

<b>Inventaris Wob-verzoek W17-17</b>		<b>wordt verstrekt</b>				<b>weigeringsgronden</b>			
<b>nr.</b>	<b>documenten NTS2017775</b>	<b>reeds openbaar</b>	<b>niet</b>	<b>geheel</b>	<b>deels</b>	<b>10.1.c</b>	<b>10.2.e</b>	<b>10.2.g</b>	<b>11.1</b>
1	Aanvraagformulier				x		x		
2	Projectvoorstel			x					
3	Niet-technische samenvatting oud			x					
4	Bijlage dierproeven oud			x					
5	Ontvangstbevestiging				x		x		
6	DEC-advies				x		x		
7	Verzoek aanvulling aanvraag				x		x		
8	Niet-technische samenvatting nieuw	x							
9	Bijlage dierproeven nieuw			x					
10	Adviesnota CCD		x						x
11	Beschikking en vergunning				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](http://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>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in	11800
		<input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen	
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	Academic Medical Center Amsterdam
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]
		KvK-nummer	343362777
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	Straat en huisnummer	Meibergdreef 31
		Postbus	
		Postcode en plaats	1105AZ Amsterdam
		IBAN	NL68RABO0136166741
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Zie bijgesloten procedure voor betaling AMC
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]
		Functie	[REDACTED] Onderzoeker
		Afdeling	[REDACTED]
		Telefoonnummer	[REDACTED]
		E-mailadres	[REDACTED]
1.5	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	
		Afdeling	
		Telefoonnummer	
		E-mailadres	

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

## 2 Over uw aanvraag

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

## 3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- |            |                |
|------------|----------------|
| Startdatum | 1 - 1 - 2017   |
| Einddatum  | 30 - 11 - 2021 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- RescU1 Splicing
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Correctie van splicingsdefecten bij erfelijke ziekten
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- |             |                 |
|-------------|-----------------|
| Naam DEC    | DEC AMC         |
| Postadres   | Meibergdreef 31 |
| E-mailadres |                 |

## 4 Betaalgegevens




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

## 5 Checklist bijlagen

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

## 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	Amsterdam
Datum	17 - 08 - 2017
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](http://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 gezondheid of het welzijn van mens of dier
- Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
- Hoger onderwijs of opleiding
- Forensisch onderzoek
- Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

### 3 Algemene projectbeschrijving

#### 3.1 Achtergrond

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

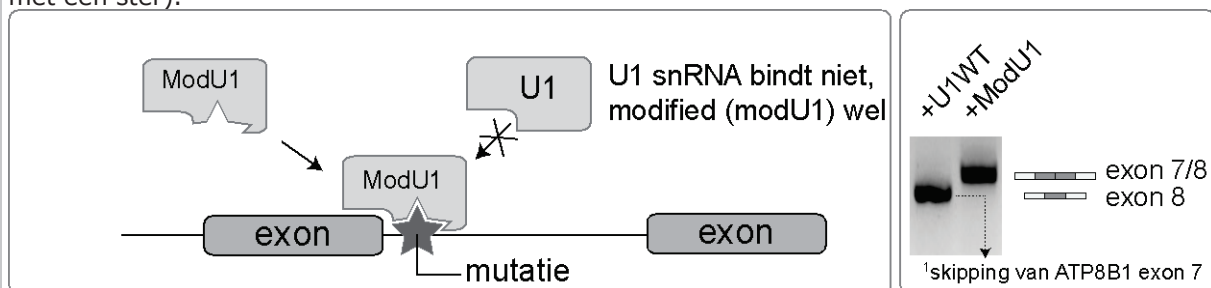
- Geef in geval van 'wettelijk vereiste dierproeven' aan welke wettelijke eisen (in relatie tot beoogd gebruik en markttoelating) van toepassing zijn.
- Geef in geval van 'routinematige productie' aan welk(e) product(en) het betreft en voor welke toepassing(en).
- Geef in geval van 'hoger onderwijs of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

Erfelijke ziekten komen individueel allemaal weinig voor, terwijl toch geschat wordt dat ~35 miljoen

mensen in Europa een zeldzame (vaak erfelijke) ziekte hebben. Goede medicijnen zijn voor veel van deze ziekten niet beschikbaar. Recentelijk is een mogelijk breed-toepasbare manier ontdekt om erfelijke splicingsdefecten te behandelen bij zeer diverse ziekten.

"Splicing" is een onderdeel van het proces waarbij de genetische informatie in het DNA vertaald wordt naar een werkend eiwit. Slechts een deel van het DNA bevat eiwit-coderende informatie (exonen). Bij pre-mRNA splicing worden de delen tussen de exonen (genaamd 'intronen') weggehaald zodat de exonen naadloos aan elkaar komen. Bij erfelijke mutaties in gebieden dichtbij exon-intron overgangen gaat dit proces vaak mis en het wordt geschat dat bij ruim 15% van alle erfelijke ziekten een splice-defect de reden is. Het lijkt mogelijk om aangedane cellen in het lichaam te instrueren hoe om te gaan met het erfelijke defect en toch het pre-mRNA correct te splicen. Onze strategie hiertoe is het in cellen tot expressie brengen van een gemodificeerd onderdeel (modU1) van de cellulaire splicingsmachinerie (U1snRNA). Op dit moment is alleen nog gekeken of het splicingprobleem hiermee opgelost werd in een laboratoriumsetting. Eventuele bij-effecten, en effectiviteit *in vivo*, is nog nauwelijks onderzocht. Het U1 small nuclear RNA (snRNA) rekruteert de cellulaire splicingsmachinerie naar pre-mRNA. Hierbij zijn 9 nucleotiden in dit kleine RNA van belang die zorgen dat het aan pre-mRNA kan binden. Door een gemodificeerd U1 snRNA (met puntmutaties in (enkele van) deze 9 nucleotiden die de base-paring aan het mRNA herstellen) tot expressie te brengen, kan een splice-defect vaak effectief behandeld worden *in vitro*.

In het voorbeeld hieronder zorgde dit dat het ATP8B1 eiwit *in vitro* weer goed gemaakt werd, terwijl er zonder behandeling een deel (exon 7) ontbrak doordat er een foutje in het DNA zit (mutatie, aangegeven met een ster).



Doel van het hier voorgestelde project is onderzoeken of gemodificeerde U1s snRNA veilig in de lever tot expressie gebracht kunnen worden en effectief splice-defecten kunnen verhelpen die leiden tot Ornithine transcarbamoylase (OTC) deficiëntie en type I tyrosinemie. Patiënten met OTC deficiëntie missen een enzym in de ureumcyclus, wat leidt tot de levensbedreigende ophoping van o.a. het toxische ammoniak in het lichaam. Patiënten overleven op een speciaal (erg ingrijpend) eiwitarm dieet (levenslang) in combinatie met behandeling met medicijnen zoals fenylbutyraat, wat in het lichaam wordt omgezet tot fenylacetylglutamine en zorgt dat stikstof het lichaam veilig kan verlaten en ammoniakspiegels beperkt kunnen worden. Deze afstemming van dieet en medicatie is vaak erg moeizaam en bij sommige patiëntjes met minimale OTC restactiviteit lukt het soms helemaal niet en kunnen deze snel in coma raken en zelfs sterven. Er is dus behoefte aan betere behandelings-opties.

OTC deficiëntie wordt in een deel van de patiënten veroorzaakt door een splicing defect IVS4-1G>A op een positie die zich goed leent voor therapie met gemodificeerd U1 snRNA en is er een muismodel met exact deze splice-site-mutatie. Het OTC gen ligt op het X-chromosoom, en dit zorgt ervoor dat vooral jongetjes getroffen worden door de ziekte. Ook bij muizen ligt het gen op het X-chromosoom. We zullen dan ook alleen mannetjesmuizen gebruiken in het deel van de studie dat zich richt op OTC deficiëntie. Met behulp van 'mini-genen', plasmiden met een klein stukje van het OTC-gen hebben we *in vitro* al bepaald welke verandering in de U1 snRNA sequentie OTC-splicing corrigeert. Dit geldt zowel voor 'muis' als 'humane' mini-genen. De beste gemodificeerde U1 snRNAs worden met een adeno-associated virus (AAV)(M. S. Sands, Methods in molecular biology 2011) in de lever van levende muizen met een OTC-splicedefect gebracht. Langdurig overleving na de overgang op een eiwitrijk dieet en vermindering van ammoniakconcentratie in het bloed is een maat voor succes van de behandeling.

Patiënten met tyrosinemie type 1 (ook wel fumarylacetoacetate hydrolase (FAH) deficiëntie genaamd) missen een enzym in de afbraakroute van tyrosine wat leidt tot de levensbedreigende ophoping van toxisch en carcinogeen product in de lever. Patiënten overleven op een speciaal (erg ingrijpend) eiwitarm

dieet in combinatie met behandeling met NTBC, een stof die het enzym remt upstream van FAH, waardoor minder toxische metabolieten accumuleren. Deze behandeling is niet altijd effectief en de kans op levertumoren blijft groot, ook in de patiënten die goed reageren op NTBC. Ook bij deze ziekte is dus behoefte aan betere behandelingsopties. FAH deficiëntie wordt in ruim 1/3 van de patiënten veroorzaakt door een splicing defect (IVS12+5 g>a) op een positie die zich goed leent voor therapie met gemodificeerd U1 snRNA en er is een muismodel met een vergelijkbare splice-site-mutatie. Het muisfenotype is duidelijk gekarakteriseerd; de muizen overleven alleen in aanwezigheid van NTBC. Met behulp van 'mini-genen', plasmiden met een klein stukje van het FAH-gen bepalen we welke verandering in de U1 snRNA sequentie FAH-splicing corrigeert *in vitro*. Dit bepalen we met 'muis' en 'humane' mini-genen. De beste gemodificeerde U1 snRNA voor 'muis' FAH worden met een adeno-associated virus (AAV) in de lever van muizen met een FAH-splicedefect gebracht. Langdurig overleving na het stoppen met NTBC en een vermindering van ontstaan van levertumoren is een maat voor succes van de behandeling.

### 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?

Doel is onderzoeken of gemodificeerde U1 snRNAs veilig in de lever tot expressie gebracht kunnen worden en effectief splice-defecten kunnen verhelpen in OTC en FAH deficiëntie. Specifiek in dit project willen we testen of deze strategie geschikt is voor tyrosinemie en OTC deficiëntie, en het lange termijn doel is het voor patiënten beschikbaar krijgen van nieuwe behandelingen voor stofwisselingsziekten waarbij splicedefecten de oorzaak vormen. Voordat we voor deze ziekten klinische trials met gemodificeerde U1 snRNAs kunnen starten is nog veel onderzoek nodig. Allereerst moet worden onderzocht of gemodificeerde U1 snRNAs *in vivo* effectief en veilig zijn.

#### **Haalbaarheid:**

Het dierenlab van mijn instituut is toegerust met een faciliteit voor *in vivo* experimenten met adeno-associated virus. Deze voldoet aan alle voorwaarden m.b.t. isolatie en inperking van materiaal, zodat er geen genetisch veranderd materiaal vrij kan komen. We hebben veel ervaring met virale injecties in proefdieren, ook muizen. Binnen onze onderzoeksgroep is er ruime ervaring met genterapie, en de experimentele ervaring met injecties en hepatectomie is geborgd bij de analisten op dit project. We hebben al eerdere ervaring met FAH-deficiënte muizen, en goede samenwerkingen met de wereldwijde experts op gebied van FAH deficiëntie en OTC deficiëntie. Er is ruime ervaring in de experimentele handelingen met de levende dieren, met de euthanasie en de analyse van de weefsels die zullen worden uitgenomen na afloop van het dierexperiment.

### 3.3 Belang

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

#### **Maatschappelijk belang:**

OTC en FAH zijn 2 ziektebeelden met een defect in de lever waar een geschikt diermodel voor bestaat om veiligheid en effectiviteit van gemodificeerde U1s snRNA te kunnen onderzoeken. Specifiek voor OTC en FAH deficiëntie is er al wel behandeling mogelijk, maar deze is erg ingrijpend en veelal onvoldoende om levertumoren of levensbedreigende episoden met hyperammonemie te voorkomen (respectievelijk bij FAH- en OTC-deficiëntie). DNA mutaties in de buurt van een exon-intron overgang zorgen voor pre-mRNA splicedefecten in ruim 15% van alle patiënten met erfelijke mutaties. In veel gevallen is er momenteel geen enkele therapie beschikbaar. Dit onderzoek kan bijdragen in de ontwikkeling van nieuwe therapie voor een deel van deze mensen.

#### **Wetenschappelijk belang:**

Het is onbekend of gemodificeerde U1s snRNA veilig in de lever tot expressie gebracht kunnen worden en effectief een splice-defect kunnen verhelpen. Om de effectiviteit te kunnen onderzoeken is het van

belang dat er een ziektebeeld onderzocht wordt waarvan de ernst op verschillende tijdstippen kan worden gemeten, en deze een gevolg is van een verstoorde leverfunctie. Dat is voor zowel het FAH als het OTC diermodel het geval. Gecombineerde analyse van beide ziekten geeft meer inzicht of deze strategie op termijn breed inzetbaar is. We willen kijken of virale toediening van het gemodificeerde U1 snRNA de expressie van FAH en OTC normaliseert in voldoende cellen van de lever. De transductie-efficiëntie wordt beïnvloed door de structuur en doorbloeding van de lever, wat *in vitro* niet (langdurig) na te bootsen is. Ook immuunreacties in de lever zijn van belang voor effectiviteit en veiligheid van virale transducties, en betreft mogelijk meerdere celtypen in de lever en dit is niet betrouwbaar na te bootsen *in vitro*. Na afloop willen we kijken of er ongewenste veranderingen zijn in genexpressie. Dat is nodig omdat het U1 snRNA een vrij algemene rol speelt in mRNA processing en het tot expressie brengen van een gemodificeerd U1 snRNA dit mogelijk beïnvloedt. Omdat herstel van correcte splicing van FAH en OTC zelf ook al voor een veranderd (genormaliseerd) expressieprofiel kan leiden willen we deze analyse ook in wild-type dieren uitvoeren. Deze analyse vereist isolatie van o.a. leverweefsel en daarmee het doden van het proefdier.

### 3.4 Onderzoeksstrategie

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

De coderende sequentie voor een aangepast U1 snRNA wordt ingebouwd in AAV-vectoren. Virus wordt geïnjecteerd in muizen, en zal met name de lever transduceren. Kort hierna worden de muizen gechallenged om het fenotype zichtbaar te maken. Voor OTC-deficiënte muizen betekent dit dat ze op een hoog-eiwit dieet geplaatst worden. Voor FAH muizen wordt gestopt met het geven van NTBC in het drinkwater. Gekeken wordt of de ontwikkeling van het (klinische) fenotype minder sterk optreedt in de muizen die een corrigerend U1 snRNA hebben toegediend gekregen. De muizen worden maximaal 6 maanden gevolgd, om ook te kunnen kijken of de tumorvorming minder is. Na afloop worden de muizen geëuthanaseerd en weefsels uitgehaald. Het is verder van belang om te kijken hoe lang effectiviteit aanhoudt, omdat virus niet frequent kan worden toegediend (bij genterapie meestal eenmalig). AAV DNA integreert niet in het genoom van de mens. Dat maakt het een erg veilig virus, maar houdt in dat door celdeling het virus de cel uit kan raken. Als de lever nog vaak deelt, bijvoorbeeld bij leverbeschadiging of bij jonge patiënten, kan het zijn dat de effectiviteit vermindert. Daarom willen we effectiviteit zowel in een volgroeide lever als een lever met veel celdeling onderzoeken. Een tweede vraagstelling is of er off-target effecten zijn van de virale toediening van gemodificeerd U1 snRNA. Dit willen we onderzoeken als er effectiviteit van bovenstaand experiment is aangetoond, dus langere overleving en/of lagere ALT/AST (en bij OCT ook ammoniak) waarden t.o.v. de muizen in de groep die wild-type U1 snRNA toegediend heeft gekregen. Na een nog vast te stellen periode (zie verder) worden muizen uit beide groepen geofferd en weefsels verzameld voor analyse met RNA-seq om te onderzoeken of er verschillen zijn in genexpressie tussen beide groepen. Het is noodzakelijk dit in gezonde muizen te doen omdat het herstel van FAH of OTC activiteit zelf al verschillen in genexpressie zal geven (on-target effect) en hiermee off-target effecten onduidelijk zijn. De exacte periode tussen AAV toediening en isolatie van weefsel zal worden bepaald naar aanleiding van de resultaten met OTC en FAH-deficiënte muizen als het snelste moment dat effectiviteit duidelijk was omdat eventuele off-target effecten dan ook hebben kunnen optreden. Gezien de historische ontwikkeling van het fenotype zal dat met grote waarschijnlijkheid 1-3 weken na AAV toediening zijn.

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

De muizen bereiken een volwassen leeftijd onder condities die de presentatie van de ziekte sterk verminderen. Voor OTC deficiëntie is dit een laag-eiwit dieet, voor FAH deficiëntie is dat met NTBC in het drinkwater. Omdat de sequenties voor FAH en OTC anders zijn en muizen met andere genetische achtergrond worden gebruikt worden effecten van injecties met FAH of OTC splice-rescue U1 snRNA onafhankelijk van elkaar onderzocht. De opzet van deze experimenten in de twee modellen is identiek en toegelicht in de figuur in 3.4.3.

Vraagstelling: Is er verbeterde overleving na toediening met splice-rescue U1 snRNA t.o.v. controle (Q1



in schema)?

Muizen krijgen hiertoe virus toegediend. Kort na toediening wordt het dieet of drinkwater aangepast zodat de ziekte zich kan ontwikkelen en dit wordt gemonitord met bloedafnames. Eerste dagen en weken worden de muizen frequent gemonitord (exp A). Bij behandeling met AAV zullen waarschijnlijk antilichamen gevormd worden die een volgende toediening met AAV neutraliseren en infectie verhinderen. Patiënten zullen daarom in de toekomst bij voorkeur slechts eenmaal behandeld worden. Daarom is het van belang te onderzoeken of de behandeling langdurig werkzaam blijft en we denken dat het voor deze vraagstelling nodig is om de dieren 6 maanden te monitoren (exp C). Hiertoe zal een maandelijks bloedafname (kleine volumes) waarschijnlijk voldoende zijn. Na maximaal 6 maanden eindigt het experiment en worden weefsels uitgenomen voor analyse van eiwitexpressie en eventuele orgaanschade.

Vraagstelling: Zijn er off-target effecten van splice-rescue U1 snRNA

In een ander experiment (exp B) wordt de injectie met een werkzaam virus herhaald in wild-type dieren om off-target effecten vast te stellen. De resultaten van dit experiment zullen bijdragen bij het vaststellen van de veiligheid van de strategie.

Vraagstelling: Is splice-rescue U1 snRNA ook langdurig effectief in delende levercellen? Als er aangetoond kan worden dat het virus langdurig (>4 maanden) effectieve bescherming biedt wordt het experiment herhaald (exp D) waarbij kort na injectie met virus en partiële hepatectomie wordt uitgevoerd om celdeling te induceren en een groeiende lever na te bootsen en te toetsen of de behandeling met gemodificeerd U1 snRNA ook in een groeiende lever effectief en veilig is. De uitlees van dit experiment is identiek en de dieren worden 6 maanden gevolgd.

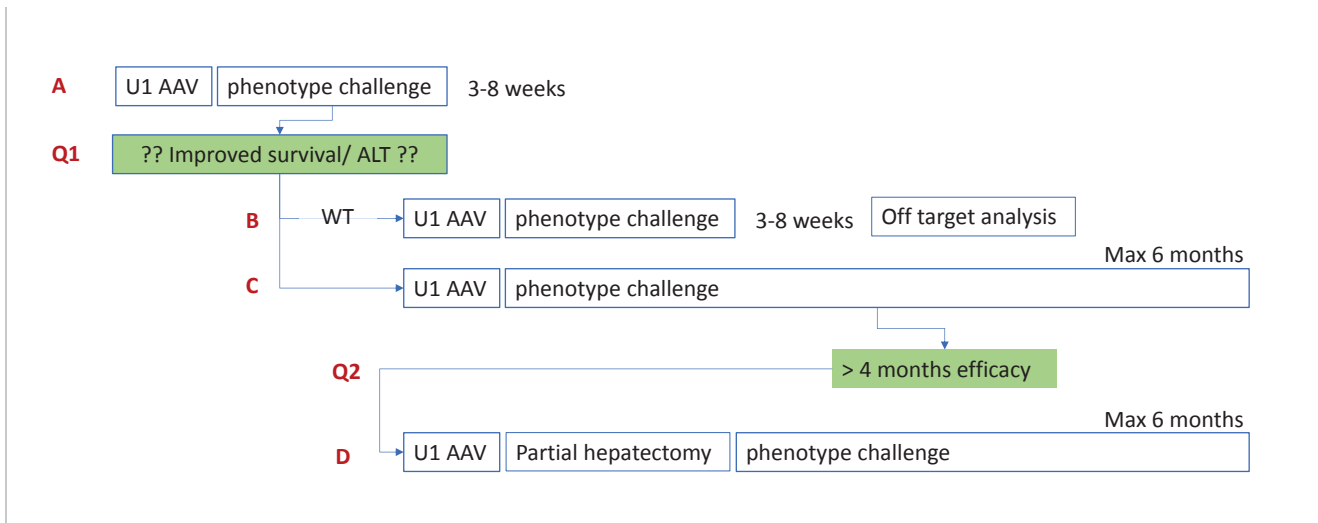
---

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.

---

Een schematisch overzicht van de experimenten (A-D) met beslismomenten (Q1 en Q2) in groen weergegeven staat hieronder weergegeven. Er worden verschillende doseringen virus toegediend om te achterhalen wanneer het effectief is en of er verschil in duur van de effectiviteit of in off target effecten is van verschillende doseringen. Zodra er in experiment A een verbetering in het fenotype zichtbaar is in de groep die gemodificeerd U1 snRNA heeft gekregen t.o.v. de controlegroep (Q1) kan worden gestart met 2 experimenten. Bij een toename in overleving van tenminste 15% zullen deze vervolgsperimenten gestart worden. Een hiervan (exp B) dient om eventuele off-target effecten vast te stellen. Hiertoe wordt hetzelfde virus en dosis toegediend aan wild-type dieren. Deze proef dient om te achterhalen of er off-target effecten zijn op gentranscriptie. We willen dit uitvoeren in wild-type dieren omdat hierin de therapeutische effecten (herstel OTC/FAH activiteit) geen rol spelen en alle verschillen per definitie off-target zijn. Een ander experiment (exp C) dient om lange termijn werkzaamheid vast te stellen. Kort na toediening van het virus zal de ontwikkeling van het ziektebeeld (of uitblijven hiervan) regelmatig worden gecontroleerd tot maximaal 6 maanden. Als langdurig (>4 maanden na injectie met AAV) bescherming gedetecteerd wordt (Q2), wordt getest of deze bescherming ook optreedt in levers met veel celdeling. Hiertoe wordt een partiële hepatectomie uitgevoerd (exp D) zodat er meerdere celdelingen nodig zijn om de lever de normale grootte te laten aannemen.

---



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

Volgnummer	Type dierproef
1	Injectie met AAV onder een aangepast dieet gevolgd door bloedafname en weefseluitname
2	
3	
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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

## 1 Algemene gegevens

- 1.1 Titel van het project | Op weg naar nieuwe behandelingen voor erfelijke stofwisselingsziekten |
- 1.2 Looptijd van het project | 5 jaar |
- 1.3 Trefwoorden (maximaal 5) | Erfelijke ziekten, innovatieve therapie; gentherapie |

## 2 Categorie van het project

- 2.1 In welke categorie valt het project.
- U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.*
- Fundamenteel onderzoek
- Translationeel of toegepast onderzoek
- Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
- Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid
- 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)
- Patiënten met de erfelijke stofwisselingsziekten Ornithine transcarbamoylase (OTC) en tyrosinemie type 1 missen een enzym dat betrokken is in de stofwisseling. Deze ziekten geven ernstige ziektebeelden. Aan de laatst genoemde ziekte kunnen kinderen zonder goede behandeling vroegtijdig overlijden. De huidige behandeling is beperkt en/of zeer ingrijpend. Doel van het hier voorgestelde project is om een totaal nieuwe strategie te onderzoeken, waarbij het erfelijke defect hersteld kan worden en leidt tot herstel van de ziekte. Het defect wordt veroorzaakt door vertalingsfouten van het DNA naar het enzym dat nodig is voor de stofwisseling. Deze fouten worden "splicedefecten" genoemd. Slechts een deel van het DNA bevat de informatie die nodig is om eiwitten, in dit geval het enzym, te kunnen maken (exonen). Tussen deze exonen ligt DNA met een onduidelijke inhoud

(intronen). Voor een goede vertaling moeten deze intronen weggehaald worden zodat de exonen naadloos aan elkaar komen. Bij erfelijke mutaties in gebieden dichtbij exon-intron overgangen gaat dit proces vaak mis. Het wordt geschat dat bij ruim 15% van alle erfelijke ziekten een "splice-defect" de reden is. Het lijkt mogelijk om aangedane cellen in het lichaam te instrueren hoe om te gaan met het erfelijke defect en op een correcte manier de intronen te verwijderen. Onze strategie is om de cel een aangepast eiwit te laten maken dat onderdeel is van dit proces, en dat deze vertalingsfouten kan corrigeren. In het laboratorium kan het "splicingprobleem" met deze strategie opgelost worden. In dit project gaan we de eventuele bij-effecten van deze aanpak, en het herstel van de ziekte onderzoeken.

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

Wetenschappelijk belang: Tot nu toe hebben we de effectiviteit van de strategie om de genetische fout te herstellen alleen in het laboratorium onderzocht. Dit project zal duidelijk maken of deze strategie ook in een proefdiermodel voor deze ziekten toepasbaar is en/of er nadelige bij-effecten optreden.

Maatschappelijk belang: In ruim 15% van alle patiënten met erfelijke mutaties leiden deze specifieke defecten tot het ontwikkelen van de ziekte. Dit onderzoek kan bijdragen in de ontwikkeling van nieuwe therapie voor een deel van deze mensen. In veel gevallen is er momenteel geen enkele therapie beschikbaar.

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

Muizen; 650

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

De therapie zal worden vergeleken met controle dieren die geen therapie krijgen. In deze controles zullen de ziekten OTC of Tyrosinemie zich volledig ontwikkelen waardoor deze controle muizen ziek zullen worden. Omdat deze ziekten zich meestal presenteren bij jonge kinderen met een groeiende lever zal de effectiviteit van de therapie ook worden onderzocht in diersystemen met veel levergroei. Dit wordt veroorzaakt door een operatie waarbij een gedeelte van de lever wordt verwijderd. De lever zal hierdoor gaan groeien. De operatie kan, ondanks pijnstilling, mogelijk pijn en stress veroorzaken.

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

Muizen die meer dan 20% gewicht verliezen ten opzichte van het maximaal bereikte gewicht zullen worden geëuthanaseerd. De FAH- (tyrosinemie) of OTC deficiënte muizen die de controle therapie toegediend krijgen, zullen waarschijnlijk allemaal gewicht gaan verliezen als gevolg van leverschade. OTC deficiënte muizen die de therapie krijgen zullen alleen gewicht gaan verliezen als de behandeling niet (meer) werkt en zullen waarschijnlijk minder ongerief ondervinden. In controle dieren zal verder gekeken worden of er nog bij-effecten zijn. Het totale ongerief van de dieren in deze proeven zal niet meer zijn dan matig.

3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?

De dieren worden gedood en weefsels uitgehaald voor verdere analyse.

## 4 Drie V's

4.1 **Vervanging**  
Geef aan waarom het

De methode die de vertalingsfout moet corrigeren wordt in het laboratorium

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

geoptimaliseerd met behulp van mini-genen en op gekweekte cellen. Om te onderzoeken of deze strategie ook gebruikt kan worden om de ziekte te behandelen, zijn dierstudies onvermijdelijk, omdat de gentherapie, zoals we dit in de toekomst mogelijk zouden willen uitvoeren in mensen, niet goed na te bootsen is in proefdiervrije modellen, omdat de structuur van de lever en de interactie met het immuunsysteem van belang zijn. Ook de analyse van mogelijke bij-effecten vereisen het gebruik van een intacte lever in een proefdier.

#### 4.2 **Vermindering**

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

Er is al veel ervaring opgedaan met dit type gentherapie in muizen en met de ontwikkeling van de ziekte in muizen. Met statistiek wordt het minimaal aantal dieren bepaald dat nodig is voor het beantwoorden van de wetenschappelijke vraag. De onderzoeksgroep heeft veel ervaring met de techniek die gebruikt gaat worden; er hoeven dus geen extra dieren gebruikt te worden om de techniek verder te ontwikkelen. Experimenten gericht op het bepalen van effectiviteit in een groeiende lever zullen alleen worden uitgevoerd als er bewijs voor effectiviteit is in volwassen 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.

Er wordt gebruik gemaakt van muismodellen die sterk lijken op de ziekte in de mens. De fout in het DNA in muizen met OTC deficiëntie is dezelfde als in mensen met deze ziekte en de exon-intron overgang lijken zeer sterk op elkaar. Behalve dat deze studie zal aantonen dat deze strategie bruikbaar is om een dergelijke fout in het DNA te corrigeren, zal dit deel van de studie ook bijdragen aan de voortgang van deze aanpak naar de klinische toepassing ervan in mensen.

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

Bij operaties wordt pijnbestrijding gegeven. Er worden humane eindpunten gehanteerd zodat de dieren niet langdurig lijden. Specifiek wordt daarbij o.a. gelet op gewichtsafname en uiterlijke kenmerken van ziekte.

## 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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11800				
1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Academic Medical Center Amsterdam				
1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.  <i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>	<table><thead><tr><th>Volgnummer</th><th>Type dierproef</th></tr></thead><tbody><tr><td>1</td><td>Injectie met AAV onder een aangepast dieet gevolgd door bloedafname en weefseluitname</td></tr></tbody></table>	Volgnummer	Type dierproef	1	Injectie met AAV onder een aangepast dieet gevolgd door bloedafname en weefseluitname
Volgnummer	Type dierproef				
1	Injectie met AAV onder een aangepast dieet gevolgd door bloedafname en weefseluitname				

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Er worden muismodellen gebruikt voor 2 ziektebeelden; tyrosinemie (fumarylacetoacetate hydrolase; FAH-deficiëntie) en OTC deficiëntie. Voor de start van de behandeling worden FAH-deficiënte muizen behandeld met 2-(2-Nitro-4-trifluoromethylbenzoyl) -1,3-cyclohexanedione (NTBC) NTBC in het drinkwater. Deze stof remt 4-hydroxyfenylpyruvaatdioxigenase, een enzym upstream van FAH, en dit voorkomt de ophoping van toxische metabolieten. OTC-deficiënte muizen worden op een laag-eiwit dieet gehouden wat zorgt dat de ammoniakconcentratie in het bloed normaal blijft. Jong-volwassen muizen worden behandeld met AAV met het aangepaste U1 snRNA dat bij in vitro modellen een verbetering geeft in splicing per ziektebeeld, of AAV met de wild-type U1 snRNA sequentie. Verder zal er een controlegroep met nestgenoten zijn met een werkend FAH en OTC gen, deze hebben geen fenotype. Kort (2-7 dagen) na deze injectie wordt in de FAH groep gestopt met de toediening van NTBC in het drinkwater. In de OTC groep wordt 2-7 dagen na AAV toediening gestart met een hoog-eiwit dieet. Deze veranderingen induceren het fenotype in deficiënte muizen, welke door de behandeling met aangepaste U1 snRNA waarschijnlijk zal verminderen. Primaire uitkomstparameters zijn plasmaconcentraties ammoniak (voor OTC-deficientie) en AST en ALT (voor FAH en OTC-deficientie). Deficiënte muizen met een controlebehandeling zullen lever- en nierschade ontwikkelen en zouden overlijden binnen 6-8 weken. AAV-behandelde muizen zullen maximaal 6 maanden na injectie gedood worden en organen worden verzameld voor analyse van FAH/OTC expressie en histologie geanalyseerd op tekenen van lever- of nierschade. Specifiek voor FAH-deficiëntie wordt gekeken of er een vermindering is van levertumoren, welke vaak voorkomen in deze ziekte, zelfs als er met NTBC wordt behandeld. De vergelijkingsgroep hierbij zijn FAH deficiënte muizen die gedurende het hele experiment op NTBC worden gehouden

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.

Voor aanvang van het experiment worden muizen die deficiënt zijn voor FAH of OTC respectievelijk behandeld met NTBC in het drinkwater of op een laag-eiwit dieet gehouden om ongerief en orgaanschade te vermijden. De dieren krijgen een eenmalige injectie in de staartvene waarbij virus wordt toegediend. Het toedieningsvolume is conform de richtlijn beschreven in Diehl et al (2001). Enige tijd hierna worden OTC deficiënte dieren op een hoog-eiwit dieet geplaatst en wordt bij de FAH-deficiënte muizen gestopt met de toediening van NTBC (m.u.v. 1 controlegroep). In de eerste maand wordt wekelijks een druppeltje bloed afgenomen, later maandelijks om een beeld te krijgen van effect van deze therapie op het ziektebeloop in de tijd. Maximale duur van het experiment is 6 maanden. Hierna worden de muizen geofferd en bloed en organen uitgenomen. Dit laatste dient om de expressie van OTC en FAH in verschillende weefsels te kunnen analyseren. Ook kan hierdoor de bio-distributie van de AAV vector worden vastgesteld. Zes maanden is lang genoeg om ook een mogelijke vermindering van levertumoren bij FAH deficiëntie te kunnen vaststellen. Als er een in eerste instantie zichtbare verbetering van het fenotype is ten gevolge van de behandeling met gemodificeerd U1 snRNA optreden, maar daarna toch een afname van lichaamsgewicht met >10% zal 1 week NTBC worden toegevoegd in het drinkwater. Eerder is beschreven dat zo'n tijdelijke farmacologische "hulp" daarna kan leiden tot chronische effectiviteit (Yin, Nat Biotech 2014)

#### Partiele hepatectomie:

Een partiele hepatectomie in volwassen dieren wordt uitgevoerd onder algehele anaesthesie en peri-operatieve pijnbestrijding. De lever groeit snel weer aan, maar dit vereist celdeling. Onderzocht zal worden of het therapeutische effect van de gemodificeerde U1 snRNA vectoren daarna aanhoudt.

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

De experimenten om eventuele off-target effecten van een OTC of FAH splicing-corrigerend U1 snRNA en lange termijn effectiviteit worden getoetst zullen alleen worden uitgevoerd als er effectiviteit is vastgesteld. Er worden alleen U1 snRNA vectoren gebruikt die bij in vitro modellen effectiviteit laten zien.

De poweranalyse is gebaseerd op een vergelijk tussen 2 groepen, waarbij een groep met gemodificeerd U1 snRNA vergeleken wordt met de groep die dezelfde dosis wild-type (controle) U1 snRNA ontvangt.

Er zullen naar verwachting ongeveer 20 dieren per groep nodig zijn. Dit gebaseerd op basis van survival-analyse (<http://www.sample-size.net/sample-size-survival-analysis/>) waarbij we aannemen dat de controle dieren een 3.5-voudig hogere hazard ratio hebben en de totale meettijd ruim langer is dan de verwachte duur waarbij we in de controlegroep events zien (uitval van deze dieren is verwacht na enkele weken).

Voor de analyse van de off-target effecten kan met 6 muizen per groep een verschil van 50% met een s.d. van 30% kan worden waargenomen en kleinere verschillen zullen als niet-relevant worden beschouwd.

## B. De dieren

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

Experimenten worden uitgevoerd met geaccepteerde muismodellen voor tyrosinemie en OTC-deficiëntie. Deze lijnen worden gefokt in de eigen dierfaciliteit omdat er speciale behandelingen (NTBC in drinkwater, laag eiwitdieet) vereist zijn om homozygote pups te laten overleven.

Voor OTC deficiëntie worden alleen mannetjes gebruikt, vanwege de X-linked overerving. Voor FAH deficiëntie worden zowel mannetjes als vrouwtjes gebruikt.

Er worden volwassen dieren gebruikt..

Per experiment worden 5 groepen gebruikt, met ~20 dieren per groep.

Deze 5 zijn: i) OTC/FAH intacte dieren, ii) FAH or OTC deficiënt met lage dosis controle AAV, iii) FAH of OTC deficiënt met hoge dosis AAV, iv) FAH of OTC deficiënt met lage dosis rescue U1 snRNA AAV, v) FAH of OTC deficiënt met hoge dosis rescue U1 snRNA AAV. Om een mogelijke vermindering van de vorming van levertumoren te bepalen wordt er bij de FAH deficiënte groep een extra groep gebruikt die continue op NTBC wordt gehouden.

Off-target effecten worden in wild-type dieren uitgevoerd. Deze worden verkregen als de FAH/OTC positieve littermates uit de eigen fok. Hierbij worden 2 groepen vergeleken, behandeld met wild-type U1 snRNA of gemodificeerd U1 snRNA, met een enkele (effectieve) dosis. Voor het FAH project komt dit totaal op: Exp A+ D: elk 5 groepen \* 20 dieren (samen 200)

Exp B (off target analyse groepen): 2 groepen van 6 muizen (samen 12)  
Exp C (lange termijn effect): 6 groepen \* 20 muizen (samen 120). Voor FAH komt dit op ~332  
Voor OTC betreft het een groep minder in exp C, dus ~312. Totaal geschat op zo'n 650 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.

Vervanging: De dierproeven zijn essentieel vanwege de interactie van immuunsysteem en lever, en de specifieke effecten de complexe structuur van de lever op transductie met AAV. Alle optimalisatie van effectiviteit van het gemodificeerde U1 snRNA wordt uitgevoerd met behulp van minigenen en celweek. Om de therapeutische effectiviteit te onderzoeken zijn dierstudies daarom onvermijdelijk, en hetzelfde geldt voor analyse van off-target effecten in dezelfde setting.

Verfijning: De mate van ongerief wordt beperkt doordat de gebruikte OTC deficiënte muizen pas na een dieet ziekteverschijnselen laten zien en op een laag-eiwit dieet geen fenotype hebben. FAH muizen krijgen NTBC wat het ongerief verhindert. De dieren worden frequent gemonitord via bloed parameters om ongerief vroeg te detecteren en hiermee beperkt wordt. Ongerief na de gedeeltelijke hepatectomie wordt beperkt door peri-operatief gebruik van pijnstilling. Er wordt gebruik gemaakt van muismodellen die de ziekte in de mens zoveel mogelijk benaderen. De mutatie in OTC deficiëntie is dezelfde als in mensen en de sequenties van de exon-intron overgang lijken zeer sterk op elkaar. Behalve proof-of-concept zal dit deel van de studie hiermee ook bijdragen aan de translatie van deze strategie naar een klinische trial in mensen.

Vermindering: Er is al veel ervaring opgedaan met AAV in muizen en met de ontwikkeling van de ziekten FAH en OTC in deze diermodellen. Voor OTC deficiëntie gebruiken we alleen mannetjes, omdat het gen op het X-chromosoom ligt bij muis en mens en de patiëntpopulatie met name mannen omvat vanwege deze X-linked overerving. Experimenten gericht op het bepalen van effectiviteit in een groeiende lever zullen alleen worden uitgevoerd als er bewijs voor effectiviteit is in volwassen muizen.

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

De FAH-deficiënte muizen worden pas van NTBC bevattend drinkwater afgehaald na aanvang van de behandeling. In deze aanloop is er geen fenotype. In een gunstig scenario, waarbij de effectiviteit voldoende is om de toxiciteit geassocieerd met FAH-deficiëntie te voorkomen, zullen de behandelde dieren zeer beperkt ongerief ondergaan. Hetzelfde geldt voor OTC-deficiënte muizen, die pas gechallenged worden met een hoog-eiwit dieet nadat de therapie gestart is.

Afname van de kleine volumina bloed die voor dit project al voldoende zijn zal zonder anaesthesie worden uitgevoerd, evenals de injectie van virus in de staartvene. Bij het offeren van venen bij de hepatectomie zullen dieren onder algehele anaesthesie worden gebracht. Bij operaties wordt pijnbestrijding toegepast. Alle experimenten met de AAV vectoren worden uitgevoerd in overeenstemming met geldende regels voor inperking, op DMII safety level. Alle samples van deze studie worden geanalyseerd op MLII inperkingsniveau tot ze gefixeerd zijn en virus daarmee volledig geïnactiveerd is.

## 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.

nvt

## 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.

Bij de muizen die hepatectomie ondergaan wordt pijnstilling toegepast tijdens en na de operatie ~~middels een eenmalige subcutane injectie met buprenorfine.~~

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Muizen ondervinden bij deze experimenten ongerief ten gevolge van de IV injecties en bloedafnames (beide ingeschat als gering). Een deel ondergaat hepatectomie onder anaesthesie met matig ongerief welke wordt verminderd door pijnbestrijding na de operatie. Er zijn verder ziekteverschijnselen tgv genetische modificatie: FAH- of OTC deficiënte muizen kunnen leverschade krijgen en daarmee geassocieerd gewichtsverlies. Omdat hiervoor een humaan eindpunt wordt gehanteerd is het ongerief beperkt. In FAH-deficiënte muizen kunnen op heel lange termijn levertumoren ontwikkelen die mogelijk ongerief geven, maar dit is niet voorzien in deze experimenten.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Gewichtsverlies in FAH/OTC deficiënte muizen is een gevolg van ophoping van toxische metaboliëten die tot

leverschade leiden. De oorzaak van levertumoren in FAH-deficiëntie is onbekend.

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

Muizen worden voor aanvang van de behandeling in condities gehouden waar er geen fenotype ontwikkelt. Tijdens het experiment worden geen additionele maatregelen genomen om leverschade te voorkomen, omdat het doel is om te onderzoeken of nieuwe therapie beter werkt dan controle-behandeling. Het ongerief ten gevolge van de leverschade wordt beperkt door de humane eindpunten mbt gewichtsverlies en het monitoren van bloedwaarden.

#### **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.

Muizen die meer dan 20% gewicht verliezen ten opzichte van het maximaal bereikte gewicht zullen worden geëuthanaseerd evenals dieren die tekenen van algehele malaise (zoals bolle rug, pilo-erectie, inactiviteit) vertonen.

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

De FAH- of OTC deficiënte muizen die het controle of gemodificeerd U1 snRNA toegediend krijgen lopen allemaal kans gewicht gaan verliezen als gevolg van leverschade. De controles krijgen het allemaal en de gene met gemodificeerd snRNA alleen als de behandeling niet (meer) werkt.

#### **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.

Controles zullen matig ondervinden; dieren behandeld met gemodificeerd U1 snRNA hebben licht tot matig ongerief afhankelijk van de effectiviteit. De dieren die voor off-target analyse worden gebruikt hebben waarschijnlijk licht ongerief, alleen bij onverwachte off-target effecten is het ongerief maximaal matig

### **Einde experiment**

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

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

Nee

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

Voor het beantwoorden van de vraagstelling moet lever- en niermateriaal microscopisch onderzocht worden. Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academic Medical Center Amsterdam

Meibergdreef  
1105 AZ AMSTERDAM

**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  
AVD118002016775

**Bijlagen**

2

Datum 17 augustus 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte ,

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 16 augustus 2017. Het gaat om uw project "RescU1 Splicing". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD118002016775. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

**Wacht met de uitvoering van uw project**

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

**Factuur**

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

**Meer informatie**

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

**Datum:**

17 augustus 2017

**Aanvraagnummer:**

AVD118002016775

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

**Datum:**  
17 augustus 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD118002016775

### **Gegevens aanvrager**

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 11800  
Naam instelling of organisatie: Academic Medical Center Amsterdam  
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: [REDACTED]  
KvK-nummer: 343362777  
Straat en huisnummer: Meibergdreef [REDACTED]  
Postcode en plaats: 1105 AZ AMSTERDAM  
IBAN: NL68RABO0136166741  
Tenaamstelling van het rekeningnummer: AMC

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]  
Functie: [REDACTED]/Onderzoeker  
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

**Datum:**

17 augustus 2017

**Aanvraagnummer:**

AVL18002016775

**Over uw project**

Geplande startdatum:

1 januari 2017

Geplande einddatum:

30 november 2021

Titel project:

RescU1 Splicing

Titel niet-technische samenvatting:

Corretie van splicingsdefecten bij erfelijke ziekten

Naam DEC:

DEC AMC

Postadres DEC:

Meibergdreef [REDACTED]

E-mailadres DEC:

[REDACTED]

**Betaalgegevens**

De leges bedragen:

€ 1035,-

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:

[REDACTED]

Functie:

[REDACTED]

Plaats:

Amsterdam

Datum:

17 augustus 2017



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

AMC crediteurenadministratie  
Postbus 400  
1115 ZJ DUIVENDRECHT  


**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  
AVD118002016775  
**Bijlagen**  
2

Datum 17 augustus 2017  
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 17 augustus 2017  
Vervaldatum: 16 september 2017  
Factuurnummer: 170775  
Ordernummer: Kostenplaatsnummer 

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD118002016775	€ 1035,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL29INGB 070.500.1512 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93144, 2509 AC te 's Gravenhage.

# Format DEC-advies

---

*Maak bij de toepassing van dit format gebruik van de Praktische Handreiking: Ethisch Toetsingskader voor proefdiergebruik. Voor voorbeelden, zie bijlage I.*

*Herhaling van antwoorden is niet nodig. Indien van toepassing kan verwezen worden naar een bij een eerdere vraag verstrekt antwoord.*

## A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer
  2. Titel van het project            **RescU1 Splicing**
  3. Titel van de NTS                **Op weg naar nieuwe behandelingen voor erfelijke stofwisselingsziekten**
  4. Type aanvraag:
    - nieuwe aanvraag projectvergunning
    - wijziging van vergunning met nummer
  5. Contactgegevens DEC:
    - naam DEC                            **DEC-AMC**
    - telefoonnummer contactpersoon   **██████████**
    - e-mailadres contactpersoon       **██████████**
  6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
    - ontvangen door DEC
    - aanvraag compleet
    - in vergadering besproken            **6 april 2017**
    - anderszins behandeld
    - termijnonderbreking(en) van / tot
    - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
    - aanpassing aanvraag
    - advies aan CCD
  7. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.
- De relevante onderdelen van de vergunningaanvraag (projectvoorstel en bijlagen) zijn in een traject voorafgaand aan de indiening ervan bij de DEC in overleg met de IvD tot stand gekomen.*

*Bij de punten 8 t/m 10 kan worden volstaan met 'n.v.t.' wanneer de betreffende acties niet aan de orde zijn geweest. Bij vragen die gericht zijn op het compleet maken van de aanvraag (aanvullingen achtergrond informatie etc) kan bij punten 8 en 9 worden volstaan met de vermelding van het type vragen en de vermelding dat de aanvraag op de desbetreffende onderdelen is aangepast of dat de antwoorden in de aanvraag zijn verwerkt. Bij vragen die gericht zijn op het verkrijgen van verklaringen voor keuzes die door de aanvrager gemaakt worden, kan niet worden volstaan met het weergeven van de strekking van de antwoorden tenzij de antwoorden volledig in de aanvraag zijn opgenomen. Als dat het geval is, moet dat in het DEC advies worden benoemd en in de aanvraag inzichtelijk worden gemaakt.*



8. Eventueel horen van aanvrager nvt
- Datum
  - Plaats
  - Aantal aanwezige DEC-leden
  - Aanwezige (namens) aanvrager
  - Gestelde vraag / vragen
  - Verstrekt(e) antwoord(en)
  - Het horen van de aanvrager heeft wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag
9. Correspondentie met de aanvrager nvt
- Datum
  - Gestelde vraag/vragen
  - Datum antwoord
  - Verstrekt(e) antwoord(en)
  - De antwoorden hebben wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag
10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC) nvt
- Aard expertise
  - Deskundigheid expert
  - Datum verzoek
  - Strekking van het verzoek
  - Datum expert advies
  - Advies expert

## B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Is het project vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)? Indien van toepassing, licht toe waarom het project niet vergunningplichtig is en of daar discussie over geweest is.  
*Indien niet vergunningplichtig, ga verder met onderdeel E. Advies.*  
>ja
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag ~~een wijziging op een bestaande vergunning.~~
3. Is de DEC competent om hierover te adviseren?  
>ja
4. Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom.  
>nee

## C. Beoordeling (inhoud)

1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft (*Zie handreiking 'Invulling definitie project'; zie bijlage I voor toelichting en voorbeeld*).

Deze aanvraag heeft een concrete hoofddoelstelling (het onderzoeken of gemodificeerde U1 snRNAs veilig in de lever tot expressie gebracht kunnen worden en effectief splice-defecten kunnen verhelpen) en kan getypeerd worden als een project met 3 subdoelen. De subdoelen zijn:

- A) Het bepalen van de effectiviteit om een genetisch splitsingsdefect te corrigeren met snRNA met behulp van een adeno-achtig virus in een model voor tyrosinemie en

OTC deficiëntie, die beiden gebaseerd zijn op een mutatie die leidt tot een splitsingseffect;

B) Het bepalen van off-target effecten;

C) Het bepalen van lange termijn effecten ook in delende levercellen (ontwikkeling van levertumoren).

De subdoelen zijn tijdsafhankelijk en dragen allen bij aan de hoofddoelstelling. Eerst zal subdoel A behaald worden voordat subvraag B en C beantwoord zullen worden. Dit maakt de aanvraag tot een toetsbaar en navolgbaar geheel. Het project lijkt haalbaar, afgaande op de ervaring van deze onderzoekers met de beide modellen en de ervaring met gentherapie binnen de onderzoeksgroep.

2. Signaleer of er mogelijk tegenstrijdige wetgeving is die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan. Het gaat hier om wetgeving die gericht is op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort (bijvoorbeeld Wet dieren en Wet Natuurbescherming).

>nvt

3. Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Nevendoelstellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel.

De aangekruiste doelcategorieën sluiten aan bij de hoofddoelstelling. Er wordt fundamenteel onderzoek gedaan naar het veilig (d.w.z. zonder ongewenste veranderingen in het transcriptoom) tot expressie brengen in de lever van gemodificeerde U1s snRNA en of dit effectief een genetisch splitsingsdefect kan verhelpen. Er wordt ook translationeel onderzoek gedaan naar verbetering van de behandeling van twee specifieke stofwisselingsziekten die veroorzaakt worden door een mutatie die leidt tot een genetisch splitsingsdefect (het niet goed scheiden van de exonen van de intronen binnen het pre-mRNA).

#### *Belangen en waarden*

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen. Beoordeel of het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C4; zie bijlage I voor voorbeeld*).

Het directe doel (het onderzoeken of gemodificeerde U1 snRNAs veilig in de lever tot expressie gebracht kunnen worden en effectief genetische splitsingsdefecten kunnen verhelpen) heeft een directe en reële relatie met uiteindelijke doel (het verbeteren van de behandelmethoden voor OTC en FAH deficiëntie en mogelijk voor andere erfelijke stofwisselingsaandoeningen die veroorzaakt worden door andere genetische splitsingsdefecten). Al zal de toepassing van deze behandelmethode in de verre toekomst liggen en niet binnen dit project gehaald worden, acht de DEC het onderzoek naar deze strategie noodzakelijk en gerechtvaardigd binnen de context van het onderzoeksveld.

5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 2.B en tabel 1; zie bijlage I voor voorbeeld*)

De belangrijkste belanghebbenden in dit fundamentele en translationele project dat gericht is op het corrigeren van een genetisch splitsingsdefect met behulp van gentherapie, zijn de proefdieren, de onderzoekers en de patiënten met OTC of FAH deficiëntie.

6. Is er aanleiding voor de DEC om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken?

Er is geen aanleiding om te twifelen aan het afwezig zijn van effecten op het milieu, zoals beschreven in de aanvraag. Alle experimenten met de AAV vectoren zullen worden uitgevoerd in overeenstemming met geldende regels voor inperking, op DMII veiligheidsniveau. Alle samples van deze studie zullen worden geanalyseerd op MLII inperkingsniveau tot ze gefixeerd zijn en het virus daarmee volledig geïnactiveerd is.

#### *Proefopzet en haalbaarheid*

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw beoordeling toe. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C5*).

De IvD ziet er op toe dat alle personen die betrokken zijn bij dit onderzoek, zowel de onderzoekers als de analisten die de experimenten gaan uitvoeren, als de onderzoekers die het project hebben vormgegeven en hebben opgeschreven, voldoen aan de wettelijke eisen van kennis en deskundigheid.

De kennis en kunde van de onderzoekers worden geborgd door de ruime ervaring van de onderzoeksgroep met virale injectie in proefdieren en hepatectomie. Ze hebben ervaring met het FAH model en goede samenwerkingen met wereldwijde experts op gebied van FAH en OCT deficiëntie.

8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw beoordeling toe. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C6*).

Het project is goed opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten logisch en helder aan bij de aangegeven doelstellingen. De gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstellingen gesteld binnen het project. Er worden twee modellen gebruikt voor het onderzoeken van deze gentherapie strategie. In de eerste experimenten wordt onderzocht of de gentherapie de leverschade kan uitstellen of zelfs voorkomen in de beide ziektenmodellen. Het gebruik van twee ziektenmodellen vindt de DEC gerechtvaardigd omdat naast het effect van de therapie in twee relevante ziektenmodellen, dit ook bijdraagt aan de uiteindelijke doelstelling. Het aantonen dat deze strategie effectief is in twee verschillende ziektemodellen, die wel gebaseerd zijn op een soortgelijk defect, zullen namelijk bijdragen aan de inschatting van de bruikbaarheid van deze gentherapiestrategie voor gensplitsingsdefecten. Er zijn ook GO/No GO momenten geformuleerd. Pas als er verbetering optreedt (>15%) in de veroorzaakte leverschade zullen de lange termijneffecten en ongewenste bijeffecten onderzocht worden. Ook zal het effect van sneldelende levercellen pas onderzocht worden, als duidelijk is dat de strategie met gentherapie werkt.

#### *Welzijn dieren*

9. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. Beoordeel of de keuze hiervoor voldoende wetenschappelijk is onderbouwd en of de aanvrager voldoet aan de in de Wet op de Dierproeven (Wod). voor de desbetreffende categorie genoemde beperkende voorwaarden. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C1; zie bijlage I voor toelichting en voorbeelden*).

- Bedreigde diersoort(en) (10e, lid 4)
- Niet-menselijke primaten (10e)
- Dieren in/uit het wild (10f)
- Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn)
- Zwerfdieren (10h)
- Hergebruik (1e, lid 2)
- Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
- Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
- Dodingsmethode niet volgens bijlage IV richtlijn (13c, lid 3)

Er is geen sprake van bijzondere dieren, omstandigheden of behandelingen.

10. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan, omdat het, om redenen van dierenwelzijn of diergezondheid of om wetenschappelijke redenen, noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe.

Er wordt voldaan aan bijlage III.

11. Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*).

Ongeriefinschatting is in overleg met de IvD tot stand gekomen, met gebruikmaking van de Toelichting Codering Ongerief. De DEC meent dat deze inschatting juist is. Het ongerief is ingeschat als maximaal matig. De dieren waarbij leverschade optreedt, wat gecontroleerd zal worden door gewichtsverlies te meten en bloedwaardes in het bloed te bepalen, zullen matig ongerief ondergaan. In dieren waarbij de gentherapie zal werken zal ongerief beperkt kunnen blijven tot licht.

12. Het uitvoeren van dierproeven zal naast het ongerief vaak gepaard gaan met aantasting van de integriteit van het dier. Beschrijf op welke wijze er sprake is van aantasting van integriteit. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*). (*zie bijlage I voor voorbeeld*).

De "heelheid" van het dier wordt niet aangetast zodanig dat er sprake is van vermindering of ontneming van soort-specifieke eigenschappen. Er is wel sprake van genetische modificatie van de betreffende mutatie in de lever. De doelstelling is echter dat dit het ziektebeeld zal verminderen.

13. Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

Het humane eindpunt is gedefinieerd als een gewichtsverlies van meer dan 20% lichaamsgewicht ten opzichte van het maximaal bereikte gewicht. Er is geen percentage geschat omdat het humane eindpunt ook het experimentele eindpunt van de studie is. De leverschade wordt gemeten door het bloed te monitoren op ammoniak verbindingen en het lichaamsgewicht te volgen. Zodra dieren meer dan 20% gewichtsverlies hebben, worden ze opgeofferd voor analyse. In principe kunnen alle dieren dus het HEP bereiken, behalve de controle dieren die beschermd worden tegen het ontwikkelen van leverschade door NTBC en in het geval dat de gentherapie effectief blijkt te zijn. De dieren worden beschermd tegen onverwacht ongerief doordat, naast het gewichtsverlies van 20%, ook tekenen van algehele malaise zijn opgenomen in het humane eindpunt.

### 3V's

14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

De aanvrager gebruikt vervangingsalternatieven waar mogelijk. De optimalisatie van de effectiviteit van het gemodificeerd U1 snRNA wordt in-vitro uitgevoerd met mini-genen. Het uiteindelijk testen van de therapie in de lever waar de aandoening tot uiting komt moet in een proefdier onderzocht worden omdat dan onderzocht kan worden of de vector daadwerkelijk de lever bereikt, het orgaan waar de correctie nodig is, en wat de verdere consequenties zijn met betrekking tot het voorkomen/remmen van het ziektebeeld.

15. Beoordeel of het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en of er een heldere strategie is om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

Het aantal dieren is realistisch ingeschat op basis van statistische methoden. Er is een voorlopige power berekening gedaan om de aantallen te schatten voor een "survival" analyse (genoemd onder A in bijlage I). Voor de off-target analyse is het aantal dieren lager ingeschat op basis van de powerberekening. Daarnaast voorkomt het Go/No Go moment na de eerste onderzoeksvraag (verbetering in overleving zonder leverschade) ervoor dat er geen dieren onnodig gebruikt zullen worden. (N.B.: De term survivalanalyse geeft wellicht een verkeerd beeld: de dieren worden getermineerd op het moment dat ze meer dan 20% gewichtsverlies hebben.)

16. Beoordeel of het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project zodanig is opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

De DEC oordeelt dat het project in overeenstemming is met de vereisten van verfijning van dierproeven en dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd omdat:

- 1) de leverschade pas tot uiting komt (dieetinterventie) als de dieren volwassen zijn en de proef daadwerkelijk start;
- 2) de dieren naast gewichtsverlies ook gecontroleerd worden op de bloedwaarden. Hierdoor kunnen de dieren die leverschade ontwikkelen vroeg gedetecteerd worden en beter in de gaten gehouden worden;
- 3) er wordt pijnbestrijding toegepast na de gedeeltelijke leververwijdering;
- 4) er is veel ervaring met deze modellen waardoor ongerief kan worden voorkomen. Het humane eindpunt is daarnaast duidelijk geformuleerd, waarmee de mate van verfijning verder is geborgd.

17. Beoordeel, indien het wettelijk vereist onderzoek betreft, of voldoende aannemelijk is gemaakt dat er geen duplicatie plaats zal vinden en of de aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om tijdens de uitvoering van het project te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt. Licht uw beoordeling toe.  
nvt

*Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef*

18. Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd. (*Zie Praktische handreiking*

*ETK: Stap 1.C3; zie bijlage I voor voorbeeld).*

*Er wordt in dit onderzoek gelijk gebruik gemaakt van mannelijke en vrouwelijke dieren in het FAH model. Het OTC model wordt alleen in mannetjes verricht omdat de afwijking zich bevindt op het geslachtschromosoom X. In mensen hebben daarom vooral jongens deze afwijking. De DEC vindt de keus om dit model alleen in mannelijke dieren te onderzoeken daarom gerechtvaardigd.*

19. Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef). Indien dieren gedood worden, geef aan of en waarom dit noodzakelijk is voor het behalen van de doelstellingen van het project. Indien dieren gedood worden, geef aan of er een voor de diersoort passende dodingsmethode gebruikt wordt die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Zo niet, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. Indien van toepassing, geeft ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

De dieren worden gedood in het kader van het project. De dieren worden gedood om de lever- en nierschade te analyseren.

20. Indien niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren worden gedood om niet-wetenschappelijke redenen, is herplaatsing of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is.

nvt

NTS

21. Is de niet-technische samenvatting een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd?

Ja, deze is in overleg met de afdeling communicatie van de vergunninghouder bewerkt met het oog op de begrijpelijkheid. De NTS is een evenwichtige weergave van het project.

## **D. Ethische afweging**

1. Benoem de centrale morele vraag (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.A*). *Rechtvaardigt het onderzoeken van de effectiviteit van het tot expressie laten komen van gemodificeerd U1 snRNA (door middel van een virale vector) om een genetisch splitsingsdefect te verhelpen en daardoor het verminderen van de leverschade ten gevolge van dit defect in twee verschillende stofwisselingsziekten, het maximaal matige ongerief dat de muizen als proefdieren in het onderzoek zullen ervaren?*

2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn, ten opzichte van elkaar af. Om dit proces te vergemakkelijken, kunt u de belangrijkste belanghebbenden en de belangrijkste waarden die in het geding zijn waarderen. U kunt dit verwoorden in termen van gering, matig of veel/ernstig voordeel of nadeel. Geef aan waarom de DEC bevordering van waarden (baten) voor de ene belanghebbende prevaleert boven de aantasting van waarden (kosten) voor de andere belanghebbende (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.B; zie bijlage I voor voorbeelden*).

De belangrijkste belanghebbenden in dit fundamentele en translationele project dat gericht is op het onderzoeken van de bruikbaarheid van een specifieke gentherapie (het tot expressie brengen van gemodificeerd U1 snRNA) in het effectief verhelpen van een genetisch splitsingsdefect en het onderzoeken of deze strategie effectief is om het

optreden van lever- en nierschade te kunnen verhinderen in twee onafhankelijke ziektenmodellen, zijn op korte termijn de proefdieren en de onderzoekers.

Op lange termijn bestaan de belanghebbenden uit de patiënten met een tyrosinemie (FAH) of Ornithine transcarbamoylase (OTC) deficiëntie. Er is momenteel een behandeling die bestaat uit een zeer ingrijpend dieet en medicatie. Er is echter dringend behoefte aan een betere behandelingsmethode.

De muizen worden door dit onderzoek geschaad omdat een groot gedeelte lever- en nierschade zal ontwikkelen en hierdoor mogelijk stress en pijn zullen ondervinden.

De andere groep belanghebbenden, namelijk de onderzoekers, zullen door dit onderzoek hun fundamentele kennis en inzichten vergroten, welke gedeeld zullen worden met het wetenschappelijk veld. Aanvullende belangen van onderzoekers zouden kunnen zijn dat het onderzoek hun carrièremogelijkheden vergroot door publicaties en mogelijke patenten op nieuwe bevindingen kunnen verkrijgen.

Minder direct aanwezig zijn de waarden en belangen van de patiënten. De inzichten die dit onderzoek zullen opleveren, kunnen op termijn een belangrijke bijdrage leveren aan een betere behandeling van genetische splitsingsdefecten en met name voor FAH of OTC deficiënties. Dit valt echter buiten het directe onderzoeksdoel van deze studie.

Hoewel 650 muizen maximaal matig ongerief ondergaat, acht de DEC dit gerechtvaardigd door de verwachte gunstige gevolgen van dit onderzoek. Het wetenschappelijk belang is in dit project duidelijk geformuleerd en dit projectvoorstel zal hier direct aan bijdragen. Het maatschappelijk belang van dit projectvoorstel is dat er meer inzicht komt in de bruikbaarheid van een dergelijke genterapie strategie. Hierdoor kan de behandeling van genetische splitsingsdefecten mogelijk verbeterd worden. De toepassing van deze inzichten zal echter nog jaren duren en ligt buiten dit projectvoorstel.

De DEC waardeert de vermeerdering van de fundamentele kennis over het verhelpen van een genetische splitsingsdefect door middel van het tot expressie laten komen van een gemodificeerd U1 snRNA door middel van een virale vector, en het translationele onderzoek naar de therapeutische potentie van deze genterapie strategie voor het verhelpen van tyrosinemie (FAH) of Ornithine transcarbamoylase (OTC) deficiëntie, als het meest zwaarwegende gevolg dat tegen het maximaal matige ongerief van maximaal 650 muizen opweegt.

3. Beantwoord de centrale morele vraag. Maak voor het beantwoorden van deze vraag gebruik van bovenstaande afweging van morele waarden. Maak daarnaast gebruik van de volgende moreel relevante feiten: belang onderzoek (C4), kennis en kunde van betrokkenen (C7), haalbaarheid doelstellingen (C8), categorieën en herkomst dieren (C9), 3V's (C14-C18), ongerief (C10-13 en C19) en relevante wet en regelgeving (C2). Onderbouw hoe al deze elementen zijn meegewogen bij de beantwoording van de centrale morele vraag, zodanig dat het navolgbaar is zonder gedetailleerde kennis te hebben van het projectvoorstel (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.C; zie bijlage I voor voorbeeld*).

## **Op weg naar nieuwe behandelingen voor erfelijke stofwisselingsziekten**

De DEC is van mening dat het belang van het onderzoeken van de strategie om een genetisch splitsingsdefect met genterapie (expressie van gemodificeerd U1 snRNA door middel van een virale vector) te verhelpen en het onderzoeken van het effect van deze therapie in twee ziektenmodellen voor verschillende stofwisselingsziekten, het matige ongerief van de 650 muizen die maximaal matig ongerief zullen ondergaan, rechtvaardigt.

De DEC acht het aannemelijk dat de doelstelling behaald zal worden. Het wetenschappelijke en maatschappelijke belang van de doelstelling is duidelijk geformuleerd. In dit onderzoek zal een nieuwe behandelingsstrategie voor een genetisch splitsingsdefect ontwikkeld worden. Deze strategie wordt onderzocht in twee muismodellen waarbij een soortgelijke mutatie als in mensen, leidt tot een genetisch splitsingsdefect en waarin het fenotype goed gekarakteriseerd is. De muizen ontwikkelen op een eiwitrijk dieet lever- en ook nierschade. De remming van het ontwikkelen van lever- en nierschade wordt de belangrijkste uitleesparameter. De uitkomsten van dit onderzoek zullen bij kunnen dragen aan de ontwikkeling van een betere behandeling van stofwisselingsziekten zoals tyrosinemie (FAH) of Ornithine transcarbamoylase (OTC) deficiëntie. Dit zijn ernstige ziekten waarvan de symptomen onderdrukt worden door een zeer ingrijpend dieet met aanvullende medicatie. De behandeling is levenslang nodig en is niet altijd voldoende om het ziektebeeld te voorkomen. De DEC onderschrijft de noodzaak voor een betere behandeling van deze ziekten.

Om dit doel te bereiken zullen muizen gebruikt worden. Het matige ongerief dat de muizen ondergaan, wordt veroorzaakt door het ontwikkelen van lever- en nierschade. De DEC erkent dat deze modellen, geschikte modellen zijn om de bruikbaarheid van deze strategie te onderzoeken. De eerste onderzoeksvraag betreft de effectiviteit van deze therapie om de leverschade te verhinderen. Hier is een duidelijk Go/No Go moment beschreven. Bij een verbetering in de overleving met meer dan 15% zullen de vervolgvragen die verder ingaan op ongewenste bijeffecten en de lange termijn effecten op het ontwikkelen van levertumoren onderzocht worden. Deze Go/No Go stap borgt dat de vervolgvragen in een geschikte experimentele conditie worden uitgevoerd en voorkomt onnodig proefdiergebruik indien de therapie niet effectief zou blijken te zijn. De DEC is van mening dat alle onderzoeksvragen bijdragen en noodzakelijk zijn voor het behalen van de uiteindelijke doelstelling. De onderzoekers hebben proefdiervrije alternatieven gebruikt waar mogelijk, zoals mini-genen voor het optimaliseren van de gemodificeerde U1snRNA. De DEC is van mening dat deze vraagstellingen in dit projectvoorstel alleen in proefdieren onderzocht kan worden. De proeven worden zo verfijnd mogelijk uitgevoerd omdat de bloedwaarden van de dieren regelmatig gecontroleerd worden en zo vroege leverschade geïdentificeerd kan worden. Hierdoor kunnen deze muizen beter in de gaten gehouden worden om ongerief te voorkomen. De HEP is duidelijk omschreven en beschermt de dieren tegen het ontwikkelen van ernstig ongerief.

De DEC is bovendien van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven wetenschappelijke doelstellingen en dat de gekozen strategie en de experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen de kaders van het project. De DEC is er verder van overtuigd dat de aanvrager voldoende kennis en kunde heeft om de doelstelling te behalen. Tevens verwacht de DEC op basis van deze aanvraag dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om zowel het ongerief van de dieren alsmede het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken door groepsgrootte berekeningen te verrichten met data verkregen uit eerdere experimenten. De aanvrager heeft volgens de DEC overtuigend aangegeven dat gebruik van muizen voor het behalen van het directe doel noodzakelijk is en dat er geen geschikte proefdiervrije alternatieven mogelijk zijn.



Gezien het bovenstaande is de DEC van mening dat dit project het gebruik van proefdieren rechtvaardigt.

## E. Advies

### 1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

- De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
  - Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.
  - Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist
  - Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...
- De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
  - De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen:...
  - De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...
  - De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...

### 2. Het uitgebrachte advies kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt in de DEC. Indien gebaseerd op een meerderheidsstandpunt, specificeer het minderheidsstandpunt op het niveau van verschillende belanghebbenden en de waarden die in het geding zijn (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.A; zie bijlage I voor voorbeeld*).

Dit DEC advies is unaniem tot stand gekomen.

### 3. Omschrijf de knelpunten/dilemma's die naar voren zijn gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies zowel binnen als buiten de context van het project (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.B*).

Er zijn geen knelpunten of dilemma's naar voren gekomen bij dit projectvoorstel.

## Bijlage I: Voorbeelden

---

*De in deze bijlage weergegeven voorbeelden zijn alleen bedoeld om een indicatie te geven van het gewenste antwoord en dienen niet letterlijk overgenomen te worden.*

### A. Algemene gegevens over de procedure

A7. Voorbeeld: "De IvD geeft aan dat de aanvrager de aanvraag met de IvD heeft afgestemd en dat deze de instemming heeft van de IvD."

### C. Beoordeling (inhoud)

C1. Maak gebruik van de handreiking 'Invulling definitie project' om te bepalen of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft. Overleg de argumenten waarom dit wel of niet het geval is. Geef hierbij ook aan of 1) de aanvraag als programma of project getypeerd wordt (Een programma omvat meerdere projecten en heeft een hoger gelegen doel, terwijl een project een concrete onderzoeksvraag heeft met in principe één concrete doelstelling en een helder geformuleerd resultaat), 2) het project coherent is, waarbij alle dierexperimenten logisch samenhangen en nodig zijn om het beoogde concrete resultaat te bereiken en 3) alle stappen in het project voldoende zijn uitgewerkt en geen onzekerheden bevatten, die voor de ethische toetsing relevant zouden kunnen zijn.

Voorbeeld: "Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. De aanvraag komt overeen met voorbeeld 1 uit de handreiking 'Wat is een project': De verschillende subdoelen zijn zowel tijdsafhankelijk als uitkomstafhankelijk van elkaar. Deze subdoelen zijn allemaal noodzakelijk om de doelstelling te behalen. Het is niet mogelijk de individuele doelen te toetsen, omdat er sprake is van onderlinge afhankelijkheid. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft, zowel binnen de doelstellingen en bijlagen dierproeven, als tussen de doelstellingen, beschreven op basis van welke criteria zij zal besluiten het project wel of niet te continueren. De DEC is er daardoor van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft."

C4. Voorbeeld: "Het directe doel van het project is het verkrijgen van inzichten in de mechanismen die ten grondslag liggen aan de ontwikkeling van bot. Het uiteindelijke doel is het ontwikkelen van nieuwe behandelingsmogelijkheden die bijdrage aan het herstel van bot na trauma. Het betreft hier een fundamenteel project. Er is binnen dit project geen reële relatie tussen het directe doel en het uiteindelijke doel. De DEC acht het niet waarschijnlijk dat het uiteindelijke doel behaald zal worden binnen de duur van dit project. De aanvrager heeft helder gemaakt wat de status van het onderzoeksveld is en wat de bijdrage van dit project aan het onderzoeksveld zal zijn. Uit de aanvraag blijkt dat de kennis van de mechanismen die ten grondslag liggen aan de ontwikkeling van bot op dit moment zeer beperkt is, dat deze kennis noodzakelijk is voor het ontwikkelen van nieuwe behandelingsmogelijkheden en dat er behoefte is aan nieuwe behandelingsmogelijkheden. De DEC is van mening dat het directe doel, het verkrijgen van kennis over botontwikkeling, gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld."

C5. Voorbeeld: "De belangrijkste belanghebbenden in dit translationele project dat

gericht is op de ontwikkeling van een therapie voor de ernstige ziekte X zijn de proefdieren, de onderzoekers en de doelgroep/patiënt.

Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal worden aangetast, de dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en pijn ondergaan.

Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: De onderzoeker zullen kennis verkrijgen. Ook zal de carrièremogelijkheden van de onderzoekers verbeteren door publicaties en patenten.

Waarden die voor patiënten bevorderd worden: De gezondheid van patiënten zal verbeterd worden. Hierdoor zal de kwaliteit van leven verbeterd worden."

- C9. Het uitgangspunt is dat deze categorieën van dieren, omstandigheden of handelingen niet in dierproeven worden gebruikt. Hier kan alleen van af worden geweken indien er wetenschappelijk is onderbouwd waarom het doel van het project niet kan worden bereikt dan door gebruikmaking van de desbetreffende dieren. Daarnaast gelden er voor elk van de genoemde categorieën specifieke beperkende voorwaarden.

Voorbeeld A: "Er worden dieren uit het wild gebruikt. De aanvrager heeft als volgt onderbouwd waarom het noodzakelijk is wilde dieren te gebruiken:..... De DEC is van mening dat de doelstellingen van de proef niet behaald kunnen worden met dieren die speciaal voor onderzoek worden gefokt. De DEC is er verder van overtuigd dat het vangen van de dieren door deskundige personen zal gebeuren waardoor de kans op pijn en lijden beperkt zal worden. Ook is er een dierenarts beschikbaar om de dieren te onderzoeken/behandelen mocht tijdens of na het vangen blijken dat de dieren een slechte gezondheid hebben of gewond zijn geraakt."

Voorbeeld B: "Er wordt een dodingsmethode gebruikt die niet beschreven staat in bijlage IV van de richtlijn. De aanvrager heeft als volgt onderbouwd dat dit noodzakelijk is:..... De DEC is van mening dat de doelstellingen van de proef niet behaald kunnen worden indien een in de bijlage IV beschreven methode gebruikt wordt en het dus noodzakelijk is om een alternatieve methode te gebruiken. De DEC is van mening dat de beschreven alternatieve methode, te weten....., een acceptabel alternatief is, omdat....."

- C12.Voorbeeld: "De integriteit van dieren wordt fysiek aangetast door de dieren genetisch te veranderen. De integriteit zal ook gedragsmatig worden aangetast. Gedurende het project worden de dieren namelijk beperkt in hun bewegingsvrijheid en zullen de dieren individueel gehuisvest worden. Hierdoor zullen de dieren geen natuurlijk gedrag kunnen vertonen."

- C18.Voorbeeld: "De aanvrager zal in het project alleen gebruik maken van vrouwelijke dieren. De aanvrager geeft aan dit in het verleden altijd zo te hebben gedaan en wil dit graag op deze wijze voorzetten. De DEC is van mening dat de aanvrager niet in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd dat het om de doelstellingen te bereiken noodzakelijk is om de proeven met alleen vrouwelijke dieren uit te voeren. Ook heeft de aanvrager niet kunnen aantonen dat het uitvoeren van het project met zowel mannelijke als vrouwelijke dieren zal leiden tot een dermate grote variatie dat er aanzienlijk meer dieren gebruikt dienen te worden.

## **D. Ethische afweging**

- D2. Voorbeeld A: "Project gericht op ontwikkeling van een vaccin voor een ernstige, besmettelijke ziekte:  
Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: matig nadeel.  
Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: gering voordeel.  
Waarden die voor de doelgroep (de samenleving) bevorderd worden: veel voordeel  
De DEC is van mening dat de belangen van de samenleving in dit project zwaarder

wegen dan de belangen van en waarden voor de proefdieren. Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit leiden tot de ontwikkeling van een vaccin tegen een tot dusverre onbehandelbare ernstige, besmettelijke ziekte waar een grote groep mensen aan lijdt. Het is aannemelijk dat de doelstellingen behaald zullen worden. Om dit doel te bereiken worden dieren gebruikt. De onderzoekers doen er echter alles aan om het lijden van de dieren te beperken d.m.v. pijnbestrijding waardoor het werkelijke ongerief van de dieren beperkt blijft.”

Voorbeeld B: “Project gericht op het ontwikkelen van een therapie tegen een ziekte waar al veel behandelingsmogelijkheden voor zijn.

Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: ernstig nadeel.

Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: gering voordeel

Waarden die voor patiënten bevorderd worden: weinig voordeel

De DEC is van mening dat de belangen van de proefdieren in dit project zwaarder wegen dan de belangen van en waarden voor de patiënten. De DEC is van mening dat het om een ziekte gaat waar al goede behandelingsmogelijkheden voor zijn, de verwachte winst door een nieuwe behandeling zeer beperkt is en de kans dat de doelstellingen behaald worden zeer klein is. Daartegenover staat het ernstige ongerief dat de dieren zullen ondergaan.”

- D3. Voorbeeld (Zie D2 voorbeeld A): “De DEC is overtuigd van het belang van de doelstellingen: het ontwikkelen van een vaccin voor een ernstige, besmettelijke ziekte. De DEC is van mening dat de waarden die voor de doelgroep bevorderd kunnen worden zwaarder wegen dan de waarden die voor de proefdieren in het geding zijn. Het project is goed opgezet. De DEC is van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De DEC is er verder van overtuigd dat de aanvrager voldoende kennis en kunde heeft om de doelstellingen te behalen, te kunnen voldoen aan de 3V-beginselen en om te kunnen voorkomen dat mens, dier en het milieu negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven. De DEC is ook van mening dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om het ongerief van de dieren te beperken en het aantal dieren tot een minimum te beperken. Hoewel er sprake is van een bijzondere categorie dieren, dodingsmethode niet volgens bijlage IV, heeft de aanvrager in voldoende mate onderbouwd dat de doelstellingen niet anders bereikt kunnen worden. De DEC is van mening dat het gekozen alternatief acceptabel is en niet leidt tot meer ongerief. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat het voor het eerst ontwikkelen van een vaccin tegen ziekte X met als uiteindelijk doel het uitbannen van deze ziekte wereldwijd op de wijze zoals beschreven in dit project het gebruik van proefdieren rechtvaardigt.”

## **E. Advies**

- E2. Voorbeeld: “Het advies is gebaseerd op een meerderheidsstandpunt. Twee van de DEC leden zouden tot een negatief advies komen. Deze leden zijn van mening dat voor dit project de waarden van de proefdieren die in het geding zijn zwaarder wegen dan de waarden van de doelgroep die bevorderd zullen worden. De redenen hiervoor zijn.....”

**Van:** Info-zbo  
**Verzonden:** woensdag 13 september 2017 10:06  
**Aan:** [REDACTED]  
**CC:** 'projectaanvraag'; [REDACTED]  
**Onderwerp:** RE: OntvangstBevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven avd118002016775

Geachte [REDACTED],

Op 16 augustus 2017 hebben wij een aanvraag van u ontvangen met aanvraagnummer AVD118002016775. Wij hebben nog een aantal vragen over uw aanvraag.

U heeft niet inzichtelijk gemaakt hoeveel dieren licht en hoeveel dieren matig ongerief ondergaan. Ook is niet duidelijk hoeveel dieren naar verwachting een humaan eindpunt zullen bereiken. U wordt verzocht zowel de aanvraag als de NTS op deze punten aan te passen.

#### **Opsturen binnen veertien dagen**

De CCD zou uw aanvraag graag tijdens de eerstvolgende vergadering willen bespreken. Indien mogelijk ontvangen wij uw reactie daarom graag uiterlijk donderdag 14 september. Mocht dit niet mogelijk zijn, u heeft veertien dagen de tijd om de informatie aan te leveren. U kunt dit aanleveren via NetFTP of e-mail.

#### **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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Namens de Centrale Commissie Dierproeven

**Centrale Commissie Dierproeven** [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

**T: 0900 2800028**

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



## 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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11800	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Academic Medical Center Amsterdam	
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	Injectie met AAV onder een aangepast dieet gevolgd door bloedafname en weefseluitname

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Er worden muismodellen gebruikt voor 2 ziektebeelden; tyrosinemie (fumarylacetoacetate hydrolase; FAH-deficiëntie) en OTC deficiëntie. Voor de start van de behandeling worden FAH-deficiënte muizen behandeld met 2-(2-Nitro-4-trifluoromethylbenzoyl) -1,3-cyclohexanedione (NTBC) NTBC in het drinkwater. Deze stof remt 4-hydroxyfenylpyruvaatdioxigenase, een enzym upstream van FAH, en dit voorkomt de ophoping van toxische metabolieten. OTC-deficiënte muizen worden op een laag-eiwit dieet gehouden wat zorgt dat de ammoniakconcentratie in het bloed normaal blijft. Jong-volwassen muizen worden behandeld met AAV met het aangepaste U1 snRNA dat bij in vitro modellen een verbetering geeft in splicing per ziektebeeld, of AAV met de wild-type U1 snRNA sequentie. Verder zal er een controlegroep met nestgenoten zijn met een werkend FAH en OTC gen, deze hebben geen fenotype. Kort (2-7 dagen) na deze injectie wordt in de FAH groep gestopt met de toediening van NTBC in het drinkwater. In de OTC groep wordt 2-7 dagen na AAV toediening gestart met een hoog-eiwit dieet. Deze veranderingen induceren het fenotype in deficiënte muizen, welke door de behandeling met aangepaste U1 snRNA waarschijnlijk zal verminderen. Primaire uitkomstparameters zijn plasmaconcentraties ammoniak (voor OTC-deficientie) en AST en ALT (voor FAH en OTC-deficientie). Deficiënte muizen met een controlebehandeling zullen lever- en nierschade ontwikkelen en zouden overlijden binnen 6-8 weken. AAV-behandelde muizen zullen maximaal 6 maanden na injectie gedood worden en organen worden verzameld voor analyse van FAH/OTC expressie en histologie geanalyseerd op tekenen van lever- of nierschade. Specifiek voor FAH-deficiëntie wordt gekeken of er een vermindering is van levertumoren, welke vaak voorkomen in deze ziekte, zelfs als er met NTBC wordt behandeld. De vergelijkingsgroep hierbij zijn FAH deficiënte muizen die gedurende het hele experiment op NTBC worden gehouden

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.

Voor aanvang van het experiment worden muizen die deficiënt zijn voor FAH of OTC respectievelijk behandeld met NTBC in het drinkwater of op een laag-eiwit dieet gehouden om ongerief en orgaanschade te vermijden. De dieren krijgen een eenmalige injectie in de staartvene waarbij virus wordt toegediend. Het toedieningsvolume is conform de richtlijn beschreven in Diehl et al (2001). Enige tijd hierna worden OTC deficiënte dieren op een hoog-eiwit dieet geplaatst en wordt bij de FAH-deficiënte muizen gestopt met de toediening van NTBC (m.u.v. 1 controlegroep). In de eerste maand wordt wekelijks een druppeltje bloed afgenomen, later maandelijks om een beeld te krijgen van effect van deze therapie op het ziektebeloop in de tijd. Maximale duur van het experiment is 6 maanden. Hierna worden de muizen geofferd en bloed en organen uitgenomen. Dit laatste dient om de expressie van OTC en FAH in verschillende weefsels te kunnen analyseren. Ook kan hierdoor de bio-distributie van de AAV vector worden vastgesteld. Zes maanden is lang genoeg om ook een mogelijke vermindering van levertumoren bij FAH deficiëntie te kunnen vaststellen. Als er een in eerste instantie zichtbare verbetering van het fenotype is ten gevolge van de behandeling met gemodificeerd U1 snRNA optreden, maar daarna toch een afname van lichaamsgewicht met >10% zal 1 week NTBC worden toegevoegd in het drinkwater. Eerder is beschreven dat zo'n tijdelijke farmacologische "hulp" daarna kan leiden tot chronische effectiviteit (Yin, Nat Biotech 2014)

#### Partiele hepatectomie:

Een partiele hepatectomie in volwassen dieren wordt uitgevoerd onder algehele anaesthesie en peri-operatieve pijnbestrijding. De lever groeit snel weer aan, maar dit vereist celdeling. Onderzocht zal worden of het therapeutische effect van de gemodificeerde U1 snRNA vectoren daarna aanhoudt.

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

De experimenten om eventuele off-target effecten van een OTC of FAH splicing-corrigerend U1 snRNA en lange termijn effectiviteit worden getoetst zullen alleen worden uitgevoerd als er effectiviteit is vastgesteld. Er worden alleen U1 snRNA vectoren gebruikt die bij in vitro modellen effectiviteit laten zien.

De poweranalyse is gebaseerd op een vergelijk tussen 2 groepen, waarbij een groep met gemodificeerd U1 snRNA vergeleken wordt met de groep die dezelfde dosis wild-type (controle) U1 snRNA ontvangt.

Er zullen naar verwachting ongeveer 20 dieren per groep nodig zijn. Dit gebaseerd op basis van survival-analyse (<http://www.sample-size.net/sample-size-survival-analysis/>) waarbij we aannemen dat de controle dieren een 3.5-voudig hogere hazard ratio hebben en de totale meettijd ruim langer is dan de verwachte duur waarbij we in de controlegroep events zien (uitval van deze dieren is verwacht na enkele weken).

Voor de analyse van de off-target effecten kan met 6 muizen per groep een verschil van 50% met een s.d. van 30% kan worden waargenomen en kleinere verschillen zullen als niet-relevant worden beschouwd.

## B. De dieren

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

Experimenten worden uitgevoerd met geaccepteerde muismodellen voor tyrosinemie en OTC-deficiëntie. Deze lijnen worden gefokt in de eigen dierfaciliteit omdat er speciale behandelingen (NTBC in drinkwater, laag eiwitdieet) vereist zijn om homozygote pups te laten overleven.

Voor OTC deficiëntie worden alleen mannetjes gebruikt, vanwege de X-linked overerving. Voor FAH deficiëntie worden zowel mannetjes als vrouwtjes gebruikt.

Er worden volwassen dieren gebruikt..

Per experiment worden 5 groepen gebruikt, met ~20 dieren per groep.

Deze 5 zijn: i) OTC/FAH intacte dieren, ii) FAH or OTC deficiënt met lage dosis controle AAV, iii) FAH of OTC deficiënt met hoge dosis AAV, iv) FAH of OTC deficiënt met lage dosis rescue U1 snRNA AAV, v) FAH of OTC deficiënt met hoge dosis rescue U1 snRNA AAV. Om een mogelijke vermindering van de vorming van levertumoren te bepalen wordt er bij de FAH deficiënte groep een extra groep gebruikt die continue op NTBC wordt gehouden.

Off-target effecten worden in wild-type dieren uitgevoerd. Deze worden verkregen als de FAH/OTC positieve littermates uit de eigen fok. Hierbij worden 2 groepen vergeleken, behandeld met wild-type U1 snRNA of gemodificeerd U1 snRNA, met een enkele (effectieve) dosis. Voor het FAH project komt dit totaal op: Exp A+ D: elk 5 groepen \* 20 dieren (samen 200)

Exp B (off target analyse groepen): 2 groepen van 6 muizen (samen 12)  
Exp C (lange termijn effect): 6 groepen \* 20 muizen (samen 120). Voor FAH komt dit op ~332  
Voor OTC betreft het een groep minder in exp C, dus ~312. Totaal geschat op zo'n 650 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.

Vervanging: De dierproeven zijn essentieel vanwege de interactie van immuunsysteem en lever, en de specifieke effecten de complexe structuur van de lever op transductie met AAV. Alle optimalisatie van effectiviteit van het gemodificeerde U1 snRNA wordt uitgevoerd met behulp van minigenen en celweek. Om de therapeutische effectiviteit te onderzoeken zijn dierstudies daarom onvermijdelijk, en hetzelfde geldt voor analyse van off-target effecten in dezelfde setting.

Verfijning: De mate van ongerief wordt beperkt doordat de gebruikte OTC deficiënte muizen pas na een dieet ziekteverschijnselen laten zien en op een laag-eiwit dieet geen fenotype hebben. FAH muizen krijgen NTBC wat het ongerief verhindert. De dieren worden frequent gemonitord via bloed parameters om ongerief vroeg te detecteren en hiermee beperkt wordt. Ongerief na de gedeeltelijke hepatectomie wordt beperkt door peri-operatief gebruik van pijnstilling. Er wordt gebruik gemaakt van muismodellen die de ziekte in de mens zoveel mogelijk benaderen. De mutatie in OTC deficiëntie is dezelfde als in mensen en de sequenties van de exon-intron overgang lijken zeer sterk op elkaar. Behalve proof-of-concept zal dit deel van de studie hiermee ook bijdragen aan de translatie van deze strategie naar een klinische trial in mensen.

Vermindering: Er is al veel ervaring opgedaan met AAV in muizen en met de ontwikkeling van de ziekten FAH en OTC in deze diermodellen. Voor OTC deficiëntie gebruiken we alleen mannetjes, omdat het gen op het X-chromosoom ligt bij muis en mens en de patiëntpopulatie met name mannen omvat vanwege deze X-linked overerving. Experimenten gericht op het bepalen van effectiviteit in een groeiende lever zullen alleen worden uitgevoerd als er bewijs voor effectiviteit is in volwassen muizen.

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

De FAH-deficiënte muizen worden pas van NTBC bevattend drinkwater afgehaald na aanvang van de behandeling. In deze aanloop is er geen fenotype. In een gunstig scenario, waarbij de effectiviteit voldoende is om de toxiciteit geassocieerd met FAH-deficiëntie te voorkomen, zullen de behandelde dieren zeer beperkt ongerief ondergaan. Hetzelfde geldt voor OTC-deficiënte muizen, die pas gechallenged worden met een hoog-eiwit dieet nadat de therapie gestart is.

Afname van de kleine volumina bloed die voor dit project al voldoende zijn zal zonder anaesthesie worden uitgevoerd, evenals de injectie van virus in de staartvene. Bij het offeren van dieren bij de hepatectomie zullen dieren onder algehele anaesthesie worden gebracht. Bij operaties wordt pijnbestrijding toegepast. Alle experimenten met de AAV vectoren worden uitgevoerd in overeenstemming met geldende regels voor inperking, op DMII safety level. Alle samples van deze studie worden geanalyseerd op MLII inperkingsniveau tot ze gefixeerd zijn en virus daarmee volledig geïnactiveerd is.

## 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.

nvt

## 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.

Bij de muizen die hepatectomie ondergaan wordt pijnstilling toegepast tijdens en na de operatie

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Muizen ondervinden bij deze experimenten ongerief ten gevolge van de IV injecties en bloedafnames (beide ingeschat als gering). Een deel ondergaat hepatectomie onder anaesthesie met matig ongerief welke wordt verminderd door pijnbestrijding na de operatie. Er zijn verder ziekteverschijnselen tgv genetische modificatie: FAH- of OTC deficiënte muizen kunnen leverschade krijgen en daarmee geassocieerd gewichtsverlies. Omdat hiervoor een humaan eindpunt wordt gehanteerd is het ongerief beperkt. In FAH-deficiënte muizen kunnen op heel lange termijn levertumoren ontwikkelen die mogelijk ongerief geven, maar dit is niet voorzien in deze experimenten.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Gewichtsverlies in FAH/OTC deficiënte muizen is een gevolg van ophoping van toxische metabolieten die tot leverschade leiden. De oorzaak van levertumoren in FAH-deficiëntie is onbekend.

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

Muizen worden voor aanvang van de behandeling in condities gehouden waar er geen fenotype ontwikkelt. Tijdens het experiment worden geen additionele maatregelen genomen om leverschade te voorkomen, omdat het doel is om te onderzoeken of nieuwe therapie beter werkt dan controle-behandeling. Het ongerief ten gevolge van de leverschade wordt beperkt door de humane eindpunten mbt gewichtsverlies en het monitoren van bloedwaarden.

### 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.

Muizen die meer dan 20% gewicht verliezen ten opzichte van het maximaal bereikte gewicht zullen worden geëuthanaseerd evenals dieren die tekenen van algehele malaise (zoals bolle rug, pilo-erectie, inactiviteit) vertonen.

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

De FAH- of OTC deficiënte muizen die het controle of gemodificeerd U1 snRNA toegediend krijgen lopen allemaal kans gewicht gaan verliezen als gevolg van leverschade. De deficiënte controles krijgen het allemaal (maximaal 240 dieren) en degene met gemodificeerd snRNA alleen als de behandeling niet (meer) werkt (ook 240 dieren).

### 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.

Experiment	Gen	Groep	Aantal	ongerief (max)
A	FAH	niet-deficient	20	licht
	FAH	low control	20	matig
	FAH	high control	20	matig
	FAH	low modU1	20	licht/matig; afhankelijk van effectiviteit
	FAH	high modU1	20	licht/matig; afhankelijk van effectiviteit
A	OTC	niet-deficient	20	licht
	OTC	low control	20	matig
	OTC	high control	20	matig
	OTC	low modU1	20	licht/matig; afhankelijk van effectiviteit
	OTC	high modU1	20	licht/matig; afhankelijk van effectiviteit
B	WT	controle AAV	12	matig door onverwachte off-target effecten
B	WT	Mod U1	12	matig door onverwachte off-target effecten
C	FAH	niet-deficient	20	licht
	FAH	low control	20	matig
	FAH	high control	20	matig
	FAH	low modU1	20	licht/matig; afhankelijk van effectiviteit
	FAH	high modU1	20	licht/matig; afhankelijk van effectiviteit
	FAH	NTBC	20	licht
C	OTC	niet-deficient	20	licht

	OTC	low control	20		matig
	OTC	high control	20		matig
	OTC	low modU1	20	licht/matig; afhankelijk van effectiviteit	
	OTC	high modU1	20	licht/matig; afhankelijk van effectiviteit	
D	FAH	niet-deficient	20		matig
	FAH	low control	20		matig
	FAH	high control	20		matig
	FAH	low modU1	20		matig
	FAH	high modU1	20		matig
D	OTC	niet-deficient	20		matig
	OTC	low control	20		matig
	OTC	high control	20		matig
	OTC	low modU1	20		matig
	OTC	high modU1	20		matig

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

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

Nee

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

Voor het beantwoorden van de vraagstelling moet lever- en niermateriaal microscopisch onderzocht worden  
Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academic Medical Center Amsterdam

Meibergdreef

1105 AZ AMSTERDAM



**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  
AVD118002016775  
**Bijlagen**  
1

Datum 28 september 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 16 augustus 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "RescU1 Splicing" met aanvraagnummer AVD118002016775. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 26 september 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Wij hebben uw vragen gesteld over het ongerief en de humane eindpunten. U heeft als reactie een aangepaste bijlage dierproeven en een aangepaste NTS ingediend. Wij kunnen ons vinden in uw antwoord.

### **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.

Met het oog op artikel 10a, lid 1, zijn er algemene voorwaarden gesteld.

U kunt met uw project "RescU1 Splicing" starten. De vergunning wordt afgegeven van 28 september 2017 tot en met 30 november 2021.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

### **Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC AMC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 16 augustus 2017. 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. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld. Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

**Datum:**  
28 september 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD118002016775

### **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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:

ir. G. de Peuter  
Algemeen Secretaris

### **Bijlagen:**

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



# Projectvergunning

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

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

**Naam:** Academic Medical Center Amsterdam  
**Adres:** Meibergdreef 31  
**Postcode en plaats:** 1105 AZ AMSTERDAM  
**Deelnemersnummer:** 11800

deze projectvergunning voor het tijdvak 28 september 2017 tot en met 30 november 2021, voor het project "RescU1 Splicing" met aanvraagnummer AVD118002016775, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC AMC. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Principal Investigator/Onderzoeker. De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 16 augustus 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 26 september 2017;
  - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 26 september 2017;
  - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 16 augustus 2017, ontvangen op 16 augustus 2017.
  - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 26 september 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
<b>3.4.4.1. Injectie met AAV onder een aangepast dieet gevolgd door bloedafname en weefseluitname</b>				
	Muizen ( <i>Mus musculus</i> ) /	650	86% Matig 14% Licht	

### Voorwaarden

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

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

In artikel 10, lid 1 sub a 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

**Aanvraagnummer:**

AVD118002016775

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 afstemming met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarde wijzigen of intrekken.



**Aanvraagnummer:**

AVD118002016775

## 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



**Aanvraagnummer:**

AVD118002016775

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.



## 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](http://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>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in   11600 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen																								
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table><tr><td>Naam instelling of organisatie</td><td colspan="2">Academisch Ziekenhuis Leiden</td></tr><tr><td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td><td colspan="2">Leids Universitair Medisch Centrum</td></tr><tr><td>KvK-nummer</td><td>27366422</td><td></td></tr><tr><td>Straat en huisnummer</td><td>Albinusdreef</td><td>2</td></tr><tr><td>Postbus</td><td colspan="2">9600</td></tr><tr><td>Postcode en plaats</td><td>2300 RC</td><td>Leiden</td></tr><tr><td>IBAN</td><td colspan="2">NL11DEUT0451001400</td></tr><tr><td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td><td colspan="2">LUMC</td></tr></table>	Naam instelling of organisatie	Academisch Ziekenhuis Leiden		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	Leids Universitair Medisch Centrum		KvK-nummer	27366422		Straat en huisnummer	Albinusdreef	2	Postbus	9600		Postcode en plaats	2300 RC	Leiden	IBAN	NL11DEUT0451001400		Tenaamstelling van het rekeningnummer	LUMC	
Naam instelling of organisatie	Academisch Ziekenhuis Leiden																									
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	Leids Universitair Medisch Centrum																									
KvK-nummer	27366422																									
Straat en huisnummer	Albinusdreef	2																								
Postbus	9600																									
Postcode en plaats	2300 RC	Leiden																								
IBAN	NL11DEUT0451001400																									
Tenaamstelling van het rekeningnummer	LUMC																									
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	<table><tr><td>Straat en huisnummer</td><td>Albinusdreef</td><td>2</td></tr><tr><td>Postbus</td><td colspan="2">9600</td></tr><tr><td>Postcode en plaats</td><td>2300 RC</td><td>Leiden</td></tr><tr><td>IBAN</td><td colspan="2">NL11DEUT0451001400</td></tr><tr><td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td><td colspan="2">LUMC</td></tr></table>	Straat en huisnummer	Albinusdreef	2	Postbus	9600		Postcode en plaats	2300 RC	Leiden	IBAN	NL11DEUT0451001400		Tenaamstelling van het rekeningnummer	LUMC										
Straat en huisnummer	Albinusdreef	2																								
Postbus	9600																									
Postcode en plaats	2300 RC	Leiden																								
IBAN	NL11DEUT0451001400																									
Tenaamstelling van het rekeningnummer	LUMC																									
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td rowspan="5"></td><td><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters		<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie		Afdeling		Telefoonnummer		E-mailadres														
(Titel) Naam en voorletters		<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.																								
Functie																										
Afdeling																										
Telefoonnummer																										
E-mailadres																										
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td rowspan="5"></td><td><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters		<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie		Afdeling		Telefoonnummer		E-mailadres														
(Titel) Naam en voorletters		<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.																								
Functie																										
Afdeling																										
Telefoonnummer																										
E-mailadres																										