen in artritis model zullen muizen ouder dan 16 weken en bij voorkeur gepensioneerde fokvrouwen worden gebruikt, omdat deze vrouwelijke muizen de hoogste gevoeligheid hebben voor het ontwikkelen van artritis. De DEC heeft gediscussieerd over het geslacht van de dieren. Gezien het feit dat er sprake is van een proof-of-concept studie, kan de DEC zich vinden in de argumentatie om in het artritis model te kiezen voor het gebruik van één sekse.
10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

De DEC is unaniem van mening dat het wetenschappelijke en maatschappelijke belang van dit project opweegt tegen het ongerief dat de muizen zullen ondervinden. De huidige behandeling van patiënten met chronische ontstekingsziekten waarbij de balans van immuunsysteem verstoord is, is gebaseerd op het onderdrukken van het immuunsysteem en gaan gepaard met bijwerkingen zoals het frequenter ontstaan van infecties en tumoren. De DEC is van mening dat het uitgebreid onderzoeken en karakteriseren van [REDACTED] zal bijdragen aan het ontwikkelen van mogelijke therapeutische toepassingen voor het behandelen van patiënten met chronische ontstekingsziekten zoals [REDACTED] celtherapie of vaccinatie gericht op [REDACTED]. Het gebruik van verschillende diermodellen voor chronische ontsteking waarbij dieren licht (62%) tot matig ongerief (28%) ondervinden is in de ogen van de DEC noodzakelijk om de effectiviteit van [REDACTED] therapie in verschillende typen ontstekingen die plaatsvinden bij chronische ontstekingsziekten te bepalen. Voor het inzetten van meerdere ontstekingsmodellen zijn duidelijke criteria voor go-no go momenten bepaald. De mogelijkheden tot vervanging, vermindering en verfijning van dierproeven zijn onderzocht en optimaal toegepast binnen de onderzoeksstrategie. Daarnaast zijn de humane eindpunten zo bepaald dat de muizen onnodig ongerief bespaard blijft. Dit alles brengt de DEC tot

het oordeel dat het belang van de doelstellingen opweegt tegen het lichte tot matige ongerief dat de muizen in dit project zullen ondervinden, en dat het gebruik van de muizen ethisch aanvaardbaar is.

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

Universiteit 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

AVD108002016467

Bijlagen

2

Datum 17 maart 2016

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 15 maart 2016.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD108002016467. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10800
Naam instelling of organisatie: Universiteit Utrecht
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 30275924
Postbus: 12007
Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT
IBAN: NL27INGB0000425267
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: Universiteit Utrecht

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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 mei 2016
Geplande einddatum: 1 mei 2021
Titel project: Nieuwe immuuntherapie voor chronische ontstekingen
Titel niet-technische samenvatting: Nieuwe therapie voor chronische ontstekingsziekte
Naam DEC: DEC Utrecht
Postadres DEC: Postbus 85500 3508 GA Utrecht
E-mailadres DEC: dec.utrecht@umcutrecht.nl

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1.441,-
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: 14 maart 2016



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UU-ASC
Postbus 80011
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
AVD108002016467
Bijlagen
2

Datum 17 maart 2016
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 17 maart 2016
Vervaldatum: 16 april 2016
Factuurnummer: 16700467
Ordernummer: CB.841910.3.01.011

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD108002016467	€ 1.441,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL41RBOS 056.999.6317 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93144, 2509 AC te 's Gravenhage.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht

[Redacted]
[Redacted]
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
Aanvraagnummer
AVD108002016467

Uw referentie
uw ref

Bijlagen
1

Datum 15 april 2016

Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte [Redacted]

Op 15 maart 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Nieuwe immuuntherapie voor chronische ontstekingen" met aanvraagnummer AVD108002016467. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

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

Niet technische samenvatting

De Niet technische samenvatting bij uw aanvraag bevat een tikfout in 3.5 (en dat geldt als licht ongerief). U kunt binnen veertien dagen een nieuwe Niet technische samenvatting sturen. Indien uw aanvraag wordt toegewezen zal de nieuwe Niet technische samenvatting op onze website geplaatst worden, of de bij uw aanvraag ingestuurde versie indien u geen nieuwe Niet technische samenvatting stuurt. U kunt de Niet technische samenvatting aanleveren via NetFTP. Stuurt u het per post op, gebruik dan het formulier dat u bij deze brief krijgt.

Onduidelijkheden

- 1) In bijlage 1 beschrijft u niet of u mannelijke/vrouwelijke dieren of dieren van beide geslachten zult gebruiken. Graag dit vermelden en indien u gebruik maakt van slechts 1 geslacht, dit onderbouwen.
- 2) In bijlage 2 beschrijft u onder B voor artritis een totaal aantal van 1782+594 dieren, terwijl bij de bovenstaande beschrijving u uitgaat van 1782+648 dieren. Graag consistent maken en indien nodig de NTS hierop aanpassen.
- 3) In bijlage 2 beschrijft u onder B voor overige ontstekingsmodellen een totaal aantal van 96+127 dieren, terwijl bij de bovenstaande beschrijving u uitgaat van 96+126 dieren. Graag consistent maken en indien nodig de NTS hierop aanpassen.
- 4) In bijlage 2 beschrijft u geen verfijning van de dierproeven. Dit graag aanvullen.

- 5) In bijlage 3 beschrijft u wel verfijning voor het artritismodel, maar zegt u niets over verfijning van het dermatitis model. Graag aanvullen.
- 6) In bijlage 3 is niet ingevuld of er in het voorgaande gebruik sprake is van ernstig ongerief. Graag invullen.

Datum

15 april 2016

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD108002016467

Opsturen binnen veertien dagen

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

Wanneer een beslissing

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlage:

- formulier Melding Bijlagen via de post



Melding

Bijlagen via de post

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

1 Uw gegevens

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

2 Bijlagen

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

3 Ondertekening

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



Format

Projectvoorstel dierproeven

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

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 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
- ☐ 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.

In de westerse wereld is er toename aan patiënten met **chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten** (zoals bijvoorbeeld reumatoïde artritis en dermatitis). Alleen reumatoïde artritis treft ongeveer 1% van

alle volwassenen. Het probleem in deze chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten is de foutieve immuun regulatie in deze patiënten, die zorgt voor het ontwikkelen van een auto-immune ontsteking gericht tegen lichaamseigen antigenen. De huidige therapie in deze patiënten is gebaseerd op algehele aspecifieke immuun suppressie. Het levenslange gebruik van deze medicatie gaat gepaard met een toegenomen kans op infecties, tumoren en het ontwikkelen van therapie resistentie, en is helaas niet effectief in alle patiënten.

De ideale therapie in dergelijke chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten is het herstellen van de immuun balans door het herstellen van [REDACTED]. Helaas blijkt het [REDACTED] tijdens chronische ontstekingen lastig.

[REDACTED] cellen zijn cruciaal in de immuun balans. In veel chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten is beschreven dat de [REDACTED] cellen verminderd aanwezig zijn of verminderd functioneel zijn. Door het activeren of induceren van [REDACTED] cellen gericht tegen het ziekte inducerend-antigeen kan de immuun balans hersteld worden¹. [REDACTED] zijn hierbij van groot belang. [REDACTED] spelen een centrale rol in het immuunsysteem en zijn essentieel voor de inductie van een effectieve [REDACTED] cel response tegen pathogenen maar ook voor het [REDACTED] cellen in de periferie en hierdoor dragen ze bij aan het behoud van de immuun balans².

Het exploiteren van [REDACTED] cellen als target voor immuuntherapie kan op verschillende manieren. Ten eerste kan je [REDACTED] cellen die zogeheten [REDACTED] eigenschappen hebben gebruiken als **celtherapie**. Initiële studies laten zien dat met behulp van deze [REDACTED] ziekte kan worden voorkomen in diermodellen voor chronische ontstekingen^{3,4,5}. Daarnaast heeft een initiële fase I trials in [REDACTED] in de mens laten zien dat het geven van [REDACTED] therapie in principe veilig is in artritis patiënten. Zij hebben geen bijwerkingen gezien tijdens de trial maar de effectiviteit kon niet beoordeeld worden in deze trials (persoonlijke communicatie).

Het probleem is dat het onduidelijk is wat de effectiviteit van een dergelijke [REDACTED] therapie tijdens chronische ontstekingen bepaald en aan welke criteria, op zowel moleculair als eiwit niveau, de [REDACTED] moet voldoen om in een patiënt met een chronische (auto-immuun) ziekte effectief en veilig te zijn. Een tweede manier om [REDACTED] cellen te gebruiken als mogelijk therapeutische route is door het ontwikkelen van een [REDACTED] vaccin. Wat we hiermee bedoelen is een vaccinatie die zorgt dat er [REDACTED] cellen geïnduceerd worden in vivo tegen het vaccin eiwit, bijvoorbeeld door de aanwezigheid van een [REDACTED] adjuvans of het gericht vaccineren via [REDACTED] routes. Vele studies hebben laten zien dat profylactisch vaccineren via mucosale routes met zelf-antigenen ziekte inductie kan voorkomen. Het therapeutisch vaccineren tijdens ziekte is echter veel minder effectief. De hypothese is dat de in vivo aanwezige [REDACTED] tijdens een chronische ontsteking veranderd zijn, maar ook hier zijn de exacte eigenschappen van de [REDACTED] cellen onbekend.

Voor dat een effectieve immuuntherapie met behulp van [REDACTED] in chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten ontwikkeld kan worden is het dus cruciaal dat de eigenschappen van [REDACTED] goed in kaart worden gebracht en dat de effectiviteit van verschillende directe en indirecte therapieën vergeleken worden **tijdens** chronische ontsteking.

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?

1. Wat zijn de karakteristieken van en in vitro gekweekte [REDACTED] cellen [REDACTED] tijdens chronische ontsteking.

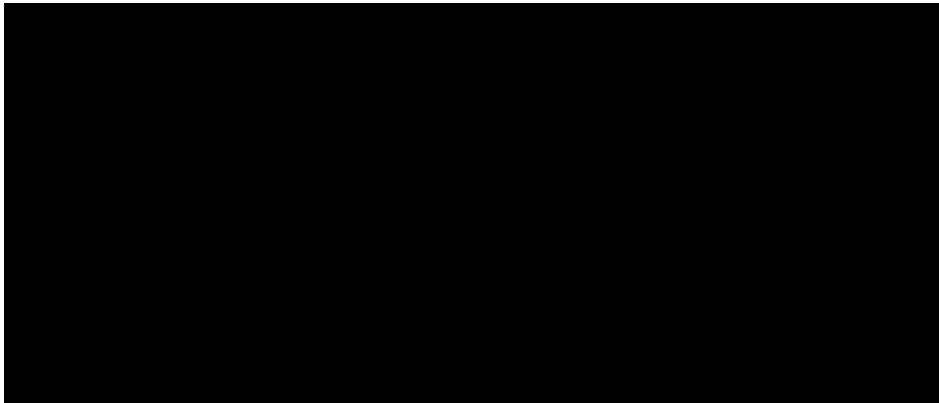
Het beantwoorden van deze vraag zal een grote stap voorwaarts opleveren voor het ontwikkelen van [REDACTED] therapie. Voor het veilig en effectief ontwikkelen van [REDACTED] therapie is het essentieel

om te weten welke factoren een [] definiëren op eiwit niveau en moleculair niveau en op het niveau van cel-cel interactie. Momenteel is het niet bekend welke eigenschappen van de [] cruciaal zijn om functioneel [] te induceren tijdens chronische ontstekingen. Ook is onbekend welke factoren bepalen dat een [] niet verandert van functie na inspuiten bij een chronische ontsteking. Dit laatste is natuurlijk cruciaal voor veilige therapie, want als een [] kan veranderen kan de effectiviteit van de therapie verminderen of in het ergste geval zelfs de ziekte verergeren⁴. Andere vragen die beantwoord moeten worden voordat een effectieve [] celtherapie in de mens kan worden toegepast tijdens ziekte, is wat de ideale omstandigheden zijn voor therapie zoals, route van toediening, frequentie van behandeling, dosis van behandeling, antigeen belading van de [] en welk kweek protocol het meest effectief is.

2. Kunnen we tijdens chronische ontsteking een [] vaccin inzetten om in vivo via [] [] cellen te induceren en zo de immuun balans te herstellen.
In dit deel van het onderzoek zal gekeken worden of het mogelijk is een therapeutisch vaccin te ontwikkelen waarmee in [] getarget kunnen worden en aan welke voorwaarden een dergelijk vaccin moet voldoen. Dit zal gedaan worden op basis van het maken van verschillende combinaties eiwit adjuvans en/of verschillende routes van toediening van het therapeutisch vaccin. Daarnaast zal ook gekeken worden naar het type [] dat tijdens de vaccinatie bereikt wordt in vivo en welke [] essentieel zijn voor een [] vaccinatie.

Haalbaarheid:

In dit project willen we een aantal fundamentele vragen beantwoorden die nodig zijn voor het ontwikkelen van [] therapie in de toekomst. Binnen de onderzoeksgroep hebben we al aangetoond met behulp van in vitro onderzoek dat een bepaald type in vitro gekweekte [] cellen kunnen induceren (figuur 1), maar of deze cellen ook in vivo effectief zijn is onbekend.



Figuur 1: [] zijn gekweekt vanuit beenmerg van muizen in aanwezigheid van [] en []. Deze [] hebben [] moleculen aan het oppervlak ([]) die zorgen voor [] cellen. Daarnaast bleken [] cellen gestimuleerd met deze []s meer [] te hebben (een marker voor [] cellen).

[]. Uit dit onderzoek is gebleken dat [] kunnen onderdrukken wanneer profylactisch toegediend, helaas bleken deze [] niet in staat chronische (auto-immuun) ziekte te onderdrukken. In de literatuur zijn momenteel meerdere [] kweek protocollen beschreven die mogelijk wel een chronische ontsteking kunnen onderdrukken en juist deze zouden we in detail willen bestuderen in dit project^{3,7}. Door het vergelijken van verschillende [] protocollen en analyseren van de effectiviteit van verschillende [] [] tijdens chronische ontsteking, zowel in vitro als in vivo, kunnen we in dit project duidelijk aantonen welke [] langdurig [] kunnen induceren tijdens chronische ontsteking. Door het vergelijken van

de moleculaire en eiwit profielen van deze cellen kunnen we zeer gedetailleerd in kaart brengen aan welke eigenschappen een effectieve [REDACTED] moet voldoen. Deze kennis kan gebruikt worden om een biomarker te ontwikkelen voor het testen van [REDACTED] voor humane therapeutische toepassing. In humane geneeskunde is het belangrijk om, voordat de therapie wordt toegepast, te weten of de celtherapie effectief en veilig is iedere keer dat een individuele patiënt behandeld wordt.

Daarnaast is binnen de onderzoeksgroep de afgelopen jaren veel onderzoek gedaan naar het ontwikkelen van mogelijke [REDACTED] vaccinaties. We hebben hierbij onder andere gekeken naar [REDACTED] toediening van zelf eiwitten ter voorkoming van ziekte [REDACTED] of specifiek gericht targeten van [REDACTED]. Via beide routes werd het ontstaan van artritis verminderd door het induceren van [REDACTED] cellen. Helaas bleken beide methoden minder effectief als therapie dan profylactisch. Wat de oorzaak is van deze verminderde effectiviteit willen we graag uitzoeken door de [REDACTED] goed in kaart te brengen.

Een laatste punt waar we binnen de onderzoeksgroep naar gekeken hebben is of er mogelijk [REDACTED] adjuvantia beschikbaar zijn. Eerste aanwijzingen naar het gebruik van PLGA (poly-lactic-co-glycolic acid) partikels wees uit dat deze gebruikt kunnen worden om [REDACTED] inducerende capaciteit van een vaccin te verhogen [REDACTED], door het moduleren van [REDACTED] die behandeld werden met PLGA partikels brachten meer retinaldehyde dehydrogenase tot expressie, wat mogelijk een rol speelt in het induceren van regulerende T cellen¹¹.

Deze voorgaande studies die aansluiten bij de huidige aanvraag geven aan dat binnen de onderzoeksgroep de ervaring aanwezig is die noodzakelijk is voor het succesvol uitvoeren van het project.

Naast het gebruik van technieken en vaardigheden die beschikbaar zijn binnen de onderzoeksgroep zullen we gebruik maken van uitgebreide samenwerkingen nationaal en internationaal. Binnen het onderzoek naar [REDACTED] therapie is er vanuit de EU een werkgroep opgericht die AFFACT heet. In deze werkgroep wordt 2 maal per jaar overlegd over het onderzoek naar [REDACTED] en de problemen en oplossingen die men heeft gevonden. Als actieve deelnemers aan deze werkgroep zijn we snel op de hoogte van de nieuwste ontwikkelingen en kunnen hier actief op inspringen.

Voor het ontwikkelen van een [REDACTED] model zoals verderop beschreven in bijlage 2, zullen we gebruik maken van de expertise van de groep uit [REDACTED] die dit model heeft opgezet en daar eerst de techniek en het model leren voordat we dit zelf zullen toepassen.

3.3 Belang

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

Het wetenschappelijk belang van deze studie is dat momenteel niet bekend is aan welke parameters een [REDACTED] moet voldoen om veilig en effectieve therapie te effectueren tijdens een chronische ontsteking. Ook is momenteel niet bekend of het mogelijk is een [REDACTED] vaccin in te zetten als therapie tijdens chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten. Deze kennis is van groot belang om deze therapie in de toekomst mogelijk te maken. De ontwikkeling van een mogelijke biomarker die vooraf effectiviteit en veiligheid van de celtherapie kan voorspellen bij de individuele patiënt is van groot belang om deze vorm van therapie in de toekomst mogelijk te maken. Het maatschappelijk belang zit in het induceren van langdurige [REDACTED] in de groter wordende groep mensen met chronische (auto-immuun) ontsteking ziekten, zoals patiënten met reumatoïde artritis, dermatitis, diabetes, colitis of MS. De kennis vanuit deze studie kan bijdragen aan de toekomstige ontwikkeling van een langdurig herstel van de immuun balans in vele patiënten met chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten op de lange termijn.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

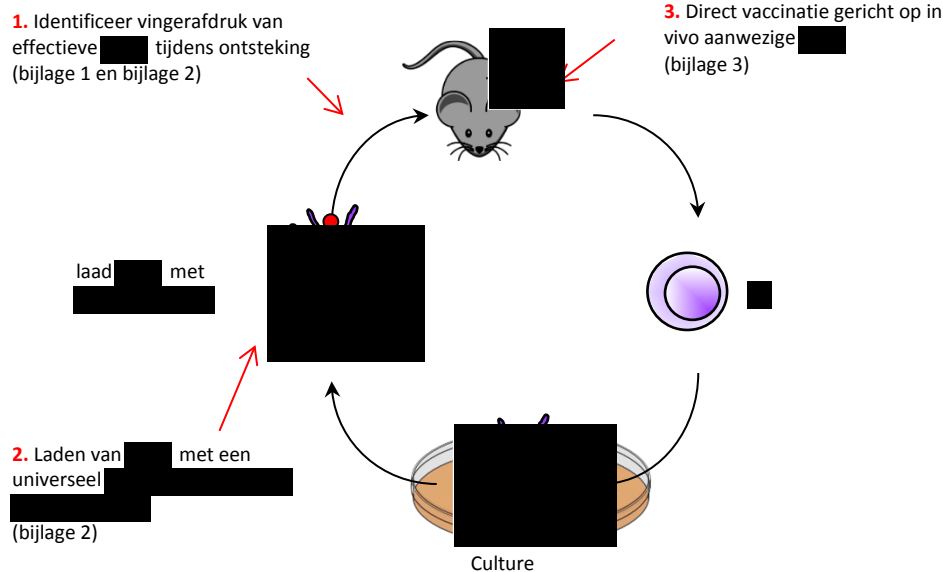
Binnen de studie willen we kijken of we een therapie kunnen ontwikkelen die een chronisch (auto-immuun) ontstekingsmodel zoals artritis kan onderdrukken.

In het eerste deel ([bijlage 1](#)) van het onderzoek willen we verschillende in vitro kweek protocollen voor het kweken van mogelijke [REDACTED] met elkaar vergelijken. In de literatuur zijn verschillende [REDACTED] protocollen beschreven [REDACTED]. Het betreft vaak een gemengde cel populatie waarin ook [REDACTED] aanwezig zijn¹³. Hoewel het voor het onderzoek belangrijker is dat de cellen [REDACTED] zijn dan welk [REDACTED] exact aanwezig is, zal dit wel meegenomen worden in de karakterisatie van de cellen. Door de protocollen met elkaar in vitro te vergelijken kunnen we de meest veelbelovende selecteren voor verder in vivo onderzoek. [REDACTED] zullen in vitro gekweekt worden en hun oppervlakte markers zullen gekarakteriseerd worden met behulp van flowcytometrie analyse. Tevens zullen we [REDACTED] productie en [REDACTED] analyseren. Deze [REDACTED] zijn van groot belang voor [REDACTED] en geven informatie over het functioneren van de [REDACTED]. Door het gebruik van qPCR, mRNA analyse en het gebruik van microarrays zullen we tevens de moleculaire vingerafdruk van deze cellen in kaart brengen. Juist deze laatste gedetailleerde analyse zal informatie geven welke unieke eigenschappen een [REDACTED] heeft. Naast het in kaart brengen van het fenotype van de gekweekte [REDACTED] willen we ook analyseren of de [REDACTED] in vitro [REDACTED] cellen kan induceren. Hiertoe zullen naïeve [REDACTED] cellen (geïsoleerd uit een [REDACTED] muis) gekweekt worden in aanwezigheid van [REDACTED] en [REDACTED]. Na afloop zullen we de [REDACTED] cellen analyseren op expressie van markers die specifiek zijn voor [REDACTED] cellen, zoals [REDACTED], en hun [REDACTED] activiteit meten in een in vitro [REDACTED] assay.

In het verlengde ([bijlage 2](#)) hiervan willen we de twee typen [REDACTED], die in bijlage 1 getest zijn en daar effectief bleken om [REDACTED] cellen te induceren gebruiken, als celtherapie in vivo in chronische ontsteking. Door de [REDACTED] geladen met een ziekte relevant antigeen in te spuiten in diermodellen voor chronische ontstekingen zoals artritis, dermatitis en [REDACTED], kan het ziekteverloop worden bestudeerd. Met behulp van [REDACTED] muizen kunnen we ook de inductie van [REDACTED] [REDACTED] cellen in vivo in detail volgen. Hiertoe worden [REDACTED] cellen geïsoleerd uit [REDACTED] muizen, gelabeld met een vitale fluorescente kleurstof en ingespoten in dieren met artritis. Deze cellen kunnen we aan het eind van de studie isoleren uit de immuun organen en bestuderen of ze [REDACTED] cel eigenschappen hebben gekregen.

In dit deel zullen we ook de effectiviteit van [REDACTED] (proteolysaat in artritis, of OVA en huisstofmijt in dermatitis) vergelijken met tolDCs geladen met [REDACTED]. Eerdere studies hebben laten zien dat [REDACTED] eiwitten verschillende chronische ontstekingen kunnen remmen en mogelijk als therapie ingezet zouden kunnen worden om [REDACTED] te induceren tegen chronische ontstekingen [REDACTED]. Om dit te bevestigen zullen we de met [REDACTED] [REDACTED] inspuiten in andere modellen voor chronische ontsteking zoals dermatitis in de muis. Om een translationele stap te zetten naar de mens willen we ook gebruik maken van een [REDACTED] model voor [REDACTED]. In dit model worden [REDACTED] immuun cellen in een muis gespoten na een [REDACTED] en acceptatie van humane huid, de immuunreactie (afstotingsreactie) die hierdoor ontstaat is te onderdrukken met [REDACTED] cellen. Dit model is opgezet in [REDACTED] en zal ook in nauwe samenwerking worden uitgevoerd. Dit model zal uitwijzen of [REDACTED] ook humaan effectief zijn in een gecompliceerde in vivo immuunreactie, deze stap is cruciaal voor toekomstige toepassing in humane geneeskunde.

Het laatste deel van de studie ([bijlage 3](#)) zal zich meer richten op het induceren van [REDACTED] cellen door direct te vaccineren met een [REDACTED] vaccin. Hiervoor willen we verschillende adjuvantia¹⁴ (bijvoorbeeld gemodificeerde [REDACTED] liganden, nanoparticles, nanoparticles met immuun [REDACTED] stoffen/ [REDACTED] etc.) combineren met ziekte relevante antigenen (zoals [REDACTED] of proteoglycanen⁸ in het geval van chronische ontstekingen of artritis specifiek) en dieren behandelen tijdens de ziekte. Het voordeel van deze aanpak is dat een directe vaccinatie therapie niet afhankelijk is van celkweek in gespecialiseerde ziekenhuizen en dus breder ingezet kan worden en

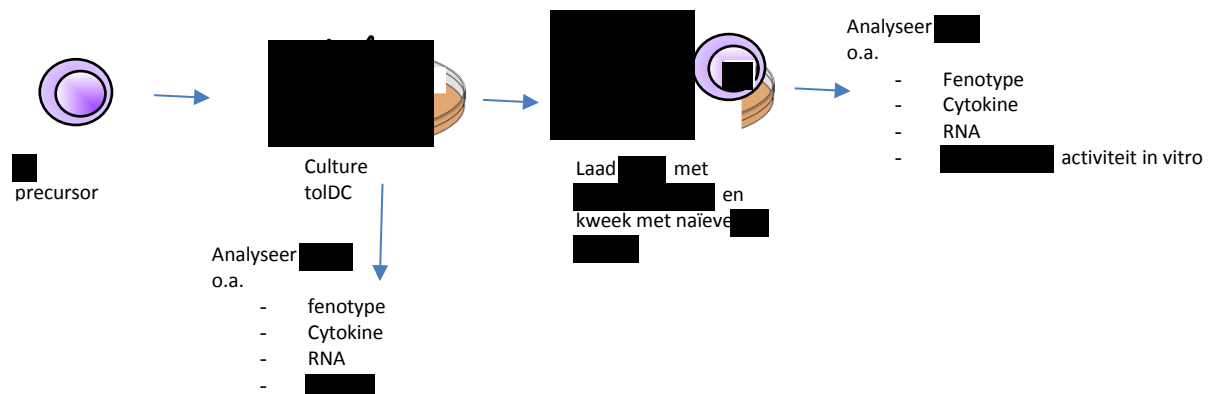


mogelijk meer patiënten kan bereiken. Met de kennis verkregen uit de andere twee delen kan gericht gekeken worden welke [redacted] cellen getarget moeten worden met een vaccin.

Figuur 2:

Schematische weergave van [redacted] kweek en therapie en de interactie tussen de verschillende bijlagen. [redacted] voorloper cellen worden geïsoleerd, in vitro gekweekt tot [redacted], [redacted] met [redacted]. Na analyse in bijlage 1 worden de cellen ingespoten in muizen met een chronische ontsteking in bijlage 2. In bijlage 3 wordt de mogelijkheid van celvrije therapie onderzocht door [redacted] in vivo te bereiken met behulp van een [redacted] vaccin.

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



Deel 1: In dit deel zullen we [redacted] organen uit naïeve muizen gebruiken als donor cellen voor het kweken van [redacted] in vitro. Het fenotype van de [redacted] zal beoordeeld worden met behulp van verschillende analyses zoals fluorescence activated cell sorting (FACS), microarray, luminex (voor eiwit en RNA productie), quantitative polymerase chain reaction (qPCR) en [redacted]. De in vitro functionaliteit zal beoordeeld worden met behulp van [redacted] cellen uit native donor muizen. Door [redacted] met een antigeen en [redacted] cellen te stimuleren kan beoordeeld worden wat voor [redacted] cel reactie [redacted] in vitro induceren.

Figuur 3: schematische weergave van de [redacted] in bijlage 1.

[redacted] precursors uit [redacted] in vitro, vervolgens worden deze direct geanalyseerd op uiterlijke kenmerken en vervolgens functioneel geanalyseerd door te kijken of ze

..... . Dit wordt geanalyseerd door de te bestuderen op fenotype, cytokine productie en ook capaciteit in een assay.

Deel 2: In het tweede deel zal bekeken worden of zoals gekweekt in het eerste deel, functioneel zijn in vivo tijdens chronische ontstekingsreacties. Hier worden maximaal twee kweekmethoden gekozen, op basis van de effectiviteit van de om in vitro cellen te induceren. In eerst instantie zullen we dit in het proteoglycaan geïnduceerde artritis model testen. In dit model voor chronische artritis in de muis wordt een immuunreactie tegen het kraakbeen opgewekt door inspuiten van het kraakbeeneiwit proteoglycaan en met dit model hebben Verder hebben we de beschikking over muizen met een specificiteit voor het ziekte inducerend proteoglycaan.

Hier zullen we verschillende routes van toediening (intradermaal, s.c., i.v. etc.), timing, frequenties (enkelvoudig of meervoudig) en de verschillende antigenen (bijvoorbeeld) met elkaar vergelijken en uitlezen op effectiviteit om de ontsteking te onderdrukken. Hierbij willen we ook het mechanisme van de therapeutische effectiviteit in kaart brengen met behulp van cel naar de dieren met artritis en kijken of er inderdaad worden en mogelijk de ziekte wordt door deze cellen. Door de verschillende cellen met congene markers te gebruiken en voor het transfereren te labelen met verschillende vitale fluorescente labels kunnen we deze in vivo vervolgen en aan het einde van het experiment in vitro verder analyseren. De protocollen die het meest effectief blijken willen we vervolgen ook testen in andere modellen voor chronische ontsteking zoals bijvoorbeeld en atopische dermatitis¹⁶. Voor het model is gekozen omdat dit een model is waarin de afweerreactie bestudeerd kan worden. Dit model zal in nauwe samenwerking met een onderzoeksgroep in worden uitgevoerd, omdat deze groep ervaring heeft met dit model. Het dermatitis model is gekozen omdat dit een chronisch ontstekingsmodel is waarmee ervaring is binnen de vakgroep en omdat dit model een ander type ontsteking geeft dan artritis. Artritis is een meer Th1 type ontsteking, terwijl dermatitis een meer gemengd Th2, Th1 beeld geeft. Door juist verschillende typen ontsteking te kiezen kunnen deze experimenten de vraag beantwoorden of therapie voor meerdere chronische ontstekingen gebruikt kan worden in de toekomst. In het geval van onderzoek bij dermatitis zal het ziekte inducerend antigeen (.....) vergeleken worden met eiwit.

Deel 3: In het laatste deel willen we een vaccin testen. Het is bekend dat via bepaalde routes in vivo getarget kunnen worden. Bijvoorbeeld via of vaccinatie routes. Het is echter moeilijk om tijdens chronische ontsteking deze te bereiken. Om dit te verbeteren willen we een vaccin combineren met een adjuvans. De keuze voor de adjuvantia zal gemaakt worden op basis van literatuur en eerdere resultaten vanuit de onderzoeksgroep. Een voorbeeld is deze induceren een in vitro ^{10,11}. Door te combineren met via een route is het mogelijk een vaccin te maken. Naast willen we ook liganden, PLGA en andere al dan niet geladen met anti-inflammatoire hulpstoffen (denk hierbij aan antilichamen of tegen ontstekingsmediatoren zoals) of nieuwe adjuvantia testen. Ook in dit deel van de studie zullen we het mechanisme van het vaccin en de effectiviteit van cel inductie monitoren met behulp van de verschillende muismodellen. Tevens zal met behulp van verschillend conditionele knock-out muizen waarin specifieke cellen kunnen worden uitgeschakeld gekeken worden welke in vivo essentieel is voor het bereiken van een effect. Wanneer het effectief is als vaccin willen we dit herhalen in andere chronische ontstekingsmiddelen zoals, transplantatie en atopische dermatitis. Dit zijn ook modellen waar in de een belangrijke rol speelt tijdens de ontstekingen.

Referenties:

1. Sakaguchi, S. (2004). Naturally arising CD4⁺ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.*, 22, 531-562
2. Ohnmacht, C., Pullner, A., King, S. B., Drexler, I., Meier, S., Brouck, T., & Voehringer, D. (2009). Constitutive ablation of dendritic cells breaks self-tolerance of CD4 T cells and results in spontaneous fatal autoimmunity. *The Journal of experimental medicine*, 206(3), 549-559.
3. Hilkens, C. M., Isaacs, J. D., & Thomson, A. W. (2010). Development of dendritic cell-based immunotherapy for autoimmunity. *International reviews of immunology*, 29(2), 156-183.
4. Hilkens, C. M. U., & Isaacs, J. D. (2013). Tolerogenic dendritic cell therapy for rheumatoid arthritis: where are we now?. *Clinical & Experimental Immunology*, 172(2), 148-157.
5. Stoop, J. N., Harry, R. A., von Delwig, A., Isaacs, J. D., Robinson, J. H., & Hilkens, C. M. (2010). Therapeutic effect of tolerogenic dendritic cells in established collagen-induced arthritis is associated with a reduction in Th17 responses. *Arthritis & Rheumatism*, 62(12), 3656-3665.
6. Spiering, R., Van Der Zee, R., Wagenaar, J., Kapetis, D., Zolezzi, F., Van Eden, W., & Broere, F. (2012). Tolerogenic dendritic cells that inhibit autoimmune arthritis can be induced by a combination of carvacrol and thermal stress. *PLoS one*, 7(9), e46336.
7. Manicassamy, S., & Pulendran, B. (2011). Dendritic cell control of tolerogenic responses. *Immunological reviews*, 241(1), 206-227.
8. Broere, F., Wieten, L., Koerkamp, E. I. K., van Roon, J. A., Guichelaar, T., Lafeber, F. P., & van Eden, W. (2008). Oral or nasal antigen induces regulatory T cells that suppress arthritis and proliferation of arthritogenic T cells in joint draining lymph nodes. *The Journal of Immunology*, 181(2), 899-906.
9. Spiering, Rachel, et al. "DEC205+ Dendritic Cell-Targeted Tolerogenic Vaccination Promotes Immune Tolerance in Experimental Autoimmune Arthritis." *The Journal of Immunology* 194.10 (2015): 4804-4813.
10. Keijzer, Chantal, et al. "PLGA nanoparticles enhance the expression of retinaldehyde dehydrogenase enzymes in dendritic cells and induce FoxP3+ T-cells in vitro." *Journal of Controlled Release* 168.1 (2013): 35-40.
11. Keijzer, Chantal, et al. "PLGA, PLGA-TMC and TMC-TPP nanoparticles differentially modulate the outcome of nasal vaccination by inducing tolerance or enhancing humoral immunity." *PLoS One* 6.11 (2011): e26684.
12. van Herwijnen, Martijn JC, et al. "Regulatory T cells that recognize a ubiquitous stress-inducible self-antigen are long-lived suppressors of autoimmune arthritis." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109.35 (2012): 14134-14139.
13. Helft, Julie, et al. "GM-CSF mouse bone marrow cultures comprise a heterogeneous population of CD11c+ MHCII+ macrophages and dendritic cells." *Immunity* 42.6 (2015): 1197-1211.
14. Keijzer, Chantal, et al. "Treg inducing adjuvants for therapeutic vaccination against chronic inflammatory diseases." *Frontiers in immunology* 4 (2013).
15. de Oliveira, Vivian L., et al. "Humanized mouse model of skin inflammation is characterized by disturbed keratinocyte differentiation and influx of IL-17A producing T cells." (2012): e45509.
16. Spengel, Jonathan M., et al. "Roles of TH1 and TH2 cytokines in a murine model of allergic dermatitis." *Journal of Clinical Investigation* 103.8 (1999): 1103.
17. Van Eden, Willem, Ruurd Van der Zee, and Berent Prakken. "Heat-shock proteins induce T-cell regulation of chronic inflammation." *Nature Reviews Immunology* 5.4 (2005): 318-330.
18. Glant, Tibor T., Alison Finnegan, and Katalin Mikecz. "Proteoglycan-induced arthritis: immune regulation, cellular mechanisms, and genetics." *Critical Reviews in Immunology* 23.3 (2003).
19. Hawkins, Penny, et al. "Applying refinement to the use of mice and rats in rheumatoid arthritis research." *Inflammopharmacology* 23.4 (2015): 131-150.
20. Hish Jr, Gerald A., et al. "Effects of Analgesic Use on Inflammation and Hematology in a Murine Model of Venous Thrombosis." *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS* 53.5 (2014): 485.

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.

Deel 1: De data uit deel 1 zullen gebruiken om de kweek methoden voor deel 2 te optimaliseren.
 Deel 2: slechts twee van de protocollen die in deel 1 het meest effectief zullen ook daadwerkelijk in vivo getest worden op therapeutische effectiviteit. De meest zal vervolgens in deel 1 in nog meer detail bekeken worden met behulp van microarray analyse
 Deel 3: De kennis van de eigenschappen van uit 1 en 2 zal bijdragen aan mogelijkheid om in vivo te karakteriseren, daarnaast zullen de kritische eigenschappen voor een helpen in de zoektocht naar een effectief vaccin.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	In vitro kweek van ████████ en analyse van fenotype en functie
2	██████ therapie in chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten
3	Ontwikkelen van een ████████ vaccin voor chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10800	
Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Universiteit Utrecht	
Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
<i>Gebruik de volgnummers</i>	1	In vitro kweek van [REDACTED] en analyse van fenotype en functie

1.1

1.2

1.3

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.

In auto-immuun ziekten valt het immuunsysteem cellen van het lichaam zelf aan. De belangrijkste reden voor dit probleem is dat de regulatie van het immuunsysteem niet goed meer werkt. Om deze regulatie weer op orde te krijgen kunnen [REDACTED] worden gebruikt. Deze [REDACTED] cellen zijn in het lichaam van groot belang bij het herstellen van de regulatie en tolerantie. Eén van de mechanismen die de [REDACTED] kunnen gebruiken is het induceren van [REDACTED] cellen [REDACTED]. Op deze manier kunnen specifieke immuun responsen worden onderdrukt.

In het eerste deel zullen we verschillende in vitro kweek methoden om [REDACTED] te kweken met elkaar vergelijken. Hiertoe worden [REDACTED] precursors geïsoleerd uit naïeve muizen die worden gedood zonder voorafgaande handelingen en vervolgens worden de cellen gekweekt in vitro.

De effectiviteit van de [REDACTED] in vitro zal uitgelezen worden met behulp van FACS, PCR en luminex, waarbij expressie van oppervlakte markers, [REDACTED] en gebruik van verschillende transcriptie factoren wordt beoordeeld. Daarnaast zal ook worden bestudeerd hoe effectief de [REDACTED] zijn in het induceren van [REDACTED] cellen. Dit zal worden getest via een co-culture van de [REDACTED] met [REDACTED] receptor transgene [REDACTED] cellen welke een bekende specificiteit hebben, zoals weergegeven in figuur 3 van de projectaanvraag. [REDACTED] cellen met een [REDACTED] cel receptor worden geïsoleerd uit naïeve muizen specifiek voor de [REDACTED] die gedood worden zonder voorafgaande handelingen. Daarnaast is er momenteel geen helder raamwerk bekend waaraan een veilige effectieve [REDACTED] moet voldoen, de zogeheten [REDACTED] vingerafdruk. Deze vingerafdruk zullen we in kaart brengen van de 2 meest effectieve kweek methoden, die het best [REDACTED] cellen induceren in vitro en tevens effectief zijn in vivo (getest in bijlage 2). Het in kaart brengen zal gebeuren door een uitgebreide analyse uit te voeren met behulp van microarrays en RNA sequencing. Deze vraagstukken zullen beantwoord worden door middel van de experimenten zoals beschreven in deze bijlage.

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.

Alle dieren in dit deel van de projectaanvraag zullen zonder voorafgaande handelingen worden gedood en vervolgens zullen de lymfoïde organen gebruikt worden voor het isoleren van [REDACTED] cellen en [REDACTED] cellen.

Alle analyses zullen in vitro worden uitgevoerd.

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

Er is overwogen hoeveel dieren er nodig zijn om een aan te tonen effect te bewijzen (true difference of the means). De calculatie van de hoeveelheid dieren is gedaan met de software behandeld in de proefdiercursus (<http://www.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/>). De parameters zijn per primaire uitkomst parameter voor de power analyse zijn toegelicht hieronder.

B. De dieren

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

Voor deze experimenten zal als diersoort de muis (tussen 6-12 weken oud) gebruikt worden. In eerdere experimenten is gebleken dat het kweken van [REDACTED] uit beenmerg van muizen van deze leeftijd het meest succesvol is en de hoogste opbrengst gegenereerd. Als donor muizen voor de [REDACTED] wordt gebruik gemaakt veel gebruikte muizen stammen zoals Balb/c, C57BL of F1 van beide stammen. Deze dieren worden aangekocht van erkende proefdierleveranciers. Deze stammen worden gebruikt omdat op deze manier de data vergelijkbaar zijn met data uit de literatuur en omdat deze stammen ook gevoelig zijn voor de ontstekingsmodellen beschreven in bijlage 2. Zo wordt het proteoglycaan artritis model geïnduceerd in Balb/c en beide stammen zijn gevoelig voor dermatitis, maar met een hogere incidentie in C57BL model. De [REDACTED] muizen die hieronder besproken worden zijn afkomstig uit eigen fok. De muizen zijn transgeen voor een [REDACTED] receptor specifiek voor bijvoorbeeld [REDACTED] of ovalbumine, de relevante eiwitten voor de modellen die in bijlage 2 getest zullen worden. Voor de donor dieren kunnen per experiment zowel vrouwelijke als mannelijke dieren worden ingezet; er is daarbij geen voorkeur voor een van beide geslachten; de leverancier mag bepalen welke dieren geleverd worden.

Om [REDACTED] te kweken zijn beenmerg donoren nodig aangezien de [REDACTED] worden gekweekt.

In het project willen we maximaal 10 verschillende (reeds in de literatuur beschreven) [REDACTED] protocollen vergelijken³. Verschillende kweekmethoden geven verschillende type cellen, en van enkele in het verleden beschreven [REDACTED] kweekprotocollen is bekend dat deze [REDACTED] zijn, maar niet functioneel [REDACTED] kunnen induceren tijdens ontsteking⁶. Juist dit laatste is cruciaal om effectief als [REDACTED] therapie ingezet te kunnen worden bij patiënten. Door meerdere protocollen en de verschillende cellen die tijdens de kweek ontstaan gedetailleerd te onderzoeken in vitro onder artificiële ontstekingscondities (toevoeging van o.a. ontstekingsmediatoren aan het kweekmedium) voor we deze in vivo testen willen we het aantal gebruikte dieren zoveel mogelijk beperken en alleen de meest veelbelovende cellen in vivo testen.

In het verleden is gebleken dat we voor het opzetten van een nieuwe kweek methode ongeveer 5 muizen nodig hebben als beenmerg donor ($5 \times 10 = 50$ muizen). Dit aantal is gebaseerd op de vergelijking van verschillende kweekmedia om de meest optimale cel aantallen na afloop van de kweek te verkrijgen, juist het kweken in aanwezigheid van [REDACTED] condities zorgt voor verminderde celopbrengsten (persoonlijke observatie). Naast het optimaliseren van de kweek condities is ook aantal cellen dat na afloop van de kweek beschikbaar is belangrijk voor analyse van oppervlakte markers, deze oppervlakte markers (bijvoorbeeld [REDACTED]) geven inzicht of de kweek daadwerkelijk [REDACTED] cellen heeft voortgebracht¹³.

Om voldoende [REDACTED] te kweken voor de analyse van de oppervlakte markers met behulp van FACS, cytokine productie en RNA met qPCR of [REDACTED] hebben we 5 donor dieren nodig. Dit is op basis van cel opbrengsten zoals we die in het verleden bepaald hebben binnen onze vakgroep na het kweken van [REDACTED]. Het mogelijk is dat niet alle kweekmethoden een zelfde hoeveelheid cellen zullen opleveren maar dit is vooraf niet met zekerheid vast te stellen.

Door ervaring uit eerdere experimenten met dergelijke parameters als cytokine productie en qPCR resultaten gaan we uit van een variatie (sigma (standaarddeviatie) tweezijdig) in uitkomst tussen de experimentele groepen van minimaal 30%. De power wordt vastgesteld op 90% om de kans op een type II fout te verkleinen, dit gezien de variatie.

Het aan te tonen effect (true difference of means, effect size) tussen de testgroepen wat we willen bereiken is 50%. Het betrouwbaarheidsinterval (alfa) wordt gesteld op 5% omdat we in deze experimenten voornamelijk geïnteresseerd zijn in het effect ten opzichte van de controle en niet tussen de groepen onderling. Wanneer we deze gegevens invullen in de software behandeld in de proefdierkunde cursus (<http://www.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/>) geeft dit dat we per analyse 9 experimentele eenheden moeten gebruiken. ($9 \times 5 \times 10 = 450$ muizen)

Maximaal 2 meest veelbelovende kweekprotocollen zullen vervolgens worden getest in vivo in deel 2. Voor het transfereren van [REDACTED] met verschillende doses en frequenties zoals beschreven in deel 2 zullen gemiddeld [REDACTED] per ontvanger muis worden door gespoten. Uit een donor muis kunnen we ongeveer [REDACTED] kweken dus dit komt neer op 10 ontvanger dieren per donor en voor de 1176 ontvanger dieren in deel 2 betekend dit dus **118** muizen in totaal.

Ook zal van deze 2 methoden een microarray of een RNAseq analyse worden uitgevoerd op de [REDACTED] om een gedetailleerd beeld te krijgen van de genen die specifiek zijn voor [REDACTED]. Om voldoende RNA te verkrijgen voor de microarray analyse van de meest effectieve [REDACTED] (en de benodigde positieve en negatieve controles) zijn $10 \cdot 10^6$ cellen nodig van minimaal 3 afzonderlijke kweken. Het aantal cellen is gebaseerd op de benodigde hoeveelheid RNA die uit de cellen geïsoleerd kan worden voor de analyse en de kwaliteitscontrole vooraf. De resultaten van drie afzonderlijke kweken worden vergeleken om de uniformiteit en reproduceerbaarheid van de resultaten te bevestigen. Zonder de analyse van 3 afzonderlijke kweken kunnen de resultaten het gevolg zijn van variatie tussen de kweken en niet specifiek voor de vingerafdruk van de [REDACTED].

Inclusief alle controles (met en zonder [REDACTED] protocol, met en zonder pro-inflammatoire cytokines, met en zonder maturatie en negatieve controle) zijn dit 7 condities. In totaal zijn hiervoor dus 6 dieren nodig per conditie dus **12** dieren in totaal.

Naast donoren voor het kweken van de [REDACTED] zijn ook donor dieren nodig om de effectiviteit van de [REDACTED] te analyseren op basis van [REDACTED] activatie en differentiatie. Hiervoor zullen we [REDACTED] muizen gebruikt worden. Uit eerdere experimenten is gebleken dat uit 1 donor muis ongeveer [REDACTED] [REDACTED] cellen geïsoleerd kunnen worden. Om het effect van [REDACTED] op de inductie van [REDACTED] cellen te onderzoeken zullen we [REDACTED] cellen samen kweken met [REDACTED] en vervolgens analyseren op oppervlakte markers, cytokines en expressie van transcriptie factoren. Op basis van eerdere experimenten weten we dat voor deze analyses ongeveer [REDACTED] cellen nodig zijn per conditie (= 3 donoren). Het aantal condities dat we willen testen zijn de 10 verschillende [REDACTED] kweek protocollen in aan- of afwezigheid van proinflammatoire cytokines (om ontsteking na te bootsen in vitro), in aanwezigheid van enkele [REDACTED] (om verschillende infecties na te bootsen) en in aanwezigheid van [REDACTED] [REDACTED] zoals dit ook bij humane [REDACTED] wordt gebruikt voordat de cellen ingespoten worden bij de patiënten^(3,4).

In totaal komt dit dus neer op 5 verschillende condities * 10 [REDACTED] protocollen * 3 [REDACTED] donoren = **150** [REDACTED] donor muizen.

Aantal dieren:

Opzet: 50

Analyse oppervlakte markers etc.: $10 \times 5 \times 9 = 450$

[REDACTED] in vivo: 118 Microarray: 12 muizen

■ cel donoren: $5 \cdot 10^3 = 150$ Totaal
aan tal dieren:
WT: 630 muizen
Tg: 150 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.

Door alle verschillende [REDACTED] kweekmethoden uit te testen in vitro en te kijken of de [REDACTED] onder deze condities [REDACTED] cellen kunnen induceren kunnen we het aantal verschillende [REDACTED] dat we in vivo zullen testen in modellen voor chronische ontsteking verminderen.

Het gebruik van een [REDACTED] cellijn is niet mogelijk. [REDACTED] cellijnen zijn zogenaamde 'end-stage' cellen en de bekende cellijnen ([REDACTED]) zijn allen representatief voor [REDACTED] zoals die in de milt van de muis gevonden niet representatief voor [REDACTED].

Voor de muis zijn bij ons geen [REDACTED] cellijnen bekend die kunnen differentiëren tot [REDACTED] cellen, omdat deze cellen niet naïef zijn. Het gebruik van [REDACTED] cel hybridoma's is ook niet wenselijk omdat we dan alleen [REDACTED] activatie kunnen analyseren en geen [REDACTED] [REDACTED].

In deze dierproef kiezen we muizen stammen die relevant zijn in het verdere onderzoek als ook het gebruik van [REDACTED] muizen om in meer detail het effect op [REDACTED] cel differentiatie te kunnen bekijken. Vanwege de complexiteit van de immuunrespons is het niet mogelijk dit te vervangen door bijvoorbeeld computer modellen. In alle gevallen zal eerst gedegen literatuur onderzoek gedaan worden om de meest veelbelovende [REDACTED] protocollen te selecteren.

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.

Alle dieren zullen zonder voorafgaande handelingen gedood worden volgens de geldende richtlijnen. De dieren zullen in groepen worden gehuisvest conform geldende normen van huisvesting en kooiverrijking.

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 valt? Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Er worden geen andere vormen van welzijnsaantasting voorzien.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn. n.v.t.

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

n.v.t.

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?

X 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.

Het ongerief van alle dieren in dit deel worden geclassificeerd als licht. Alle dieren gebruikt in deze dierproef worden zonder handelingen gedood en bij fok van [REDACTED] muizen die in deze bijlage beschreven zijn geen klinische verschijnselen bekend of beschreven.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

☐ Nee

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

Het doden van de dieren is noodzakelijk om donor cellen te verzamelen voor het uitvoeren van de experimenten zoals beschreven

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

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



Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10800				
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Universiteit Utrecht				
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	<table> <tr> <th>Volgnummer</th> <th>Type dierproef</th> </tr> <tr> <td>2</td> <td>■■■■■■ therapie in chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten</td> </tr> </table>	Volgnummer	Type dierproef	2	■■■■■■ therapie in chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten
Volgnummer	Type dierproef					
2	■■■■■■ therapie in chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten					

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.

In dit deel van het project zal gekeken worden naar de effectiviteit van ■■■■■ als gekweekt onder deel 1 in het onderdrukken van een chronische ontsteking met de nadruk op het therapeutisch effectiviteit. In de literatuur zijn meerdere experimenten beschreven waarin gekeken is naar het effect van ■■■■■ therapie om chronisch ontstekingen voorkomen, maar nog weinig data is beschikbaar over het onderdrukken **tijdens** de ziekte. In dit deel zullen we kijken wat het ideale behandel protocol is van een chronisch ontsteking zoals artritis, met behulp van het proteoglycaan geïnduceerde artritis model^{o.a.} ■■■■■. Dit is een chronisch model waarbij het ziekte verloop intermitterend en relatief mild verloopt, vergelijkbaar als bij de mens. We hebben gekozen voor dit chronische model om juist het effect tijdens chronische ontsteking van ■■■■■ therapie te onderzoeken. ■■■■■

Tevens zullen we in dit model ook het mechanisme onderzoeken met behulp van ■■■■■ muizen specifiek voor het ziekte inducerend antigeen, proteoglycaan. Door zowel de effector ■■■■■ cellen (die de ziekte veroorzaken) als naïeve ■■■■■ cellen te labelen met een zogeheten 'vital dye' kunnen we deze cellen terug vinden in het dieren en met behulp van o.a. FACS analyse bepalen hoe de cellen beïnvloed zijn door de tolDC therapie. Op deze manier kunnen we beoordelen of ■■■■■ ook in vivo ■■■■■ cellen antigeen specifiek kunnen ■■■■■

Om ■■■■■ cellen te induceren zullen we gebruik maken van peptiden die tolerantie kunnen induceren. Hierbij zullen we een proteoglycaan peptide gebruiken, waarvan bekend is dat het ziekte geïnduceerd tegen proteoglycaan kan voorkomen⁸. Maar ook een eerder door ons geïdentificeerd peptide ■■■■■ kan antigeen specifieke regulerende ■■■■■ cellen induceren in het proteoglycaan geïnduceerde artritis muis model onafhankelijk van het ziekte inducerend antigeen ■■■■■. De hypothese is dat dit peptide antigeen specifieke regulerende ■■■■■ cellen induceert tegen verschillende

chronische ontstekingen. Initiële experimenten in transplantatie modellen in de muis laten inderdaad [] cel gemedieerde bescherming zien []).

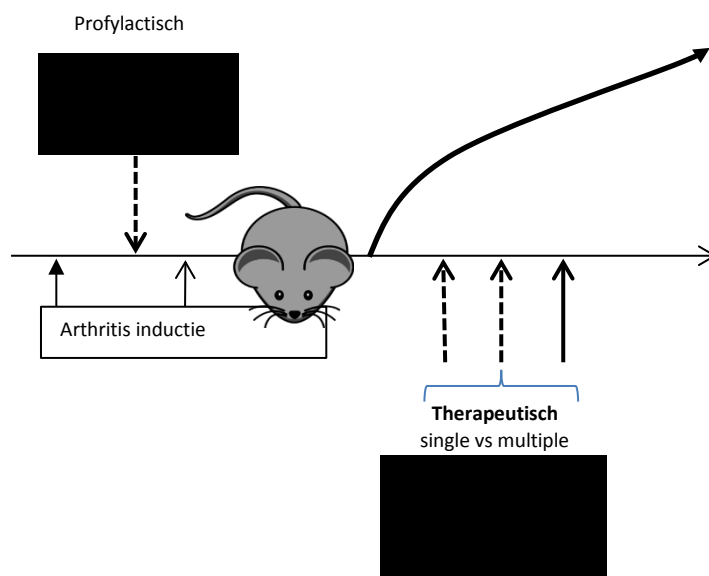
Juist dit aspect van [] therapie in combinatie met een peptide dat antigeen specifieke regulerende [] in verschillende chronische ontstekingsziekten zou van grote meerwaarde zijn voor het ontwikkelen van [] therapie voor humane patiënten. Om te onderzoeken of de hypothese correct is willen we 1 type [] in 1 dosering die effectief is gebleken in het artritis model testen in andere ontstekingen modellen. Aangezien artritis een overwegend Th1 type ontsteking is hebben we gekozen om een chronisch (auto-immuun) ontstekingen model te nemen met een ander type ontsteking, het dermatitis model. Dermatitis een meer gemengde Th2 ontsteking, door juist duidelijk verschillende typen ontsteking te kiezen kunnen deze experimenten de vraag beantwoorden of [] therapie voor meerdere chronische ontstekingen gebruikt kan worden in de toekomst. Als derde model willen we de mogelijke translatie naar de humane patiënt beter in kaart brengen en hiervoor hebben we gekozen voor een zogeheten [] model. In dit wordt gebruik gemaakt van een [] muis waarin [] immuuncellen worden [] om deze muis een [] immuunsysteem te geven en vervolgens te kijken naar een [] afstotingen. Ook in dit model is de ontsteking overwegend een Th1 type ontsteking. De [] therapie zal alleen in de laatste 2 genoemde modellen getest worden als blijkt dat deze effectief is in het onderdrukken van de ziekte in het artritis model.

In deel 2 zullen we de volgende vragen beantwoorden:

2a: Welke, dosis, frequentie, route, en timing van [] therapie is het meest efficiënt in het onderdrukken van chronisch ziekte. Als referentie zullen we een eenmalige profylactische (voor ziekte inductie) voor de toediening van [] nemen als vergelijking.

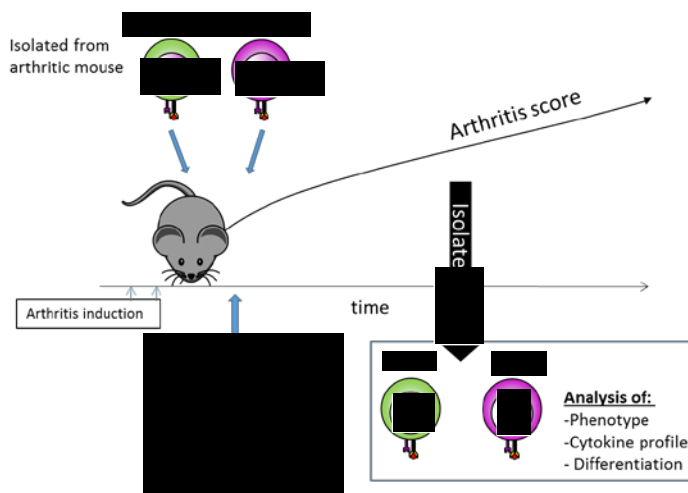
2b: Is [] therapie in staat om in vivo antigeen specifieke [] cellen te induceren en [] cellen te onderdrukken?

2c: werkt [] therapie ook in andere chronisch ontstekingsmodellen?



Figuur 1: [] worden op verschillende tijdstippen en in verschillende doses door gespoten.

Profylactisch zal slechts 1 dosis gekozen worden voordat de dieren ziekte ontwikkelen. Therapeutische toediening bij andere dieren zal starten zodra de eerste ziekte verschijnselen zichtbaar zijn, ongeveer een week na de 2^e immunisatie. Vervolgens zal het effect op artritis verloop worden beoordeeld door de dieren meerdere keren per week te beoordelen op artritis verschijnselen.



Figuur 2: Artritis wordt geïnduceerd door 2 injecties met humaan proteoglycaan in met adjuvans DDA. Vervolgens worden [redacted] cellen uit verschillende muizen gelabeld met verschillende "Vital Dyes" en door gespoten net als de [redacted]. Door [redacted] cellen door te spuiten kan het effect op [redacted] cellen worden geanalyseerd en de [redacted] cellen geven een beeld van de [redacted] cellen.

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.

- Het artritis model:
- Proteoglycaan geïnduceerde artritis (PGIA) zal geïnduceerd worden met 2 injecties van proteoglycaan uit kraakbeen in DDA. Hiervoor zullen vrouwelijke dieren gebruikt worden op een balb/c achtergrond. Deze dieren hebben een hogere gevoeligheid voor het ontwikkelen van artritis waardoor een hogere incidentie wordt gehaald, minder injecties en minder dieren nodig zijn [redacted].
- De twee injecties worden i.p. toegediend met een tussen periode van 21 dagen. Vervolgens worden de dieren 2x per week bekeken op de ontwikkeling van artritis verschijnselen (roodheid en zwelling van de pootjes). Indien de dieren artritis krijgen wordt het klinisch onderzoek geïntensiveerd afhankelijk van de ernst van het verloop.
- Tijdens artritis zal bloed afgenomen worden doormiddel van een wang prik, waarbij maximaal 100 ul er muis wordt afgenomen en maximaal 1 x per 3 weken.

Dieren die behandeld worden met [redacted] therapie zullen tussen de 1 en maximaal 5 injecties krijgen afhankelijk van welke experimentele groep de dieren zitten. Deze injecties met tussen de [redacted] en [redacted] zullen i.v., i.p., s.c. [redacted] (zoals bij de mens in de recente fase I trial van [redacted] gegeven worden. Voor profylactische controle behandeling zullen dieren eenmalig ongeveer [redacted] krijgen vlak voor de 2^e immunisatie voor artritis inductie.

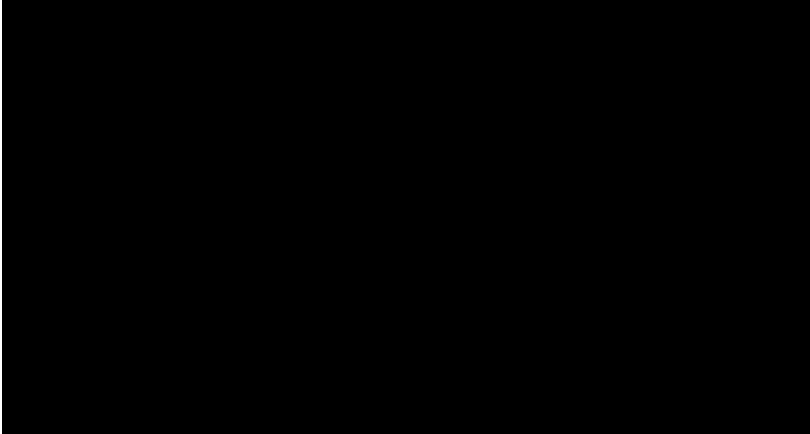
Dieren uit deel 2b waarbij het effect op [redacted] cellen wordt bekeken zullen een dag voor de [redacted] therapie [redacted] cellen gelabeld met een vital dye i.v. krijgen toegediend. In deze experimenten zullen alleen effectieve routes en een eenmalige toediening van [redacted] gebruikt worden.

In het laatste deel zal gekeken worden naar de effectiviteit van [redacted] therapie in andere modellen voor chronische ontsteking. Hierbij zal 1 dosis [redacted] gekozen worden die effectief was in artritis (deel 2a) en met een zo laag mogelijk frequentie van doorspuiten. Ook in de andere modellen van chronische ontsteking zal het ziekte verloop op meerdere dagen per week worden vervolgd (minimaal 2x per week).

De andere modellen voor chronische ontsteking waar mee gewerkt zal worden zijn een gehumaniseerd transplantatie model en atopische dermatitis.

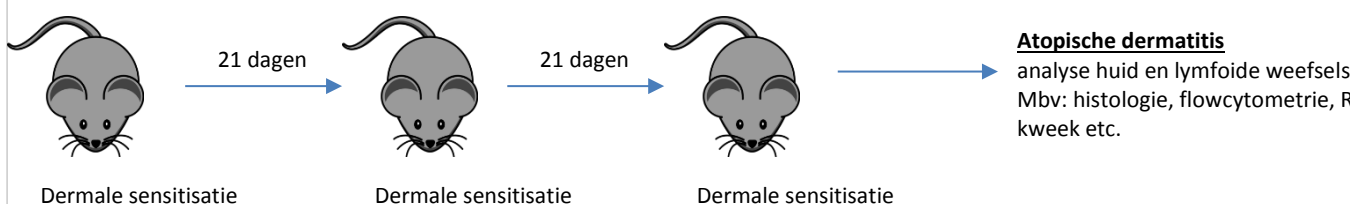
Het [redacted] model wordt uitgevoerd in samenwerking met de universiteit Nijmegen waar het

model ontwikkeld is. In dit model wordt humane huid getransplanteerd op een immunodeficiënte muis onder narcose. Na 3 weken als de graft geaccepteerd is worden humane [] cellen doorgespoten en op dat moment zal ontsteking ontstaan in het transplantaat. Vervolgens zal de therapie worden ingezet door [] door te spuiten (in dit geval natuurlijk []). Deze dieren worden vervolgens regelmatig (tot zelfs dagelijks) beoordeeld op afstoting van de huid. Na 3 weken zal de huid en de lymfoïde organen van de dieren geïsoleerd worden en beoordeeld op ontsteking, infiltraat en [] zoals te meten aan cytokine productie en transcriptie factor gebruik.



Figuur 3: Schematische weergave van het [] model. [] huid wordt onder narcose getransplanteerd op een [] muis. Na 3 weken is de huid graft geaccepteerd en wordt een [] immuunsysteem in de muis gebracht door het inspuiten van allergenen perifere bloed cellen van een bloeddonor. Gedurende 3 weken wordt gekeken naar het ontwikkelen van ontsteking. Na 3 weken worden de graft en de lymfoïde organen geïsoleerd en de huidontsteking en immuunrespons geanalyseerd met behulp van flowcytometrie en histologie ¹⁵

Het tweede model is een dermatitis model, hiervoor is gekozen omdat het hier een gemengde Th2/Th1 gemedieerde response betreft en bij artritis of transplantatie met name een Th1/Th17 response en dit zal laten zien of [] therapie breed inzetbaar is bij een disbalans van het immuunsysteem. In dit model wordt de ziekte geïnduceerd met 2 tot 3 dermale sensitisaties met het allergeen in adjuvans met 3 weken tussen tijd. Na afloop wordt de huid geanalyseerd op infiltratie van ontstekingscellen en worden de lymfoïde organen geïsoleerd om de inductie van [] cellen te analyseren tegen het allergeen met o.a. kweek en flowcytometrie¹⁶. De [] therapie zal worden toegediend tussen de 2^e en de 3^e.



Figuur 4: schematische weergave van het dermatitis model.

Muizen worden geschoren onder anesthesie en dermaal gesensitiseerd. Sensitisatie wordt 3 maal herhaald met tussenpozen van 3 weken en vervolgens worden huid en lymfoïde organen gesoleerd voor analyse op ontwikkelen van [] celen en huidontsteking.

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

Er is overwogen hoeveel dieren er nodig zijn om een aan te tonen effect te bewijzen (true difference of the means). De calculatie van de hoeveelheid dieren is gedaan met de software behandeld in de proefdiercursus (<http://www.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/>). De aannames en vergelijkingen zijn onder B nader

toegelicht.

B. De dieren

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

In dit deel van het project zal gebruik gemaakt worden van muizen afkomstig van commerciële proefdierleveranciers of vanuit eigen fok indien het specifieke transgene muizen betreft. In alle gevallen zullen volwassen dieren van beide sexen gebruikt worden waarbij in het algemeen dieren tussen de 6-12 weken aangekocht zullen worden, omdat in deze dieren het immuunsysteem volledig ontwikkeld is. Alleen in het geval van artritis inductie zal gekozen worden voor muizen van meer dan >16 weken oud en bij voorkeur gepensioneerde fokvrouwen, omdat deze de hoogste gevoeligheid hebben voor het ontwikkelen van artritis¹⁸.

Aantallen deel 2a:

In dit deel willen we maximaal 3 verschillende doses, maximaal 3 verschillende frequenties (1x, 3x of 5x), meerdere routes (maximaal 3) testen als therapeutische mogelijkheden en dat vergelijken met een enkele profylactische dosis. Er is gekozen voor verschillende doses en verschillende frequentie om te kijken of hoger of herhaaldelijk doseren de effectiviteit kan verhogen. In de literatuur zijn meerdere routes beschreven voor het toedienen van celtherapie, het is echter nog niet bekend of het effect van celtherapie afhankelijk is van de route van toedienen.

Hierbij willen we 2 typen [] die in bijlage 1 effectief [] cellen induceerde in vitro testen op effectiviteit om in vivo [] cellen te induceren en chronische ontsteking te onderdrukken.

Om de effectiviteit te bepalen worden [] vergeleken met conventionele immature [] in aan- en afwezigheid van het ziekte inducerend antigeen (proteoglycaan) of een anti-inflammatoir antigeen ([]). Om tolDCs te matureren en stabiliseren wordt in de literatuur gebruik gemaakt van een non-toxisch [], ter controle zullen de tolDCs ook behandeld worden met dit humaan [] ligand, hiermee beantwoorden we de vraag of dit inderdaad de effectiviteit en stabiliteit in vivo verhoogd..

Groepen:

1. conventionele [] met antigeen
2. conventionele [] zonder antigeen
3. [] 1 met antigeen
4. [] 2 met antigeen
5. [] 1 met [] en antigeen
6. [] en antigeen

Per toedieningsroute zullen deze 6 testgroepen met elkaar vergeleken worden. In dit geval is groep 1 de referentie populatie die beschreven is als effectieve profylactische toediening van immature conventionele [] en groep 2 een negatieve controle.

In totaal zijn dit dus $3 \times 3 \times 3 = 27$ therapie verschillende manieren van toedienen voor de 6 test groepen. In de analyse willen we groep 3 statistisch vergelijken met groep 1,2 en 5 en groep 4 met groep 1,2 en 6. Op deze manier analyseren we het effect van 2 [] groepen afzonderlijk en niet direct met elkaar op deze manier zijn minder dieren nodig per analyse. De vergelijking tussen de groepen op basis van effectiviteit om [] cellen te induceren zal in deel 2b bepaald worden.

Door ervaring uit eerdere experimenten gaan we uit van een standaarddeviatie (sigma, tweezijdig) in artritis score van minimaal 30%. De power wordt vastgesteld op 90% om de kans op een type II fout te verkleinen, dit gezien de variatie. Het aan te tonen effect (true difference of means) tussen de testgroepen wat we willen bereiken is 50%. Omdat we 3 vergelijkingen willen maken hebben we een Bonferoni correctie toegepast op de alfa, waardoor we een alfa van 0.017 verkrijgen. Wanneer we deze gegevens invullen in de software behandeld in de proefdierkunde cursus (<http://www.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/>) geeft dit dat we per analyse 11 dieren nodig hebben.

In totaal zou dat voor dit deel $11 \times 6 \times 27 = 1782$ acceptor muizen

Aantallen deel 2b:

In dit deel willen we de effectiviteit van de in bijlage 1 geselecteerde [] beoordelen om in vivo

██████████ tijdens ziekte.

Hier kiezen we voor een eenmalige toediening van de ██████████ met zekerheid vast te kunnen stellen. Na transfer van ██████████ cellen zullen maximaal 2 routes van ██████████ worden geanalyseerd en zal de ██████████ injectie op maximaal 3 verschillende tijdstippen gegeven worden. De keuze voor de routes zal gemaakt worden op basis van de resultaten uit deel 2a, hierbij zullen 2 effectieve routes geselecteerd worden. De verschillende tijdstippen zijn om te kijken of ██████████ wanneer deze vroeg in het ziekte verloop wordt gegeven ten opzichte van op latere tijdstippen. Het is de hypothese dat vroeg behandelen van patiënten net na ontwikkelen van de ziekte effectiever is dan later, deze hypothese kunnen we in dit experiment testen.

De derde vraag die we in dit deel willen beantwoorden is of een ziekte inducerend antigeen vergelijkbare ██████████ en we zullen deze direct met elkaar vergelijken.

Test groepen:

1. Conventionele ██████████ met antigeen 1
2. Conventionele ██████████ met antigeen 2
3. conventionele ██████████ zonder antigeen (negatieve controle)
4. ██████████ 1 met antigeen 1
5. ██████████ 1 met antigeen 2
6. ██████████ 2 met antigeen 1
7. ██████████ met antigeen 2
8. ██████████ met ██████████ en antigeen
9. ██████████ met ██████████ en antigeen

In totaal hebben we hier dus 9 testgroepen, waarbij we 2 routes vergelijken en 3 tijdstippen van ██████████ therapie. Voor het bepalen van de groepsgrootte gelden dezelfde aannames als in het vorige deel, met als verschil dat we in dit experiment meerdere vergelijkingen hebben. Hier willen we zowel de ██████████ als de ██████████ met elkaar vergelijken en betreft het 5 vergelijkingen, bijvoorbeeld groep 4 vergelijken we met groep 1,3,5,6 en 8. En groep 6 vergelijken we met groep 2,3,4,7 en 9.

Door ervaring uit eerdere experimenten gaan we uit van een standaarddeviatie (sigma, tweezijdig) in artritis score van minimaal 30%. De power wordt vastgesteld op 90% om de kans op een type II fout te verkleinen, dit gezien de variatie. Het aan te tonen effect (true difference of means) tussen de testgroepen wat we willen bereiken is 50%. Omdat we 5 vergelijkingen willen maken hebben we een Bonferoni correctie toegepast op de alfa, waardoor we een alfa van 0.01 verkrijgen. Wanneer we deze gegevens invullen in de software behandeld in de proefdierkunde cursus (<http://www.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/>) geeft dit dat we per analyse 12 dieren nodig hebben.

Dit geeft dus $12 \times 9 \times 2 \times 3 = 648$ acceptor dieren

Deze dieren ontvangen ook ██████████ therapie. Hiervoor zullen we ██████████ muizen gebruikt worden. Uit eerdere experimenten is gebleken dat uit 1 donor muis ongeveer ██████████ ██████████ cellen geïsoleerd kunnen worden. Dus om ██████████ cellen te kunnen doorspuiten hebben we 2 donor muizen nog. Dit geeft dus $648 \times 2 = 1296$ donor dieren die gedood worden zonder voorafgaande handelingen.

Aantallen voor deel 2c:

In dit deel willen we aantonen dat ██████████ therapie ook effectief is in andere chronische ontstekingen waar een ander type ontsteking aan ten grondslag ligt. In dit geval is gekozen voor een atopische dermatitis model omdat dit een meer Th2/Th1 type ontsteking is en artritis een Th17/Th1 type.

Groepen:

1. Conventionele ██████████ met antigeen
2. conventionele ██████████ zonder antigeen
3. ██████████ met antigeen
4. ██████████ met antigeen
5. ██████████ 1 met ██████████ en antigeen
6. ██████████ 2 ██████████ en antigeen

In dit deel zullen we slechts 2 therapie schema's testen die effectief [REDACTED] in het artritis model. In het dermatitis model gaan we uit van een standaard deviatie (sigma, tweezijdig) in ziekte score van minimaal 25%. De power wordt vastgesteld op 90% om de kans op een type II fout te verkleinen, dit gezien de variatie. Het aan te tonen effect (true difference of means) tussen de testgroepen wat we willen bereiken is 50%. Omdat we 3 vergelijkingen willen maken hebben we een Bonferoni correctie toegepast op de alfa, waardoor we een alfa van 0.017 verkrijgen. Wanneer we deze gegevens invullen in de software behandeld in de proefdierkunde cursus (<http://www.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/>) geeft dit dat we per analyse 8 dieren nodig hebben.

In totaal betreft het dan $8 \times 6 \times 2 = 96$ dieren

Om een translationele stap te kunnen maken is het essentieel om aan te tonen dat [REDACTED] therapie ook in het humane immuunsysteem in staat is [REDACTED] cellen te induceren. Hiertoe willen we gebruik maken van een muis transplantatie model, waarbij in immuundeficiënte muizen humane immuun cellen worden ingespoten samen met de [REDACTED] injectie.

Voor het humane transplantatie model is bekend dat de variatie rond de 20% ligt, de power wordt gesteld op 90% om de kans op een type II fout te verkleinen en het at te tonen verschil houden we op 50%. Bij een alfa van 0.017 door de bonferoni correctie, geeft dit een groeps grootte van 7 dieren per groep.

Groepen:

1. Conventionele [REDACTED] met antigeen
2. Geen celtherapie
3. [REDACTED] 1 met antigeen
4. [REDACTED] 2 met antigeen
5. [REDACTED] met [REDACTED] en antigeen
6. [REDACTED] 2 [REDACTED] en antigeen

In deze proeven willen we de therapie van [REDACTED] vergelijken met ongeladen DCs en een negatieve controle groep zonder therapie.

Omdat het hier experimenten betreft die afhankelijk zijn van humane donoren speelt ook donor variatie mee in de uitkomst van het experiment. Om eventuele donor variatie te kunnen beoordelen zal het experiment 3 maal uitgevoerd worden met 3 afzonderlijke donoren.

In totaal betreft het dan $6 \times 7 \times 3 = 126$ muizen

In totaal voor deel 2:

Donor dieren: 1296

Artritis dieren: $1782 + 648 = 2430$

Overige ontstekingsmodellen: $96 + 126 = 222$

Totaal: **3948**

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☐ Nee, ga door met vraag D.

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

Indien surplus dieren beschikbaar zijn van de juiste leeftijd en achtergrond is hergebruik van dieren te overwegen. Het is echter van belang dat dieren niet eerder zijn gebruikt voor studies waarbij het immuunsysteem gemanipuleerd is omdat dit de uitkomst kan beïnvloeden

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

☐ Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

De vraagstelling vereist de bestudering van de immuunrespons in vivo, namelijk kunnen [] in vivo [] regulatoire [] cellen []? Kunnen deze Tregs artritis onderdrukken? Wat is de meest effectieve therapie voor wat betreft dosering, frequentie van toediening of de timing tijdens het ziekte verloop voor een [] therapie? Vanwege de complexiteit van de immuunrespons is het niet mogelijk dit te vervangen door bijvoorbeeld computer modellen. Waar mogelijk worden wel eerst in vitro experimenten uitgevoerd voordat er wordt getest in muizen en met materiaal afkomstig uit deze dieren worden in vitro tests gedaan om zo de resultaten beter te kunnen interpreteren. Dit is gebaseerd op experimenten beschreven in de literatuur en ervaring binnen onze groep met diermodellen en de te analyseren parameters.

In het laatste deel wordt alleen gekeken naar het effect van op dat moment reeds bewezen therapeutisch toepassing van [] in diermodellen voor chronische ontsteking waarmee ervaring is op gedaan door partners waarmee direct wordt samengewerkt of ervaring mee is binnen de eigen onderzoeksgroep.

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.

Alle dieren worden minimaal één keer in de week gecontroleerd zodat het ongerief tot het minimum beperkt blijft. De muizen waarbij artritis geïnduceerd is krijgen extra voer in de kooi zodat deze muizen niet per se op hun achterpoten hoeven staan om erbij te kunnen. Bij de andere muizen is de standaard kooiverrijking aanwezig.

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 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.

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

☒ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Artritis inductie en de ontwikkeling van ontsteking bij dermatitis en transplantatie geven ongerief bij de dieren. Echter het toepassen van pijnstillers bij deze dieren zal het immuunsysteem beïnvloeden¹⁹. Het is bekend dat NSAIDs de ontstekingsreactie direct beïnvloeden en daarmee het ziekte model nadelig beïnvloeden. Maar ook het gebruik van opioïden kan de immuunreactie beïnvloeden. Buprenorfine wordt vaak beschreven als een veilig alternatief met weinig effect op het immuunsysteem, echter ook buprenorfine kan de inductie van artritis nadelig beïnvloeden in sommige modellen, aangezien voor de modellen die gebruikt worden in deze aanvraag het effect van buprenorfine niet voldoende onderzocht is zal dit niet worden toegepast. Aangezien immunologische parameters bepalen zijn voor de uitkomsten van het onderzoek is het in deze dieren net mogelijk pijnstilling toe te passen.

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

In het geval van het transplantatie model zal het transplanteren van de huid onder algehele anaesthesie plaatsvinden met passende analgesie.

In het dermatitis model zullen de dieren onder gas anesthesie worden geschoren en gesensitiseerd.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

1. Het ontwikkelen van dermatitis en transplantatie reactie zal aanleiding zijn voor het ontwikkelen van ongerief. Het ontwikkelen van anafylactische reacties in het dermatitis model zijn niet beschreven.
2. Handeling van de dieren meerdere malen per week ten behoeven van artritis score.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

1. Ontsteking van de huid geeft irritatie en mogelijk jeuk.
2. Handeling geeft stress, echter het mogelijk ongerief van de artritis maakt vaker hanteren van de dieren noodzakelijk

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

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.

Voor de artritis score geldt een maximum score van 16 per dier. Ieder poot kan een score van 4 punten halen. Score 1 matige roodheid en zwelling aan 1 teen of de poot. Score 2 roodheid en zwelling aan de poot of aan maximaal 2 tenen. Score 3: roodheid en zwelling aan de poot en maximaal 3 tenen of milde zwelling van de poot en maximaal 4 tenen. Score 4: roodheid en zwelling aan zowel de poot als 4 tenen. Een score van 12 wordt beschouwd als een humaan eindpunt.

Voor het transplantatie model wordt als huumaan eindpunt necrose ten gevolge van afstoting van het transplantaat aangehouden.

Voor het dermatitis model wordt gekeken naar het ontwikkelen van dermatitis, duidelijke jeuk (continue krabben) en het openkrabben van de huid worden aangehouden als humaan eindpunt. Het dermatitis model is een progressief model en bij het ontwikkelen van jeuk zal deze niet verdwijnen, om de ontwikkeling van

mogelijke secundaire infecties ten gevolge van krablaesies aan de huid te voorkomen beschouwen we de ontwikkeling van chronische jeuk als HEP. Naast model specifieke humane eindpunten wordt ook gekeken naar algemeen welbevinden van de dieren, op basis duidelijke veranderingen in uiterlijk, gewicht of gedrag zullen de dieren worden geuthenaseerd. Hierbij wordt gelet op bol zitten, roodheid rond de ogen en lusteloosheid voor een periode van > 24 uur wordt beschouwd als humaan eindpunt. In het geval van een indicatie van gewichtsverlies worden de dieren gewogen en bij >15% gewichtsverlies in 2 dagen is het HEP bereikt.
Welk percentage van de dieren loopt kans deze criteria te halen?
In het geval van artritis en transplantatie is het te verwachten aantal dieren dat het HEP bereikt ongeveer 10% In het geval van dermatitis is het ontwikkelen van de ziekte gelijk aan het bereiken van het HEP in dit geval zal tussen de 25 en maximaal 70% van de dieren het HEP bereiken (afhankelijk van de effectiviteit van de therapie). Voor donor dieren is niet te verwachten dat het HEP bereikt wordt.
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.
Donor dieren: licht ongerief Het ongerief van de experimentele dieren is afhankelijk van de effectiviteit van de therapie. Voor de inschatting gaan we ervan uit dat slechts de helft van de therapie effectief zal zijn om zo het ongerief niet te onderschatten. Artritis model: 25% licht, 75% van de dieren zullen tot maximaal matig ongerief hebben Dermatitis model: 56% licht ongerief en in maximaal 44% van de dieren tot matig ongerief Transplantatie model: 40% licht ongerief en 60% tot matig ongerief

Einde experiment

L. Wijze van doden
Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?
☐ Nee
☒ Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.
Na afloop van het experiment worden de immuun relevante organen geïsoleerd uit de dieren voor verder analyses.
Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?
☐ Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.
☒ Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

Vul uw deelnemernummer van de NVWA in. 10800

Vul de naam van de instelling of organisatie in. Universiteit Utrecht

Vul het volgnummer en het type dierproef in.

Volgnummer	Type dierproef
3	Ontwikkelen van een [redacted] vaccin voor chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten

Gebruik de volgnummers

1 Algemene gegevens

1.1

1.2

1.3

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.

In dit deel van het project zal gekeken worden naar de effectiviteit van een therapeutisch vaccin bij chronische ziekten. In dit deel zullen de initiële experimenten ook weer gedaan worden in het proteoglycaan geïnduceerde artritis model waarmee veel ervaring is (een typisch Th17/Th1 model) en zal in het vervolg ook gekeken worden naar de effectiviteit van een dergelijk [redacted] vaccin in een model voor dermatitis (een typisch Th2/Th1 model).

Om [redacted] cellen te induceren zijn verschillende methoden beschreven in de literatuur. Zo is het mucosaal immuunsysteem bekend om zijn [redacted] capaciteit in een profylactische setting. Recent zijn er meerdere aanwijzingen in de literatuur beschreven dat ook dermale toediening een goede

route is om [redacted] cellen te krijgen. In dit deel van het project willen we ons voornamelijk richten op of we via de meest veelbelovende routes [redacted] [redacted] cellen kunnen induceren tijdens de aanwezigheid van een ontsteking, zoals bijvoorbeeld artritis of dermatitis.

Door gebruik te maken van een [redacted] cel transfer model kunnen we het effect van de vaccinatie op [redacted] differentiatie in detail volgen. Daarnaast zullen we gebruik [redacted]

Dit [redacted]

In deel 3 zullen we de volgende vragen beantwoorden:

3a: is het mogelijk een chronische ontsteking te onderdrukken met een [redacted]

[redacted] Om deze vraag te beantwoorden zullen we verschillende adjuvantia testen. In ieder geval zullen we verschillende [redacted] onderzoeken omdat we eerder hebben aangetoond dat bijvoorbeeld PLGA nano-partikles tolerogene markers opreguleren in vitro in [redacted]. Maar ook [redacted] liganden en [redacted] liganden worden in de literatuur aangewezen als potentiële [redacted]

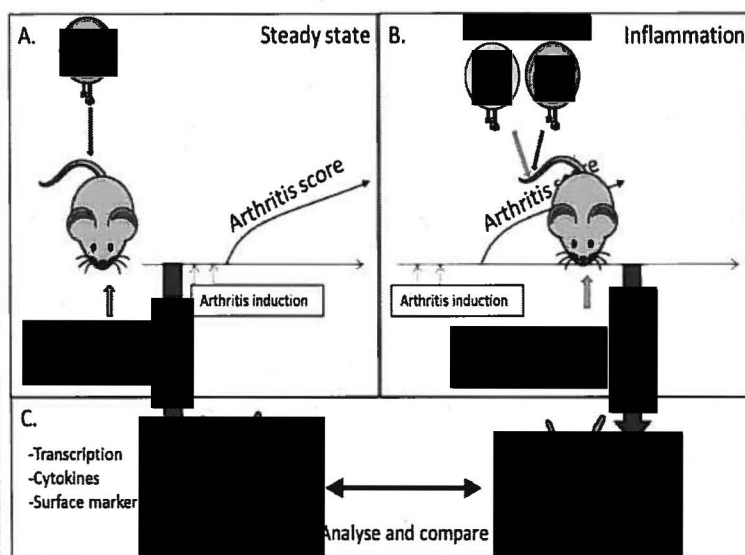
adjuvantia¹⁴.

Om het effect van de [redacted] vaccinatie in vivo te beoordelen zullen we hierbij gebruik maken van adoptieve transfer modellen waarin we [redacted] cellen gelabeld met een vita dye doorspuiten en aan het eind van het experiment hun differentiatie en lokalisatie de muis kunnen beoordelen met behulp van FACS analyse.

De dieren zullen voor het ontwikkelen van ziekte gevaccineerd worden om de steady state vaccinatie te beoordelen en na induceren van de ziekte (na de laatste immunisatie) om de therapeutische effectiviteit vast te stellen.

3b. De andere belangrijke vraag die wil in dit deel van het project willen beantwoorden is wat is er anders is

[redacted] In veel modellen is het goed mogelijk een [redacted] vaccinatie toe te passen door bijvoorbeeld gebruik te maken van [redacted] inductie. Echter tijdens ontsteking is dit veel minder effectief. Om deze verschillen in kaart te brengen willen we kijken welke [redacted] een rol spelen tijdens [redacted] inductie door een [redacted] vaccinatie te geven in conditionele knock-out muizen waarin we specifieke [redacted] kunnen uitschakelen met behulp van [redacted]. Daarnaast zullen we [redacted] isoleren na vaccinatie uit de drainerende lymfeknopen en deze vergelijken tussen dieren met een chronische ziekte en dieren zonder een chronische ontstekingsziekte.



Figuur 1:

Therapeutische en profylactische vaccinatie wordt vergeleken met de focus op [redacted] en [redacted] vaccinatie routes. Hierbij wordt het type [redacted] dat betrokken is bij de inductie in kaart gebracht met behulp van specifiek transgene muizen, maar ook door [redacted] te isoleren uit de drainerende lymfeklieren.

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.

- **Het artritis model:**

- Proteoglycaan geïnduceerde artritis (PGIA) zal geïnduceerd worden met 2 injecties van proteoglycaan uit kraakbeen in DDA. Hiervoor zullen vrouwelijke dieren gebruikt worden op een balb/c achtergrond. Deze dieren hebben een hogere gevoeligheid voor het ontwikkelen van artritis waardoor een hogere incidentie wordt gehaald, minder injecties en minder dieren nodig zijn¹⁸.
- De twee injecties worden i.p. toegediend met een tussen periode van 21 dagen. Vervolgens worden de dieren 2x per week bekeken op de ontwikkeling van artritis verschijnselen (roodheid en zwelling van de pootjes). Indien de dieren artritis krijgen wordt het klinisch onderzoek geïntensiveerd afhankelijk van de ernst van het verloop.
- Tijdens artritis zal bloed afgenomen worden doormiddel van een wang prik, waarbij maximaal 100 ul er muis wordt afgenomen en maximaal 1 x per 3 weken.
- Dieren waarbij het effect op [] cellen wordt bekeken zullen een minimaal dag voor toediening van het vaccin [] cellen gelabeld met een vital dye i.v. krijgen toegediend.
- [] vaccinatie [] met ziekte inducerend antigeen (proteoglycaan) of [] in aanwezigheid van een tolerogeen adjuvant zal voor of na de 2^e vaccinatie plaatsvinden om het onderscheid te maken tussen [] vaccinatie in de steady state en tijdens ontsteking.
- Het tweede model is een **dermatitis model**, hiervoor is gekozen omdat het hier een voornamelijk Th2 gemedieerde response betreft anders dan bij artritis dit zal laten zien of [] vaccinatie breed inzetbaar is bij een disbalans van het immuunsysteem. In dit model wordt de ziekte geïnduceerd met 2 of 3 sensitisatie met allergeen met 3 weken tussen tijd gevolgd door een challenge op de huid. De sensitisatie wordt of [] afhankelijk van het antigeen []. Vervolgens worden de dieren gechallenged en wordt de ontwikkeling van huidontsteking op de plek van de challenge visueel beoordeeld. Alle dieren zullen aan het eind van het experiment gedood worden om de immuun relevante organen te isoleren voor verdere analyse in het laboratorium.
- [] vaccinatie [] met ziekte inducerend antigeen [] of [] elwit in aanwezigheid van een [] adjuvant zal voor of na de 2^e/3^e vaccinatie plaatsvinden om het onderscheid te maken tussen [] vaccinatie in de steady state en tijdens ontsteking.

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

Er is overwogen hoeveel dieren er nodig zijn om een aan te tonen effect te bewijzen (true difference of the means). De calculatie van de hoeveelheid dieren is gedaan met de software behandeld in de proefdiercursus (<http://www.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/>). De exacte afwegingen en statistische berekeningen zijn hieronder verder uitgewerkt.

B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levensstadia. Onderbouw deze keuzes. In dit deel van het project zal gebruik gemaakt worden van muizen afkomstig van commerciële proefdier leveranciers of vanuit eigen fok indien het specifieke transgene muizen betreft. In alle gevallen zullen volwassen dieren gebruikt worden waarbij in het algemeen dieren tussen de 6-12 weken aangekocht zullen worden, omdat in deze dieren het immuunsysteem volledig ontwikkeld is. Alleen in het geval van artritis inductie zal gekozen worden voor muizen van meer dan >16 weken oud en bij voorkeur gepensioneerde fokvrouwen, omdat deze de hoogste gevoeligheid hebben voor het ontwikkelen van artritis. In het geval van dermatitis is er geen geslachtsvoorkeur voor de dieren.

Aantallen deel 2a:

In totaal kunnen naar verwachting maximaal 10 verschillende adjuvantia testen. Enkele voorbeelden zijn PLGA partikels (mogelijk geladen met [], anti-inflammatoire compounds als [], liposomale formuleringen, anti-lichaam gemedieerde targeting van []. Hierbij willen we gebruik maken van 2 peptiden. Ten eerste het [] aangetoond dat het regulerende T cellen kan induceren in artritis en een tweede ziekte relevant peptide (bijvoorbeeld proteoglycaan peptide in artritis of ovalbumine in dermatitis). Om de effectiviteit van het vaccin te testen zullen we maximaal 3 verschillende doseringen testen per verschillend adjuvans. Het aantal doseringen is afhankelijk van de formulering van het vaccin en de concentratie peptide die hierin beschikbaar is voor het immuunsysteem en meetbare [] cel activatie geeft van de ingespoten [] cellen.

Per experiment hebben we een positieve controle nodig met een bekend [] stof

(bijvoorbeeld dexamethason) en een onbehandelde negatieve controle en kunnen we in totaal 5 testgroepen analyseren (met 2 controles erbij zijn dat 7 groepen per experiment).

Groepen:

- Groep 1: positieve controle
- Groep 2; negatieve controle
- Groep 3: test vaccin 1 dosis 1
- Groep 4: test vaccin 1 dosis 2
- Groep 5: test vaccin 1 dosis 3

Artritis model:

Door ervaring uit eerdere experimenten gaan we uit van een standaard deviatie (sigma, tweezijdig) van artritis hebben tussen de experimentele groepen van minimaal 30%. De power wordt vastgesteld op 90% om de kans op een type II fout te verkleinen, dit gezien de variatie. Het aan te tonen effect (true difference of means) tussen de testgroepen wat we willen bereiken is 50%. We vergelijken alle behandelingen met de negatieve controle en hebben dus 4 vergelijkingen. Door het toepassen van de Bonferoni correctie op de alfa, hebben we een alfa van 0.0125. Wanneer we deze gegevens invullen in de software behandeld in de proefdierkunde cursus (<http://www.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/>) geeft dit dat we per analyse 12 dieren nodig hebben.

In totaal dus 10 vaccins * 5 groepen * 12 dieren = **600** muizen).

Omdat we in deze dieren ook de [redacted] cel response willen vervolgd hebben maximaal **1200** donor muizen nodig, aangezien we 2 donor muizen nodig hebben om voldoende [redacted] cellen uit te isoleren voor een transfer (zie bijlage 2).

Dermatitis model:

Voor het dermatitis model gaan we uit van een standaard deviatie (sigma, tweezijdig) van artritis hebben tussen de experimentele groepen van minimaal 25%. De power wordt vastgesteld op 90% om de kans op een type II fout te verkleinen, dit gezien de variatie. Het aan te tonen effect (true difference of means) tussen de testgroepen wat we willen bereiken is 50%. We vergelijken alle behandelingen met de negatieve controle en hebben dus 4 vergelijkingen. Door het toepassen van de Bonferoni correctie op de alfa, hebben we een alfa van 0.0125. Wanneer we deze gegevens invullen in de software behandeld in de proefdierkunde cursus (<http://www.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/>) geeft dit dat we per analyse 12 dieren nodig hebben. In totaal dus 10 vaccins * 5 groepen * 9 dieren = **450** muizen).

Omdat we in deze dieren ook de [redacted] cel response willen vervolgd hebben maximaal **900** donor muizen nodig, aangezien we 2 donor muizen nodig hebben om voldoende [redacted] cellen uit te isoleren voor een transfer (zie bijlage 2).

Aantallen deel 3b:

In deel 3b zullen we ons richten op de [redacted] cel. In dit deel zullen we [redacted] isoleren uit dieren die een chronische ontsteking en controle dieren kort na vaccinatie om de verschillen tussen deze [redacted] in kaart te brengen. In deze vraagstelling is het niet noodzakelijk om verschillende diersmodellen met verschillende ontstekingen te testen en beperken we ons tot het artritis model.

Hier willen we 2 effectieve vaccins testen (getest in 3a) via beide routes [redacted]. Hierbij zullen de lymfeknopen geïsoleerd worden op 3 tijdstippen na vaccinatie om te analyseren of de [redacted] veranderen over tijd na vaccinatie.

Groepen per experiment:

- Groep 1: positieve controle
- Groep 2: negatieve controle
- Groep 3: vaccin1 [redacted]
- Groep 4: vaccin 1 [redacted]

Artritis model:

Door ervaring uit eerdere experimenten gaan we uit van een standaard deviatie (sigma, tweezijdig) van artritis hebben tussen de experimentele groepen van minimaal 30%. De power wordt vastgesteld op 90% om de kans op een type II fout te verkleinen, dit gezien de variatie. Het aan te tonen effect (true difference of means) tussen de testgroepen wat we willen bereiken is 50%. We vergelijken alle behandelingen met de negatieve controle en hebben dus 3 vergelijkingen. Door het toepassen van de Bonferoni correctie op de alfa, hebben we een alfa van 0.017. Wanneer we deze gegevens invullen in de software behandeld in de

proefdierkunde cursus (<http://www.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/>) geeft dit dat we per analyse 11 dieren nodig hebben.

- Dit zijn dus **44** dieren per experiment.
- Per vaccin wordt dit experiment **6** maal uitgevoerd, namelijk de dieren worden op 3 tijdstippen na vaccinatie geanalyseerd en zowel tijdens steady state als tijdens een ontsteking.
- We willen 2 succesvolle (in 3a) vaccinaties testen

In totaal dus 2 vaccins * 6 experimenten * 44 dieren = **528** muizen).

En tevens zullen we 2 effectieve vaccin routes [REDACTED] en 2 effectieve formuleringen (bewezen in 3a) testen, samen met de juiste positieve (immunosuppressivum) als negatieve (ongevaccineerde) controle in zowel conventionele als conditionele knock-out muizen (2 stammen). In totaal zijn dit dus 6 groepen per stam dus 18 groepen van 12 dieren in totaal **216** dieren

In totaal voor deel 2:

Donor dieren: 2100

Artritis/dermatitis met vaccinatie: 600+450+528+216=1794

Totaal: **3894**

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

Indien surplus dieren beschikbaar zijn van de juiste leeftijd en achtergrond is hergebruik van dieren te overwegen. Het is echter van belang dat dieren niet eerder zijn gebruikt voor studies waarbij het immuunsysteem gemanipuleer is omdat dit de uitkomst kan beïnvloeden

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.

De vraagstelling vereist de bestudering van de immuunrespons in vivo, namelijk kunnen [REDACTED] in vivo [REDACTED] regulatoire [REDACTED] cellen [REDACTED] [REDACTED] Kunnen deze Tregs artritis onderdrukken? Via welke route is het mogelijk therapeutisch te vaccineren voor regulerende T cellen en in aanwezigheid van welk tolerogeen adjuvans? Vanwege de complexiteit van de immuunrespons is het niet mogelijk dit te vervangen door bijvoorbeeld computer modellen. Waar mogelijk worden wel eerst in vitro experimenten uitgevoerd voordat er wordt getest in muizen en met materiaal afkomstig uit deze dieren worden in vitro tests gedaan om zo de resultaten beter te kunnen interpreteren. Dit is gebaseerd op experimenten beschreven in de literatuur en ervaring binnen onze groep met diermodellen en de te analyseren parameters.

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.

Voor muizen waarbij artritis geïnduceerd is wordt er extra op gelet dat deze muizen extra voer in de kooi hebben liggen zodat ze niet per se op hun achterpoten hoeven staan om erbij te kunnen. Verder worden de muizen regelmatig gecheckt zodat het ongerief tot het minimum beperkt blijft. Bij de andere muizen is de standaard kooiverrijking aanwezig.

Voor het dermatitis model is net als bij donor muizen sprake van standaard kooiverrijking, daarnaast zullen de dieren vanaf challenge wanneer ziekteverschijnselen kunnen verschijnen zeer regelmatig gecheckt worden om ongerief tot een minimum te beperken.

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 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.

Artritis inductie en de ontwikkeling van ontsteking bij dermatitis en transplantatie geven ongerief bij de dieren. Echter het toepassen van pijnstillers bij deze dieren zal het immuunsysteem beïnvloeden¹⁹. Het is bekend dat NSAIDs de ontstekingsreactie direct beïnvloeden en daarmee het ziekte model nadelig beïnvloeden. Maar ook het gebruik van opioïden kan de immuunreactie beïnvloeden. Buprenorfine wordt vaak beschreven als een veilig alternatief met weinig effect op het immuunsysteem, echter ook buprenorfine kan de inductie van artritis nadelig beïnvloeden in sommige modellen, aangezien voor de modellen die gebruikt worden in deze aanvraag het effect van buprenorfine niet voldoende onderzocht is zal dit niet worden toegepast. Aangezien immunologische parameters bepalen zijn voor de uitkomsten van het onderzoek is het in deze dieren niet mogelijk pijnstilling toe te passen.

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

Scheren en sensibiliseren van de dieren voor dermatitis zal onder anaesthesie plaatsvinden

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Het ontwikkelen van dermatitis zal aanleiding zijn voor het ontwikkelen van ongerief. Het 1. ontwikkelen van anafylactische reacties in het dermatitis model zijn niet beschreven.

2. Handeling van de dieren meerdere malen per week ten behoeven van artritis score

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Ontsteking van de huid geeft irritatie en mogelijk jeuk. 1.

2. Handeling geeft stress, echter het mogelijk ongerief van de artritis maakt vaker hanteren van de dieren noodzakelijk

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

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.

Voor de artritis score geldt een maximum score van 16 per dier. Ieder poot kan een score van 4 punten halen. Score 1 matige roodheid en zwelling aan 1 teen of de poot. Score 2 roodheid en zwelling aan de poot of aan maximaal 2 tenen. Score 3: roodheid en zwelling aan de poot en maximaal 3 tenen of milde zwelling van de poot en maximaal 4 tenen. Score 4: roodheid en zwelling aan zowel de poot als 4 tenen.

Een score van 12 wordt beschouwd als een humaan eindpunt.

Voor het dermatitis model wordt gekeken naar het ontwikkelen van dermatitis, duidelijke jeuk (continue krabben) en het openkrabben van de huid worden aangehouden als humaan eindpunt.

Naast model specifieke humane eindpunten wordt ook gekeken naar algemeen welbevinden van de dieren, op basis duidelijke veranderingen in uiterlijk, gewicht of gedrag zullen de dieren worden geuthenaseerd. Hierbij wordt gelet op bol zitten, roodheid rond de ogen en lusteloosheid voor een periode van > 24 uur wordt beschouwd als humaan eindpunt. In het geval van een indicatie van gewichtsverlies worden de dieren gewogen en bij >15% gewichtsverlies in 2 dagen is het HEP bereikt..

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

In het geval van artritis is het te verwachten aantal dieren dat het HEP bereikt ongeveer 10%

In het geval van dermatitis is het ontwikkelen van de ziekte gelijk aan het bereiken van het HEP in dit geval zal tussen de 25 en maximaal 70% van de dieren het HEP bereiken (afhankelijk van de effectiviteit van de therapie).

Voor donor dieren is niet te verwachten dat het HEP bereikt wordt.

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.

Artritis model: 25% licht, 75% van de dieren zullen tot matig ongerief hebben

Dermatitis model: 56% licht ongerief en in maximaal 44% van de dieren tot matig ongerief

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

☐ Nee

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

Na afloop van het experiment worden de immuun relevante organen geïsoleerd uit de dieren voor verder analyses.

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit 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

AVD108002016467

Bijlagen

1

28 APR. 2016

Datum

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 15 maart 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Nieuwe immuuntherapie voor chronische ontstekingen" met aanvraagnummer AVD108002016467. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 19 april 2016 heeft u uw aanvraag aangevuld. U heeft naar aanleiding van door ons gestelde vragen uw NTS aangepast en uw aanvraag verhelderd op het gebied van aantallen dieren, te gebruiken geslachten, verfijning van dierproeven en hergebruik van dieren. De vragen zijn afdoende beantwoord.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning. De specifieke voorwaarde is gesteld omdat de CCD het van belang acht dat beide geslachten in gelijke aantallen gebruikt zullen worden om het aantal in voorraad gedode dieren te verminderen.

De algemene voorwaarde betreffende de afstemming met de IvD is gesteld om onnodig gebruik van dieren in experimenten te voorkomen. De algemene voorwaarde betreffende artikel 10, lid 1 sub a van de wet wordt gesteld bij vergunningen met een langere looptijd. Dit om te voldoen aan datgene wat volgt uit dit artikel. U kunt met uw project "Nieuwe immuuntherapie voor chronische ontstekingen" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 mei 2016 tot en met 30 april 2021. Deze termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat een vergunning een maximale looptijd van 5 jaar heeft.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Utrecht gevoegd. Dit advies is opgesteld op 8 maart 2016. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van

de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie, nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering, met toevoeging van enkele algemene voorwaarden. Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

Bezwaar

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

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

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

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

Meer informatie

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

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

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

Bijlagen:

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

Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Universiteit Utrecht

Adres: Postbus 12007

Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT

Deelnemersnummer: 10800

deze projectvergunning voor het tijdvak 01 mei 2016 tot en met 30 april 2021, voor het project "Nieuwe immuuntherapie voor chronische ontstekingen" met aanvraagnummer AVD108002016467, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Utrecht. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Onderzoeker.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 15 maart 2016
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 19 april 2016;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 19 april 2016;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 8 maart 2016, ontvangen op 15 maart 2016.
 - d Uw aanvullingen zoals ontvangen op 19 april 2016.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
In vitro kweek van [REDACTED] en analyse van fenotype en functie	Muizen (Mus musculus) / WT en [REDACTED]	780	100% Licht	630 WT, 150 transgenen
[REDACTED] therapie in chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten_Artritis	Muizen (Mus musculus) /	3726	49% Matig 51% Licht	1296 donordieren 2430 artritisdieren
[REDACTED] therapie in chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten_dermatitis	Muizen (Mus musculus) /	96	44% Matig 56% Licht	
[REDACTED] therapie in chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten_Transplantatie model	Muizen (Mus musculus) /	126	60% Matig 40% Licht	
Ontwikkelen van een [REDACTED] vaccin voor chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten_Artritis model	Muizen (Mus musculus) /	2544	40% Matig 60% Licht	1200 donordieren 1344 artritisdieren
Ontwikkelen van een [REDACTED] vaccin voor chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten)_dermatitis	Muizen (Mus musculus) /	1350	15% Matig 85% Licht	900 donordieren 450 dermatitisdieren

Voorwaarden

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

Specifieke voorwaarden:

- Voor de experimenten beschreven in bijlage 1 (In vitro kweek van [REDACTED] en analyse van fenotype en functie) zullen zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt worden, de IvD houdt hier toezicht op bij de werkprotocollen van de individuele experimenten zodat aan het einde van de looptijd van het

project de geslachtsverhouding op 50/50 uitkomt. Wanneer na het uitvoeren van meerdere / een aantal individuele experimenten gedurende een periode van 2 jaar blijkt dat hier niet aan kan worden voldaan (omdat levering van de geslachten afhankelijk is van de leverancier), zal dit gemeld worden aan de CCD, zodat zij deze voorwaarde mogelijk kunnen herzien of intrekken.

- In bijlage 2 heeft u niet aangegeven of de dieren die hergebruikt worden wel/niet eerder ernstig ongerief hebben ondervonden. Aangezien dit wettelijk vereist is, gaan wij ervan uit dat u hier rekening mee houdt bij de uitvoer van uw experimenten.

Algemene voorwaarden:

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

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

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

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

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

Verzorging

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

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

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

Pijnbestrijding en verdoving

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

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

Einde van een dierproef

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

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

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

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

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